



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

---

## **APLICACIÓN DE MINERÍA DE GENOMAS PARA LA DETECCIÓN DE UN PÉPTIDO ANTIMICROBIANO Y SU POSTERIOR EXPRESIÓN HETERÓLOGA**

---

### **T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA  
IBT. DORA ONELY ROBLERO MEJÍA

TUTOR PRINCIPAL  
DR. SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTORAL  
DRA. SILVIA ANDREA MORENO MENDIETA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM  
DRA. MARTHA LYDIA MACÍAS RUBALCAVA  
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, ENERO 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Microbiología Industrial (C-106) del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, bajo la dirección del Dr. Sergio Sánchez Esquivel.

## **JURADO ASIGNADO**

- |   |            |
|---|------------|
| 1. ESCALANTE LOZADA JOSÉ ADELFO (PMDCBQ)      | PRESIDENTE |
| 2. CORZO BURGUETE GERARDO ALFONSO (PMDCBQ)    | VOCAL      |
| 3. SEGURA GONZÁLEZ DANIEL GENARO (PMDCBQ)     | VOCAL      |
| 4. HERNÁNDEZ ALCÁNTARA GLORIA (NO ACREDITADO) | VOCAL      |
| 5. REYES REYES-VIVAS HORACIO (PMDCBQ)         | SECRETARIO |

## **CONGRESO:**

Presentación del trabajo “Aplicación de minería de genomas para la detección y selección de un clúster que codifique para un lantipéptido” en el XIX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, del 27 de septiembre al 1º de octubre de 2021 en una plataforma completamente virtual.

## **FINANCIAMIENTO**

Este trabajo fue financiado por Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), proyecto IN205922 “Aplicaciones de la minería genómica para la búsqueda de lantipéptidos inéditos con actividad antimicrobiana”. También se recibió financiamiento del Programa “Nuevas Alternativas para el Tratamiento de Enfermedades Infecciosas” (NUATEI) del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Así mismo, durante el desarrollo de este trabajo se recibió una beca de posgrado por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el número 1075931.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas al conocimiento teórico y práctico, a su personal académico y administrativo que me apoyaron en diferentes etapas de este trabajo. Al Instituto de Investigaciones Biomédicas que me permitió realizar la parte experimental de este proyecto y me permitió conocer personas maravillosas que han contribuido a mi formación académica y personal, que me inspiran a seguir en el camino de la investigación científica.

A mi querido director de tesis, el Dr. Sergio Sánchez Esquivel, por aceptarme en su laboratorio, quién me brindó su apoyo, su amistad, confianza y sus consejos en todo momento y a quién tuve la fortuna de conocerlo en un congreso de Biotecnología en Chiapas en el 2017 mientras estudiaba mi licenciatura. La pasión y felicidad con la que presentó su ponencia en aquel congreso me impulsaron a decir: ¡Algún día quiero pertenecer a su grupo de trabajo!

A mis asesores, la Dra. Silvia Andrea Moreno Mendieta y la Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava por sus acertadas opiniones y comentarios, así como el apoyo brindado en la revisión de este trabajo.

A la Dra. Beatriz Ruíz Villafán y el Dr. Fernando Guzmán Chávez, quiénes me brindaron su apoyo incondicional en la parte experimental de este proyecto.

Finalmente agradezco a mis compañeros de laboratorio quienes hicieron más amena y divertida mi estancia y por sus aportaciones en la retroalimentación de este trabajo: Valerie, Luisa, Susi, Fernando, Rodrigo, Alma, Bere, Emiliano, Dulce, Carlos y Ximena.

## **DEDICATORIA**

Me encuentro muy feliz de estar escribiendo la dedicatoria de mi tesis de maestría, un camino que no ha sido fácil, pero sin duda una gran experiencia que ha contribuido a mi formación académica, profesional y personal. En primer lugar, dedico este párrafo a Dios, quién es el centro de todo y quién me ayuda en todo momento en la toma de decisiones, por darme fortaleza, entendimiento y capacidad para hacer esto posible.

A mi querida mamá quién siempre ha confiado en mí y que me ha apoyado en todo momento, realmente no tengo palabras para agradecer lo mucho que has hecho por mí y sabes que todo esto lo hago por ti y para ti, eres mi mayor inspiración en este camino llamado vida. Gracias por tus consejos, enseñanza, por tus regaños, por inculcarme valores y por formar a la persona que hoy en día soy, pero, sobre todo, gracias por tu inmenso amor y cariño.

A mi abuelita, quién siempre ha estado al pendiente de mí, por sus consejos, por sus oraciones, por su incondicional amor y siempre desearme lo mejor. Gracias por ser un ejemplo de fuerza y perseverancia.

A mis profesores de licenciatura, quienes me guiaron en este camino de la investigación científica: Dr. Raymundo, Dra. Didiana, Mtra. Dory Gledys y la Mtra. Lilia por sus valiosos consejos, por confiar en mí y por ser motivo de inspiración.

¡Muchas gracias a todos por ayudarme a hacer esto realidad!



# ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| RESUMEN .....  | 20 |
| ABSTRACT .....   | 21 |
| INTRODUCCIÓN .....   | 22 |
| Péptidos antimicrobianos .....   | 23 |
| Péptidos sintetizados ribosómicamente y modificados postraduccionalmente.....    | 25 |
| Microorganismos endófitos.....   | 40 |
| Minería de genomas .....   | 44 |
| JUSTIFICACIÓN.....   | 45 |
| HIPÓTESIS .....  | 46 |
| Objetivos particulares .....   | 46 |
| DISEÑO EXPERIMENTAL.....   | 47 |
| MATERIALES Y MÉTODOS.....  | 48 |
| Minería de genomas.....  | 48 |
| Análisis bioinformáticos.....  | 48 |
| Selección del clúster biosintético de interés.....                               | 49 |
| Clonación .....  | 50 |
| Síntesis de genes.....   | 50 |
| Diseño de Primers .....  | 51 |
| Amplificación de los genes <i>lanA</i> , <i>lanB</i> y <i>lanC</i> por PCR ..... | 52 |
| Purificación de los productos de PCR amplificados .....                          | 53 |
| Vectores de expresión utilizados.....  | 53 |
| Medios utilizados .....  | 57 |
| Clonación de <i>lanA</i> en pET-22b(+) .....                                     | 58 |
| Clonación de <i>lanB</i> y <i>lanC</i> en pFGC y pFGC_6XHis por Golden Gate..... | 59 |
| Preparación de células competentes.....  | 60 |
| Transformación .....   | 60 |
| Extracción de ADNp.....  | 61 |
| Extracción de ARN total .....  | 62 |
| Análisis de restricción para confirmar las clonas positivas .....                | 63 |
| Electroforesis de ácidos nucleicos.....  | 63 |
| Verificación de la orientación correcta .....                                    | 63 |

|   |     |
|---|-----|
| Expresión de los genes de interés por <i>cell-free</i> .....  | 63  |
| Preparación del extracto celular <i>Escherichia coli</i> BL21 Star .....  | 64  |
| Expresión de los genes por separado.....  | 65  |
| SDS-PAGE.....   | 66  |
| Cuantificación de proteínas por Bradford .....  | 67  |
| Purificación por His-Tag.....   | 68  |
| Expresión del principio activo (LanAm/F) .....  | 68  |
| Ensayo antimicrobiano .....   | 70  |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....  | 71  |
| Minería de genomas.....   | 71  |
| Análisis de los genomas con el programa antiSMASH v 6.0 .....   | 71  |
| Análisis de los genomas con el programa BAGEL4.....   | 75  |
| Análisis de los genomas con el programa RiPPMiner-Genome .....  | 76  |
| Caracterización bioinformática de los genes de los clústeres biosintéticos seleccionados .....                    | 78  |
| Clústeres de genes biosintéticos relacionados a la producción de lantipéptidos con actividad antimicrobiana ..... | 78  |
| Alineamiento múltiple de LanA, LanB y LanC del clúster biosintético 1.4 de <i>Embleya</i> sp. NF3 .....           | 82  |
| Clonación .....   | 90  |
| Construcción de los vectores de expresión .....   | 90  |
| Expresión de los genes de interés .....   | 95  |
| Cuantificación de las proteínas .....   | 95  |
| Expresión de LanA modificado (LanAm).....   | 102 |
| Adición de ARN total a las reacciones <i>cell-free</i> .....  | 104 |
| Ensayo antimicrobiano .....   | 104 |
| CONCLUSIONES.....   | 107 |
| PERSPECTIVAS .....  | 108 |
| ANEXO .....   | 109 |
| Anexo 1.....  | 109 |
| Anexo 2.....  | 109 |
| Anexo 3.....  | 110 |
| Anexo 4.....  | 110 |
| Anexo 5.....  | 111 |

BIBLIOGRAFÍA ..... 112

## A. ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** a) Ruta biosintética de la nisina A. Las letras en negrita y subrayado en el péptido líder muestran un motivo (FNLD) que se encuentra conservado en los lantipéptidos de clase I y juega un papel importante para el reconocimiento de las enzimas NisB y NisC (traducido de Repka et al., 2017). b) Estructuras químicas que muestran los procesos de deshidratación y ciclación (traducido de Yang et al., 2018).

**Figura 2.** Representación esquemática de la organización estructural de la maquinaria biosintética de las cuatro clases de lantipéptidos (Traducido de Hegemann y Süßmuth, 2020).

**Figura 3.** Grupo de genes biosintéticos que conforman tres clústeres de lantipéptidos de clase I. **A y S:** propéptido; **B:** enzima deshidratasa; **C:** enzima ciclasa; **D:** flavoproteína descarboxilasa oxidativa; **E, F, G y I:** inmunidad; **K:** sensor de histidina cinasa; **P:** proteasa; **Q:** regulador transcripcional positivo en la síntesis de epidermina; **R:** regulador de respuesta citoplasmática; **T y H:** transportador (Traducido de Repka *et al.*, 2017).

**Figura 4.** Ejemplos representativos de las cuatro clases de lantipéptidos (Traducido de Dischinger *et al.*, 2014).

**Figura 5.** Representación esquemática de microorganismos endófitos que residen en una planta (Martínez-Klimova *et al.*, 2017).

**Figura 6.** Compuestos biológicamente activos con actividad antibacteriana comprobada, aislados de microorganismo endófitos de plantas. (Traducido de Ek-Ramos *et al.*, 2019).

**Figura 7.** Morfología de aislados de Actinobacterias (Priyadharsini y Dhanasekaran, 2015).

**Figura 8.** Descripción esquemática de posibles entradas y predicciones de salida de datos de minería genómica (modificado y traducido de Ziemert *et al.*, 2016).

**Figura 9.** Construcción pUCIDT-HisTag-LanA(Furin) que contiene al gen *lanA* con codones optimizados para *E. coli*, sintetizado por la empresa Integrated DNA Technologies.

**Figura 10.** Construcciones pJET\_LanB\_CodOpt y pJET\_LanC\_CodOpt que contiene los genes *lanB* (a) y *lanC* (b) con codones optimizados para *E. coli*, sintetizado por la empresa Integrated DNA Technologies.

**Figura 11.** Mapa del vector pET-22b(+) (Novagen, [https://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/PEPF/pET\\_vectors/pET-22b\\_map.pdf](https://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/PEPF/pET_vectors/pET-22b_map.pdf)).

**Figura 12.** Mapa del vector pFGC (Guzmán-Chávez *et al.*, 2022).

**Figura 13.** Mapa del vector pFGC\_6XHis (Guzmán-Chávez *et al.*, 2022).

**Figura 14.** Biosíntesis del principio activo (LanAm/F) *in vitro*.

**Figura 15.** Clústeres de genes biosintéticos identificados en el genoma de *Actinoplanes* sp. TFC3 con el programa antiSMASH versión 6.0.

**Figura 16.** Clústeres de genes biosintéticos identificados en el genoma de *Streptomyces* sp. L06 con el programa antiSMASH versión 6.0.

**Figura 17.** Tipos de clústeres de genes biosintéticos identificados en el genoma de *Embleya* sp. NF3 con el programa antiSMASH versión 6.0.

**Figura 18.** Organización de los genes en clúster biosintético 1.4 asociado a la producción de un lantipéptido de clase I identificado en el genoma de *Embleya* sp. NF. Los genes en color rojo vino, representan los genes del *core* biosintético (enzimas de modificaciones postraduccionales), en color rosa, genes biosintéticos adicionales, en verde, genes reguladores y en gris, otros genes.

**Figura 19.** Organización de los genes en clúster biosintético 7.2 asociado a la producción de un lantipéptido de clase I en el genoma de *Embleya* sp. NF3. Los genes en color rojo vino, representan los genes del *core* biosintético (enzimas de modificaciones postraduccionales), en color rosa, genes biosintéticos adicionales, en verde, genes reguladores y en gris, otros genes.

**Figura 20.** Alineamiento global en Muscle de la secuencia de aminoácidos de LanA del clúster biosintético 1.4 de *Embleya* sp. NF3 denominada como EmbA con otras secuencias LanA reportadas: Nisina (NisA: BAA00602.1), subtilina (SpaS: AAA22778.1), epidermina (EpiA: P08136.1), microbisporicina (MibA: ADK32554.1) y planosporicina (PspA: CCQ18695.1). La flecha indica el sitio de corte en la secuencia LanA de *Embleya* sp. NF3 (EmbA). Las letras en negrita indican el motivo conservado en el péptido líder de los lantipéptidos de clase I. La letra en rojo indica una cisteína conservada que posiblemente está involucrada en la unión al lípido II para llevar a cabo el mecanismo de acción.

**Figura 21.** Alineamiento global en Muscle de la secuencia de aminoácidos LanB del clúster biosintético 1.4 de *Embleya* sp. NF3 denominada como EmbB con otras secuencias LanB reportadas, se muestra el porcentaje de identidad tomando a la secuencia EmbB como 100 %: microbisporicina (MibB: ADK32555.1) 31 %, epidermina (EpiB: YP\_500451.1) 21 %, Nisina (NisB: CAA48381.1) 21 % y subtilina (SpaB: AAA22779.1) 23 %.

**Figura 22.** Alineamiento global en Muscle de la secuencia de aminoácidos LanC del clúster 1.4 de *Embleya* sp. NF3 denominada como EmbC con otras secuencias LanC reportadas, se muestra el porcentaje de identidad tomando a la secuencia EmbC como 100 %: microbisporicina (MibC: ADK32556.1) 23 %, Nisina (NisC: CAA48383.1) 21 %, epidermina (EpiC: CAA44254.1) 23 % y subtilina (SpaC: AAA22777.1) 23 %. Las letras en rojo indican los aminoácidos involucrados en la triada catalítica de unión a ligandos de zinc.

**Figura 23.** Estructura química del principio activo (26 residuos de aminoácidos) del clúster biosintético 1.4 del genoma de *Embleya* sp. NF3 predicho con el programa RiPPMiner-Prediction.

**Figura 24.** Modelo tridimensional de las enzimas LanB y LanC del clúster biosintético 1.4 del genoma de *Embleya* sp. NF3 con el programa Phyre<sup>2</sup>. Los modelados se realizaron con un 100 % de confianza en relación con las secuencias molde. LanB realizó el modelado con la estructura cristalina de lantibiótico deshidratasa MibB de *Microbispora* sp. 107891782 con el cual presentó una cobertura del 92 % y LanC realizó el modelado con la estructura cristalina LanC *L. lactis* subsp. *lactis* con el cual presentó una cobertura del 82 %. El círculo amarillo en la imagen de la derecha representa el sitio de unión para ligandos de zinc.

**Figura 25.** Restricción de las clonas resultantes de la transformación LanA\_6X en el vector pET-22b(+) en *E. coli* JM109. 0.8 % agarosa a 80 V por 1 hora. Carril 1) marcador Invitrogen™ de 1 kb Plus, 2) clona 18 sin digerir, 3) clona 18 digerido con *NdeI* y *EcoRI*, 4) clona 28 sin digerir, 5) clona 28 digerido con *NdeI* y *EcoRI*, 6) clona 34 sin digerir, 7) clona 34 digerido con *NdeI* y *EcoRI*, 8) clona 43 sin digerir, 9) clona 43 digerido con *NdeI* y *EcoRI* y 10) marcador Invitrogen™ de 1 kb Plus.

**Figura 26.** Restricción de las clonas resultantes de la transformación de LanB y LanC en los vectores pFGC y el vector pFGC\_6XHis en *E. coli* JM109. 0.8 % agarosa a 80 V por 1 hora. Carril 1) marcador Invitrogen™ de 1 kb Plus, 2) clona pFGC-LanB sin digerir, 3) clona pFGC-LanB digerido con *EcoRV*, 4) clona pFGC\_6XHis-LanB sin digerir, 5) clona pFGC\_6XHis-LanB digerido con *EcoRV*, 6) clona pFGC-LanC sin digerir, 7) clona pFGC-LanC digerido con *KpnI*, 8) clona pFGC\_6XHis-LanC sin digerir, 9) clona pFGC\_6XHis-LanC digerido con *KpnI* y 10) marcador Invitrogen™ de 1 kb Plus.

**Figura 27.** Mapa de las construcciones de expresión *in silico* realizadas en el programa Snap Gene versión 6.0. a) pET-22b(+)-LanA\_6X, b) pFGC-LanB, c) pFGC-LanC, d) pFGC\_6XHis-LanB y e) pFGC\_6XHis-LanC.

**Figura 28.** Curva de calibración obtenida a partir de diferentes concentraciones de BSA cuantificado por el método de Bradford a 595 nm. Las barras rojas en vertical representan la desviación estándar de tres muestras.

**Figura 29.** SDS-PAGE (10.5 % de acrilamida/bisacrilamida) del extracto crudo *cell-free* de la expresión de las enzimas del *core* biosintético por separado. Carril 1) Marcador PageRuler Plus Prest Protein Ladder, de la casa comercial Thermo Scientific™, 2) control + (expresión de la proteína mScarlet), 3) control negativo (vector pFGC), 4) expresión de LanB, 5) expresión de LanB\_6X, 6) expresión de LanC y 7) expresión de LanC\_6X. Se colocaron 18 µg de muestra en cada carril. Las flechas color negro indican el tamaño donde se espera que se encuentren las enzimas, mientras que la flecha en rosa indica el tamaño esperado de la proteína control.

**Figura 30.** SDS-PAGE (10 % de acrilamida/bisacrilamida) de la purificación de LanB\_6X. Carril 1) Marcador PageRuler Plus Prest Protein Ladder, de la casa comercial Thermo Scientific™, 2) fracción no unida, 3) lavado 1, 4) lavado 2, 5) lavado 3, 6) elución 1 y 7) elución 2. De la fracción no unida se colocaron 18 µg de muestra, mientras que de los carriles 3-7 se colocaron 10 µl de muestra. La flecha color negro indica el tamaño donde se espera que se encuentre la enzima LanB\_6X.

**Figura 31.** SDS-PAGE (11 % de acrilamida/bisacrilamida) de la purificación de LanC\_6X. Carril 1) Marcador PageRuler Plus Prest Protein Ladder, de la casa comercial Thermo Scientific™, 2) fracción no unida, 3) lavado 1, 4) lavado 2, 5) lavado 3, 6) elución 1 y 7) elución 2. De la fracción no unida se colocaron 18 µg de muestra, mientras que de los carriles 3-7 se colocaron 10 µl de muestra. La flecha color negro indica el tamaño donde se espera que se encuentre la enzima LanC\_6X.

**Figura 32.** SDS-PAGE (10.5 % de acrilamida/bisacrilamida) del extracto crudo *cell-free* de la expresión de las enzimas del *core* biosintético y del propéptido en un mismo tubo de reacción. Carril 1) Marcador PageRuler Plus Prest Protein Ladder, de la casa comercial Thermo Scientific™, 2) control + (expresión de la proteína mScarlet), 3) control negativo (vectores vacíos pET-22b(+) y pFGC\_6XHis), 4) expresiones de LanA\_6X, LanB\_6X y LanC\_6X.

**Figura 33.** Extracción de ARN total de *Embleya* sp. NF3. 0.8 % agarosa, 80 V por 1 hora. Las primeras dos flechas superiores representan a las subunidades 28 S y 16S, seguido de los

ARN de transferencia (ARNt) y los ARN nucleolares pequeños (ARNsno), en la parte inferior se encuentran los ARN pequeños bacterianos (ARNs).

**Figura 34.** Ensayo antimicrobiano del principio activo LanAm/F frente a *M. luteus* en medio TBS. Pozo 1) control positivo, Nisina Additius® 1 mg/ml (10 µl), 2) LanAm (propéptido modificado), 3) LanAm/F (principio activo, LanA modificado y digerido con la enzima Furin), 4) control negativo, vectores vacíos pET-22b(+) y pFGC\_6XHis y 5) control negativo, vectores vacíos pET-22b(+) y pFGC\_6XHis digeridos con la enzima Furin. Este experimento se realizó por duplicado.



## B. ÍNDICE DE CUADROS

- Cuadro 1.** Microorganismos productores de lantipéptidos y sus principales aplicaciones
- Cuadro 2.** Secuencia de los primers utilizados en este trabajo
- Cuadro 3.** Condiciones de reacción para la amplificación del gen *lanA* por medio de PCR
- Cuadro 4.** Condiciones de reacción para la amplificación del gen *lanB* por medio de PCR
- Cuadro 5.** Condiciones de reacción para la amplificación del gen *lanC* por medio de PCR
- Cuadro 6.** Condiciones de reacción para llevar a cabo la clonación de los insertos en los vectores de expresión por medio de Golden Gate
- Cuadro 7.** Componentes para llevar la expresión del propéptido LanA\_6X y la enzima LanB\_6X por separado por *cell-free*
- Cuadro 8.** Componentes para llevar la expresión de la enzima LanC\_6X por *cell-free*
- Cuadro 9.** Composición para un gel SDS-PAGE de 0.75 mm a diferentes concentraciones de Acrilamida/bisacrilamida
- Cuadro 10.** Componentes para expresar a las proteínas LanA\_6X, LanB\_6X y LanC\_6X en el mismo microtubo de reacción y simultáneamente llevar a cabo las modificaciones del propéptido (LanAm)
- Cuadro 11.** Clústeres de genes biosintéticos asociados a la producción de RiPPs y lantipéptidos identificados con el programa antiSMASH versión 6.0 en tres genomas de Actinobacterias endófitas
- Cuadro 12.** Clústeres de genes biosintéticos asociados a la producción de RiPPs y lantipéptidos identificados con el programa BAGEL4 en tres genomas de Actinobacterias endófitas
- Cuadro 13.** Clústeres de genes biosintéticos asociados a la producción de RiPPs y lantipéptidos identificados con el programa RiPPMiner-Genome en tres genomas de Actinobacterias endófitas
- Cuadro 14.** Número de genes del clúster biosintético y características del principio activo
- Cuadro 15.** Función de los genes del clúster biosintético 1.4 identificado en el genoma de *Embleya* sp. NF3
- Cuadro 16.** Función de los genes del clúster biosintético 7.2 identificado en el genoma de *Embleya* sp. NF3
- Cuadro 17.** Cuantificación de proteínas totales del extracto crudo *cell-free*

**Cuadro 18.** Cuantificación de proteínas de las fracciones de purificación y elución de las enzimas LanB\_6X y LanC\_6X.

## C. ABREVIATURAS

| Abreviatura                                    | Significado   |
|--|---|
| Dha  | 2,3-didehidroalaninas   |
| Dhb  | 2,3-didehidrobutirinas  |
| C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub> | Acetato de sodio  |
| HCl  | Ácido clorhídrico   |
| ADN  | Ácido desoxirribonucleico   |
| AT   | Aciltransferasa   |
| ADNp   | ADN plasmídico  |
| EDTA   | Ácido etilendiaminotetraacético   |
| ARNt   | Ácido ribonucleico de transferencia   |
| BSA  | Albúmina de suero bovino  |
| antiSMASH                                      | Antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell                               |
| BAGEL  | BActeriocin GENome mining tool  |
| BLAST  | Basic Local Alignment Search Tool   |
| BlastP   | Basic Local Alignment Search Tool Protein                                       |
| Cys  | Cisteína  |
| CaCl <sub>2</sub>                              | Cloruro de calcio   |
| MgCl <sub>2</sub>                              | Cloruro de magnesio   |
| NaCl   | Cloruro de sodio  |
| ZnCl <sub>2</sub>                              | Cloruro de zinc   |
| BGC, BGCs                                      | Clúster(es) de genes biosintéticos  |
| ISARIC   | Consortio Internacional de Infecciones Respiratorias Agudas Graves y Emergentes |
| DO   | Densidad óptica   |
| DTT  | Ditiotreitol  |
| SDS  | Dodecilsulfato sódico   |
| USD  | Dólar estadounidense  |

|          |   |
|----------|---|
| SDS-PAGE | Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico |
| LanB     | Enzima lantibiótico deshidratasa                                  |
| LanC     | Enzima lantibiótico ciclasa                                       |
| ° C      | Grados centígrados  |
| g        | Gramos  |
| <i>g</i> | Gravedades  |
| GC       | Guanina y Citocina  |
| NaOH     | Hidróxido de sodio  |
| h        | Hora  |
| PTP1B    | Proteína tirosina fosfatasa 1B                                    |
| IDT      | Integrated DNA Technologies                                       |
| IPTG     | Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido                              |
| kD       | Kilodaltons   |
| kHz      | Kilohercio  |
| kb       | Kilopares de bases  |
| LanAm    | LanA modificado   |
| L        | Litro   |
| LB       | Luria Bertani   |
| ML       | Machine Learning  |
| μl       | Microlitros   |
| mg       | Miligramos  |
| mQ       | Milli-Q   |
| ml       | Mililitro   |
| mm       | Milímetro   |
| mM       | Milimolar   |
| min      | Minutos   |
| M        | Molar   |
| MUSCLE   | Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation                   |
| NCBI     | National Center for Biotechnology Information                     |
| nm       | Nanómetros  |

|             |  |
|-------------|--|
| nM          | Nanomolar  |
| nisA        | Nisina A   |
| N           | Normal   |
| nts         | Nucleótidos  |
| ORFs        | Open Reading Frames  |
| OCDE        | Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico                     |
| PAMs        | Péptidos antimicrobianos   |
| NRPs        | Péptidos no sintetizados ribosómicamente                                       |
| RiPP, RiPPs | Péptido(s) sintetizado(s) ribosómicamente y modificado(s) postraduccionalmente |
| CFPS        | Síntesis de Proteínas Libres de Células  |
| PKS         | Policétido sintasa   |
| PEG-8000    | Poli(etilenglicol)-8000  |
| pH          | Potencial hidrógeno  |
| PCR         | Reacción en Cadena de la Polimerasa  |
| ReLAVRA     | Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos      |
| RAM         | Resistencia a los antimicrobianos  |
| rpm         | Revoluciones por minuto  |
| s           | Segundo  |
| Ser         | Serina   |
| RTS         | Sistema de Traducción Rápido   |
| SOC         | Super Optimal broth + Catabolic repressor                                      |
| Thr         | Treonina   |
| TBS         | Tryptic soy broth  |
| V           | Volts  |

## RESUMEN

La búsqueda de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana es una necesidad para hacer frente al alarmante aumento de cepas resistentes a los antibióticos. Durante los últimos años se han implementado nuevos enfoques para la detección y exploración de hábitats poco comunes como fuentes de microorganismos productores de antibióticos, entre los cuales se destacan los microorganismos endófitos de plantas terapéuticas. Algunas Actinobacterias endófitas son un ejemplo claro de producción de metabolitos secundarios, los cuales son codificados por clústeres de genes biosintéticos. En este trabajo, a través de minería genómica y de herramientas bioinformáticas, se exploraron tres genomas de Actinobacterias endófitas aisladas de la planta medicinal mexicana *Amphipterygium adstringens*, comúnmente conocida como árbol de cuachalalate. En el genoma de *Embleya* sp. NF3, se seleccionó un clúster biosintético que codifica para un péptido antimicrobiano, específicamente un lantipéptido de clase I. Los genes necesarios para la síntesis del principio activo fueron clonados en vectores de expresión. El gen *lanA* codifica para el propéptido, *lanB* y *lanC* que codifican para las enzimas del *core* biosintético. Las construcciones resultantes fueron denominadas pET-22b(+)-LanA\_6X, pFGC-LanB y pFGC-LanC, pFGC-LanB\_6X y pFGC-LanC\_6X, estas construcciones fueron expresadas por medio de la plataforma *cell-free*. Primero se expresó cada construcción por separado. Se observaron bandas correspondientes al peso de las enzimas LanB\_6X y LanC\_6X cuando éstas fueron purificadas, por lo que se seleccionaron las construcciones con His-Tag para ser expresados simultáneamente en un mismo tubo de reacción junto con el propéptido (LanA\_6X) y producir LanA con las modificaciones postraduccionales realizadas por las enzimas LanB\_6X y LanC\_6X (LanAm). La banda correspondiente al peso de LanA\_6X no fue posible observarla y se decidió monitorear su expresión como principio activo (LanAm y digerido con la enzima Furin: LanAm/F). El principio activo sintetizado fue capaz de inhibir el crecimiento de *Micrococcus luteus*.

**Palabras clave:** Metabolitos secundarios, clústeres de genes biosintéticos, Actinobacterias endófitas, lantipéptido de clase I, principio activo, *cell-free*.

## ABSTRACT

The search for secondary metabolites with antimicrobial activity is a necessity to deal with the alarming increase in strains resistant to antibiotics. In recent years, new approaches have been implemented for the detection and exploration of unusual habitats as sources of antibiotic-producing microorganisms, among which the endophytic microorganisms of therapeutic plants stand out. Some endophytic Actinobacteria are a clear example of the production of secondary metabolites, which are encoded by biosynthetic gene clusters. In this work, through genomic mining and bioinformatic tools, three genomes of endophytic Actinobacteria isolated from the Mexican medicinal plant *Amphipterygium adstringens*, commonly known as the cuachalalate tree, were explored. In the genome of *Embleya* sp. NF3, a biosynthetic cluster that codes for an antimicrobial peptide, specifically a class I lanthipeptide, was selected. The genes necessary for the synthesis of the active principle were cloned in expression vectors. The *lanA* gene codes for the propeptide, *lanB* and *lanC* that code for the biosynthetic core enzymes. The resulting constructions were called necessary for the synthesis of the active ingredient and were cloned, giving rise to the constructions pET-22b(+)-LanA\_6X, pFGC-LanB and pFGC-LanC, pFGC-LanB\_6X and pFGC-LanC\_6X, these constructions were expressed using the cell-free platform. First each construction was expressed separately. Bands corresponding to the weight of the enzymes LanB\_6X and LanC\_6X, were observed when they were purified, therefore, the constructions with His-Tag were selected to be expressed simultaneously in the same reaction tube together with the propeptide (LanA\_6X) and produce LanA with modified (LanAm) post-translational modifications made by the enzymes LanB\_6X and LanC\_6X (LanAm). It was not possible to observe the band corresponding to the weight of LanA\_6X and it was decided to monitor its expression as an active ingredient (LanAm and cut with the enzyme Furin: LanAm/F). The synthesized active ingredient was able to inhibit the growth of *Micrococcus luteus*.

**Keywords:** Secondary metabolites, biosynthetic gene clusters, endophytic Actinobacteria, class I lanthipeptide, active ingredient, cell-free.

## INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) constituye uno de los problemas de salud pública más graves debido a que cada vez es más frecuente y rápida su evolución (Yu *et al.*, 2018; Hofer, 2019). Las infecciones causadas por organismos resistentes a los antibióticos comunes aumentan significativamente la tasa de morbilidad, la mortalidad y los costos de atención médica (van Duin *et al.*, 2016). En este sentido, la OCDE ha publicado un nuevo informe (Stemming the superbug tide, 7 de noviembre de 2018), que predice que 2.4 millones de personas en Europa, América del Norte y Australia morirán por infecciones con microorganismos resistentes a los antibióticos en los próximos 30 años y podría costar hasta \$ 3.5 mil millones de dólares por año, debido a su tratamiento y hospitalización. Recientemente, se ha catalogado a la enfermedad de COVID-19 como una posible causa de la RAM (Knight *et al.*, 2021). Un informe del ISARIC predice que esta problemática puede verse agravada por el aumento de las tasas de prescripción de antibióticos comunes (ISARIC, 2020). De acuerdo con un estudio publicado en el 2021, se estima que hasta el 75 % de los pacientes adultos con comorbilidades recibieron terapia antimicrobiana, incluso sin aislamiento del patógeno y que el antibiótico fue inapropiado en más de un tercio de los casos de COVID-19 (Al-Hadidi *et al.*, 2021). En otro estudio, se informó que el 72 % de los pacientes hospitalizados con COVID-19 recibieron antibióticos, pero solo el 8 % de ellos demostró adquirir coinfecciones bacterianas o fúngicas (Rawson *et al.*, 2020). Estos y otros informes (Langford *et al.*, 2021; López-Jácome *et al.*, 2022; Sieswerda *et al.*, 2021) demuestran que la RAM puede estar aumentando después de la prescripción de antimicrobianos en pacientes con COVID-19, sin embargo, hasta la fecha, no se ha publicado una cuantificación real, aunque existe evidencia confiable que sugiere que el uso excesivo de antimicrobianos es una de las principales causas de la RAM (ISARIC, 2020), la cual se describe como una de las diez mayores amenazas para la salud pública mundial, la seguridad alimentaria y el desarrollo (Kariyawasam *et al.*, 2021).

En América Latina, los microorganismos multirresistentes son la principal causa de infecciones asociadas a la atención de la salud. Los datos de vigilancia de ReLAVRA muestran una tendencia creciente en la resistencia de patógenos hospitalarios como *Klebsiella pneumoniae*, cuya resistencia a los antibióticos carbapenémicos ha aumentado



significativamente en América Latina desde 2014, alcanzando un promedio de 21 % (da Silva *et al.*, 2020; Garcia-Fulgueiras *et al.*, 2020). Entre 2004 y 2017 se reportó que el 48.3 % de aislados de *Staphylococcus aureus* fueron resistentes a la meticilina (Arias *et al.*, 2017), lo que se traduce a 45.2 % mayor el riesgo de mortalidad en comparación con las cepas susceptibles (>25 %) y un aumento de 6.7 veces mayor los costes del tratamiento con antibióticos y casi tres veces mayor los costes de hospitalización (Primo *et al.*, 2012). En México, se han reportado tasas de resistencia a carbapenémicos en *Enterobacteriaceae*, especialmente para *K. pneumoniae* (12.5%) y *Escherichia coli* ( $\leq 3$  %) (Garza-González *et al.*, 2019). También se ha reportado farmacoresistencia generalizada en *Acinetobacter* sp., (en cefepima, ciprofloxacina, meropenem y piperacillin-tazobactam las tasas de resistencia fueron superiores al 50 %), lo cual debe considerarse una prioridad en México porque se atribuye una tasa de mortalidad superior al 25 % en comparación con las cepas susceptibles (14.5 %) y que podría aumentar en los próximos años, representando una situación alarmante porque en la actualidad casi no hay opciones terapéuticas disponibles (Morfín-Otero *et al.*, 2013; Mancilla-Rojano *et al.*, 2020).

El desarrollo e introducción de nuevos antibióticos son las formas más eficaces de abordar la evolución de la resistencia antimicrobiana (Kapi, 2014; Banin *et al.*, 2017). Curiosamente, solo unos pocos antibióticos se obtienen por medios sintéticos (como las quinolonas), mientras que la mayoría de los antibióticos son metabolitos secundarios producidos por microorganismos (Hassan *et al.*, 2012). Por ello, la necesidad de nuevos fármacos con potencial para tratar infecciones de patógenos resistentes a los antibióticos comunes ha propiciado la bioprospección de productos naturales (Martínez-Klimova *et al.*, 2017).

## **Péptidos antimicrobianos**

Los péptidos antimicrobianos (PAMs), son un tipo de productos naturales que poseen diversas funciones biológicas y han recibido una gran atención tanto en la investigación básica como aplicada. En su mayoría, son péptidos  $\alpha$ -helicoidales catiónicos (cargados positivamente) y anfifílicos (hidrófilos e hidrófobos) (Zaslhoff, 2019). De acuerdo con su síntesis biológica, se clasifican en dos grupos: los péptidos sintetizados ribosómicamente y

modificados postraduccionalmente (RiPPs) y los péptidos no sintetizados por ribosomas (NRPs), si no que usan rutas enzimáticas biosintéticas (Hancock, 1997).

Los PAMs son esenciales para la defensa del organismo productor y se encuentran en bacterias, hongos, animales y plantas (Lei *et al.*, 2019). En los animales, los PAMs actúan como parte de la inmunidad innata e integran la primera línea de defensa contra los microorganismos dañinos. En bacterias, la producción de PAMs proporciona una ventaja competitiva para el productor en ciertos nichos ecológicos debido a la destrucción de otras bacterias mediada por péptidos (Hassan *et al.*, 2012). Algunos PAMs exhiben un espectro de actividad estrecho, mientras que otros muestran un espectro excepcionalmente amplio contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, así como con hongos, virus y parásitos (Andryukov *et al.*, 2019). En la actualidad, algunos de ellos se encuentran en desarrollo comercial y algunos han avanzado en ensayos clínicos (Ongey *et al.*, 2017; Di *et al.*, 2020).

La inducción de cambios en la permeabilidad de la membrana se reconoce principalmente como el mecanismo para describir la acción de los PAMs catiónicos. Los PAMs catiónicos pueden unirse e interactuar con las membranas celulares bacterianas cargadas negativamente, lo que lleva al cambio del potencial electroquímico en las membranas celulares bacterianas, induciendo daño en la membrana celular y la permeación de moléculas más grandes, destruyendo la morfología celular y finalmente, provocando la muerte celular (Andryukov *et al.*, 2019). Otros mecanismos de acción que se han reportado son la inhibición de la síntesis de nucleótidos/proteínas y la quelación de iones metálicos (Li y Rebuffat, 2020).

Los PAMs demuestran potencial como nuevos agentes terapéuticos debido a las claras ventajas que poseen sobre los antibióticos convencionales, los cuales incluyen una aparición más lenta de la RAM, debido a su mecanismo de acción y sus características farmacodinámicas (Yu *et al.*, 2018; El Shazely *et al.*, 2020; Magana *et al.*, 2020); además, en el caso de los animales, se ha reportado que los PAMs tienen la capacidad de modular favorablemente la respuesta inmune del organismo productor, promover la cicatrización de heridas y prevenir adherencias posquirúrgicas (Mahlapuu *et al.*, 2016; Koo *et al.*, 2019). Es por ello que estos péptidos ofrecen una alternativa para hacer frente al grave problema de la RAM. Además, las herramientas bioinformáticas y la gran cantidad de secuencias genómicas disponibles, facilitan la bioprospección de PAMs (Martínez-Klimova *et al.*, 2017; Blin *et al.*, 2021).

## **Péptidos sintetizados ribosómicamente y modificados postraduccionalmente**

Los RiPPs son una categoría de péptidos producidos por todos los dominios de la vida y contienen una amplia variedad de diversidad estructural (Arnison *et al.*, 2013). Algunos RiPPs han demostrado potentes propiedades antimicrobianas, los cuales podrían contribuir con nuevos andamios a los programas de descubrimiento de fármacos para contrarrestar el aumento de infecciones resistentes a los antibióticos comunes (Hudson y Mitchell, 2018).

Este grupo de péptidos poseen ciertas ventajas con respecto a los antibióticos convencionales, debido a sus características específicas: (1) La mayoría de los RiPPs tienen un espectro estrecho antimicrobiano, debido a su capacidad de internalizarse y luego unirse a su blanco. Por ejemplo, los lantipéptidos se unen al lípido II, que se encuentra en la membrana interna. Los lasso péptidos, como la lassomicina, inhibe la unidad ClpC1 del complejo de proteasa ClpC1P1P2. Otros lasso péptidos inhiben la ARN polimerasa y la biosíntesis de la pared celular y los tiopéptidos inhiben la actividad de los ribosomas. Por ello, es esencial que estos péptidos se internalicen primero antes de alcanzar el blanco intracelular. Cualquier interrupción en este camino reduciría la bioactividad (Cao, 2021). Muchos RiPPs penetran la membrana citoplasmática mediante la interacción con la membrana celular bacteriana. En el primer paso, se establecen interacciones electrostáticas entre los aminoácidos cargados positivamente con la superficie de la membrana cargada negativamente. En el segundo paso, la formación de poros dentro de la membrana hace que la bicapa se rompa, lo que conduce a fugas extensas y finalmente a la muerte celular, particularmente en bacterias Gram-positivas (Li y Rebuffat, 2020; Liu *et al.*, 2020; Cao, 2021;). Otro mecanismo que se ha propuesto de cómo los RiPPs permeabilizan la membrana son a través de la formación de vesículas que se autoensamblarán en poros o crearán defectos en la bicapa (Wimley y Hristova, 2019). Se ha reportado que la prenilación de los RiPPs aumenta su lipofilia, lo que promueve su orientación hacia la membrana (McIntosh y Donia, 2009). Algunos otros RiPPs se internalizan en la membrana sin dañarlas o forman poros (Karbalaei-Heidari y Budisa, 2020). (2) Las extensas modificaciones postraduccionales dotan a estos péptidos de estructuras muy diversas, lo que típicamente restringe la flexibilidad conformacional para el reconocimiento

del blanco con alta especificidad y contribuye a aumentar la estabilidad metabólica y la funcionalidad química (Arnison *et al.*, 2013). (3) Se ha demostrado que muchos RiPPs tienen múltiples mecanismos de acción al mismo tiempo, por ejemplo, la nisina y la epidermina, se caracterizan por un modo de acción dual y afectan la biosíntesis de la pared celular y la integridad de la membrana citoplasmática (Bierbaum y Sahl 2009). (4) Dado que los genes blanco específicos se conservan en su mayoría, las probabilidades de mutaciones son bajas, lo que disminuye la posibilidad de desarrollo de resistencia contra RiPPs (Cotter *et al.*, 2013). (5) Existe amplia información sobre su base genética de biosíntesis lo que permite su extracción en genomas bacterianos (Ortega y van Der Donk, 2016).

Dentro de la superfamilia de los RiPPs se encuentran los lantipéptidos (Knerr y van der Donk 2012), linaridinas (Mo *et al.*, 2017), proteusinas (Hamada *et al.*, 1994), péptidos lineales que contienen azol (LAP) (Melby *et al.*, 2011), cianobactinas (Sivonen *et al.*, 2010), botromicinas (Gomez-Escribano *et al.*, 2012), microcinas (Baquero *et al.*, 2019), lasso péptidos (Kaweewan *et al.*, 2018), microviridinas (Zhang *et al.*, 2018), sactipéptidos (Gardiner *et al.*, 2005), tiopéptidos (Morris *et al.*, 2009), las bacteriocinas (Chikindas, *et al.*, 2018), entre otros (Hudson y Mitchell 2018). De todos estos RiPPs, entre los más estudiados se encuentran los tiopéptidos, lasso péptidos, cianobactinas, microcinas y los lantipéptidos (Arnison *et al.*, 2013).

Si bien el interés en la aplicación de RiPPs como agentes farmacéuticos está aumentando, existe una gran necesidad en el desarrollo de métodos de plataforma general para su producción en cantidades requeridas para satisfacer las demandas (Ongey y Neubauer, 2016). Hasta la fecha, se han desarrollado muchos programas bioinformáticos para identificar BGCs de RiPPs a partir de datos de secuencias genómicas, lo cual ha llevado al descubrimiento de RiPPs novedosos, incluidos aquellos con modificaciones postraduccionales desconocidas (Li *et al.*, 2021).

## **Lantipéptidos**

Durante las dos últimas décadas, el número de lantipéptidos identificados ha aumentado enormemente, de 28 en 1997 (Sahl y Bierbaum, 1998) a más de 90 en 2012 (Knerr y van Der Donk 2012) y en el 2015 ya habían más de 100 lantipéptidos caracterizados (van Staden *et*

*al.*, 2021). La nisina A, producida por *Lactococcus lactis*, fue el primer lantipéptido estudiado y se ha utilizado como conservante de alimentos (Nisaplin® y Niprosin®) en más de 80 países durante más de 50 años (Jung y Sahl, 1991).

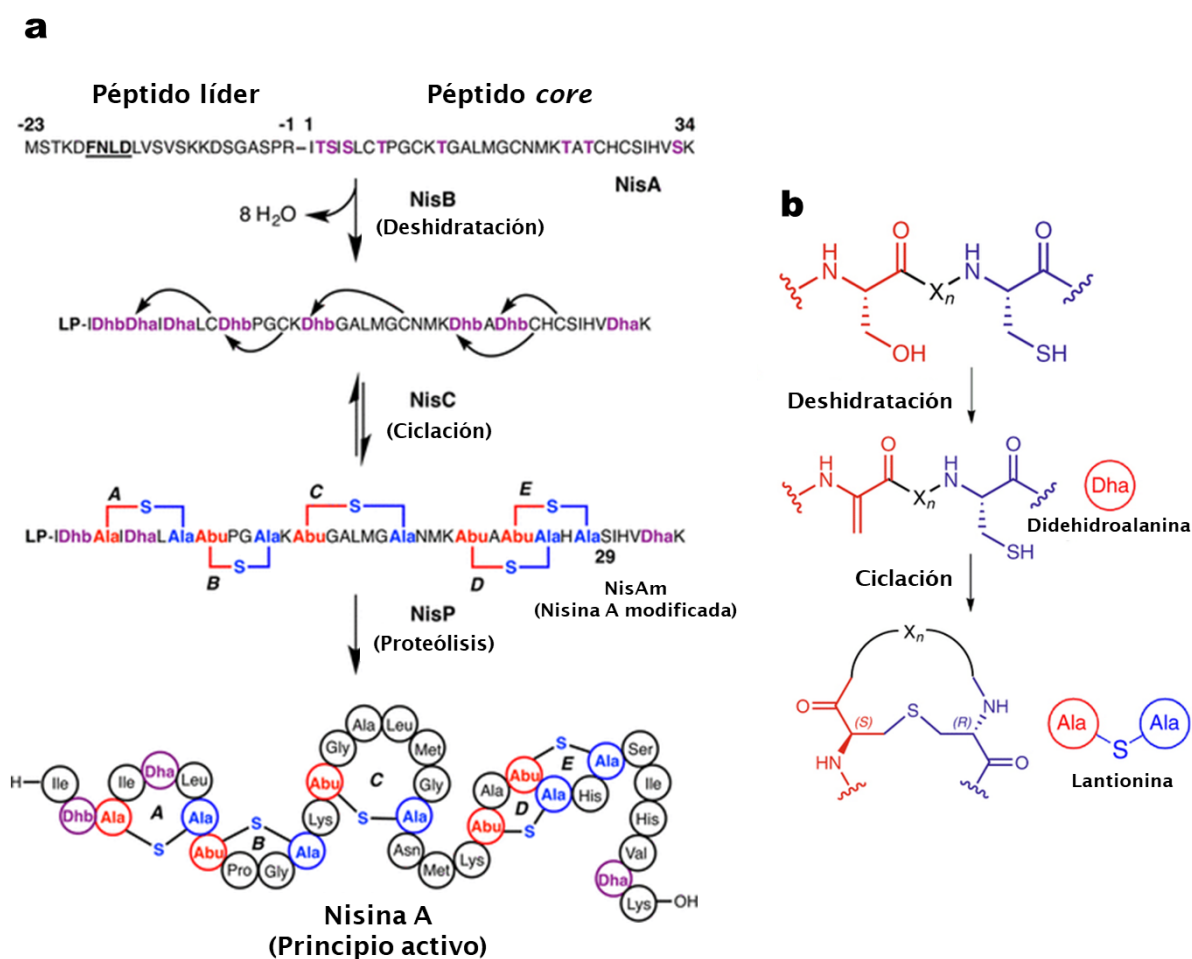
Los lantipéptidos han demostrado una amplia variedad de actividades biológicas como antimicrobianas (actúa sobre infecciones causadas por bacterias, específicamente se ha visto mayor actividad sobre bacterias Gram-positivas), antifúngicas (tiene efecto sobre algunos hongos), antivirales (actúan sobre algunos virus), morfogenéticas (implicadas en la formación de hifas aéreas del hospedero), antinociceptivas (alivio del dolor que actúa a nivel de la sustancia blanca medular) y antialodínicas (alivio del dolor que actúa sobre canales de calcio a nivel periférico y central) (Repka *et al.*, 2017). Recientemente se ha prestado mucha atención a los lantipéptidos, gracias a su naturaleza policíclica que les ofrece resistencia y estabilidad a las proteasas, así como especificidad del blanco debido a su limitada libertad conformacional, lo que los destaca sobre otros compuestos peptídicos (Ongey y Neubauer, 2016), es por ello que han surgido como una plataforma prometedora contra las bacterias resistentes (Barbosa *et al.*, 2019).

### ***Biosíntesis***

Los lantipéptidos están conformados por aminoácidos reticulados con tioéter, lantioninas/metil-lantioninas, que dan lugar a una estructura central policíclica (Ongey *et al.*, 2018). Las reacciones de modificación postraduccional del propéptido (LanA), es decir, el precursor del lantipéptido, se llevan a cabo por dos enzimas. La enzima LanB realiza la deshidratación de residuos de serina y treonina a residuos de 2,3-didehidroalanina (Dha) y 2,3-didehidrobutirina (Dhb), respectivamente. La forma de deshidratación puede ser bastante diferente para cada lantipéptido, siendo éste un criterio para clasificarlos (Bierbaum y Sahl 2009). Posteriormente, viene un proceso de ciclación, que se lleva a cabo por la enzima LanC, los residuos de cisteína atacan a los residuos deshidratados para generar los aminoácidos reticulados con tioéter, formando los anillos de lantionina y metil-lantionina mediante una adición de tipo Michael (Yang *et al.*, 2018; Lagedroste *et al.*, 2020). Hasta este punto, generalmente el propéptido modificado (LanAm) carece de actividades biológicas, hasta que una proteasa escinde el péptido líder del péptido *core* (figura 1) (Repka *et al.*, 2017; Yang *et*

al., 2018). Debido a que la mayoría de los lantipéptidos exhiben actividad antimicrobiana, los microbios productores deben expresar transportadores y proteínas de inmunidad en su grupo de genes biosintéticos para lograr una protección adecuada (Liu *et al.*, 2020).

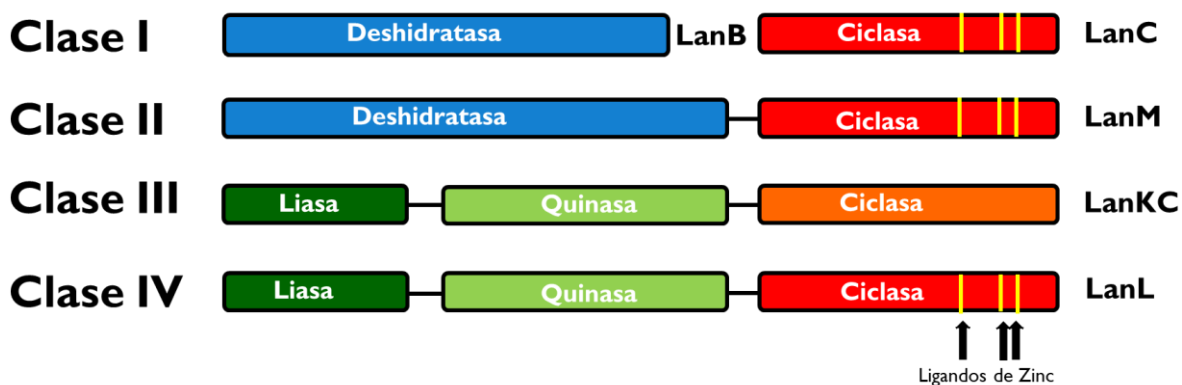
Los péptidos policíclicos resultantes tienen conformaciones restringidas que confieren sus actividades biológicas. Después de la instalación de los enlaces cruzados de tioéter característicos, las enzimas de adaptación introducen modificaciones postraduccionales adicionales que son únicas para cada lantipéptido y que afinan sus actividades y/o estabilidad (Repka *et al.*, 2017).



**Figura 1.** a) Ruta biosintética de la nisina A. Las letras en negrita y subrayado en el péptido líder muestran un motivo (**FNLD**) que se encuentra conservado en los lantipéptidos de clase I y juega un papel importante para el reconocimiento de las enzimas NisB y NisC (traducido de Repka *et al.*, 2017). b) Estructuras químicas que muestran los procesos de deshidratación y ciclación (traducido de Yang *et al.*, 2018).

## Clasificación

De acuerdo con sus características estructurales, los lantipéptidos fueron clasificados por primera vez por Jung y Salh, en tipos A y B (Jung y Salh, 1991). Sin embargo, el descubrimiento de nuevas estructuras provocó la reclasificación basada en las similitudes estructurales de sus enzimas biosintéticas (figura 2). Actualmente, los lantipéptidos se clasifican en cuatro clases: I, II, III y IV. Vale la pena mencionar que la biosíntesis de lantipéptidos clase I y clase II ha sido muy bien estudiada y son los únicos que hasta la fecha han demostrado actividad antimicrobiana y más recientemente se han reportado estructuras correspondientes a las enzimas biosintéticas (Repka *et al.*, 2017). Se sabe menos acerca de las enzimas de clase III y clase IV, aunque últimamente se han descubierto más detalles sobre sus principios mecánicos subyacentes (Hegemann y Süßmuth, 2020).



**Figura 2.** Representación esquemática de la organización estructural de la maquinaria biosintética de las cuatro clases de lantipéptidos (Traducido de Hegemann y Süßmuth, 2020).

## Microorganismos productores de lantipéptidos

Dentro de los principales microorganismos productores de lantipéptidos se encuentran los del filo Firmicutes, Bacteroidetes y las Actinobacterias, (Alkhalili *et al.*, 2018; Walker *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2021), también se encuentran algunas Proteobacterias y recientemente las

Cianobacterias están ganando interés para la producción de estas moléculas. En el cuadro 1 se ejemplifica algunos de los lantipéptidos caracterizados, así como sus principales aplicaciones.

**Cuadro 1.** Microorganismos productores de lantipéptidos y sus principales aplicaciones

| <b>Lantipéptido</b>        | <b>Clase</b> | <b>Microorganismo productor</b>   | <b>Bioactividad</b>   | <b>Referencia</b>   |
|----------------------------|--------------|-----------------------------------|---|---|
| Nisina                     | I            | <i>Lactococcus lactis</i>         | Antimicrobiano, antibiofilm; antitumoral, inmunomodulador   | de Arauz <i>et al.</i> , 2009; Shin <i>et al.</i> , 2016                              |
| Subtilina                  | I            | <i>Bacillus subtilis</i>          | Antimicrobiano  | Abriouel <i>et al.</i> , 2011   |
| Microbisporicina (NAI-107) | I            | <i>Microspora corallina</i>       | Antimicrobiano  | Foulston y Bibb, 2010   |
| Planosporicina             | I            | <i>Planomonospora alba</i>        | Antimicrobiano  | Sherwood <i>et al.</i> , 2013   |
| Epidermina                 | I            | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Antimicrobiano  | Allgaier <i>et al.</i> , 1986; Bonelli <i>et al.</i> , 2006                           |
| Duramicina                 | II           | <i>Streptomyces cinnamoneus</i>   | Antimicrobiano, antiviral, anticancerígeno, inmunomodulador | Märki <i>et al.</i> , 1991; Zeitlin <i>et al.</i> , 2004, Tabata <i>et al.</i> , 2016 |
| Mersacidina                | II           | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | Antimicrobiano  | Kumar <i>et al.</i> , 2018  |



|                   |     |                                   |  |  |
|-------------------|-----|-----------------------------------|--|--|
| Actagardina       | II  | <i>Actinoplanes garbadinensis</i> | Antimicrobiano                                 | Boakes <i>et al.</i> , 2009                                |
| SapT              | III | <i>Streptomyces tendae</i>        | Morfogénesis hifal                             | Kodani <i>et al.</i> , 2005                                |
| SapB              | III | <i>Streptomyces coelicolor</i>    | Morfogénesis hifal                             | Kodani <i>et al.</i> , 2004                                |
| Labirintopeptinas | III | <i>Actinomadura namibiensis</i>   | Antiviral, antialodínico                       | Meindl <i>et al.</i> , 2010; Prochnow <i>et al.</i> , 2020 |
| NAI-112           | III | <i>Actinoplanes</i> sp.           | Antimicrobiano, antialodínico, antinociceptivo | Repka <i>et al.</i> , 2017; Tocchetti <i>et al.</i> , 2021 |
| Estreptocolina    | IV  | <i>Streptomyces collinus</i>      | Inhibidor de PTP1B                             | Iftime <i>et al.</i> , 2015                                |

Los Firmicutes son uno de los filos que mayormente se ha estudiado por la producción de lantipéptidos. De hecho, el primer lantipéptido estudiado, la nisina, se aisló de *Lactococcus lactis* (Engelke *et al.*, 1992). Dentro de este filo, se encuentran *Bacillus* que se ha reportado como uno de los mayores géneros productores de lantipéptidos (Alkhalili *et al.*, 2018). En este género se han identificado clústeres de genes biosintéticos asociados a la producción de lantipéptidos de clase I y clase II, los cuales se han reportado con actividad antimicrobiana. Algunos ejemplos son: subtilina, entianina, ericinas, clausina, subtilomicina, turicinas, mersacidina, amilolisina, haloduracina, liquenicidina, cericidinas, entre otros (Barbosa y Mendo, 2015).

En el genoma de los Bacteroidetes también se ha observado una amplia distribución de clústeres de genes biosintéticos que codifican para lantipéptidos, entre ellos se destacan los genomas de *Chryseobacterium*, *Pedobacter* y *Flavobacterium*. La gran mayoría de los

propéptidos (LanA) son similares a los de los lantipéptidos previamente caracterizados; sin embargo, muchas de las enzimas del *core* biosintético son diferentes a las ya caracterizadas, lo que demuestra que la diversidad de genes de los lantipéptidos sigue siendo poco explorada (Walker *et al.*, 2020).

Por otro lado, las Actinobacterias portan una gran cantidad de grupos de genes biosintéticos de metabolitos secundarios cuyos productos abarcan estructuras químicas muy diversas, lo cual les confiere una gran versatilidad en la producción de compuestos bioactivos. Hasta el 2010, ya se habían reportado alrededor de 34,000 compuestos bioactivos microbianos y cerca del 40% de ellos son producidos por Actinobacterias (Gomes *et al.*, 2017).

Los lantipéptidos de Actinobacterias han sido muy poco estudiados. Se ha observado que los lantipéptidos de las Actinobacterias poseen una gran diversidad de modificaciones postraduccionales que no se encuentran en los lantipéptidos de otros filos (Zhang *et al.*, 2015), por ejemplo, la cloración de triptófano y dihidroxilación de prolina en microbisporicina (Castiglione *et al.*, 2008; Carrano *et al.*, 2015); la glicosilación en NAI-112 (Tocchetti *et al.*, 2021); la formación de lisinoalanina en cinamicina (Ökesli *et al.*, 2011), entre otros (Repka *et al.*, 2017). Las modificaciones únicas en la biosíntesis de los lantipéptidos actinobacterianos sugieren un gran potencial para explorar estos genomas y encontrar moléculas con prometedoras actividades biológicas (Zhang *et al.*, 2015).

Recientemente, las Cianobacterias están atrayendo la atención como productores potenciales de lantipéptidos. Se ejemplifican las proclorosinas, un grupo de lantipéptidos, que fueron producidos por ciertas cepas de las ubicuas picocianobacterias marinas, en géneros como *Prochlorococcus* y *Synechococcus* (Cubillos-Ruiz *et al.*, 2017).

## **Lantipéptidos de Clase I**

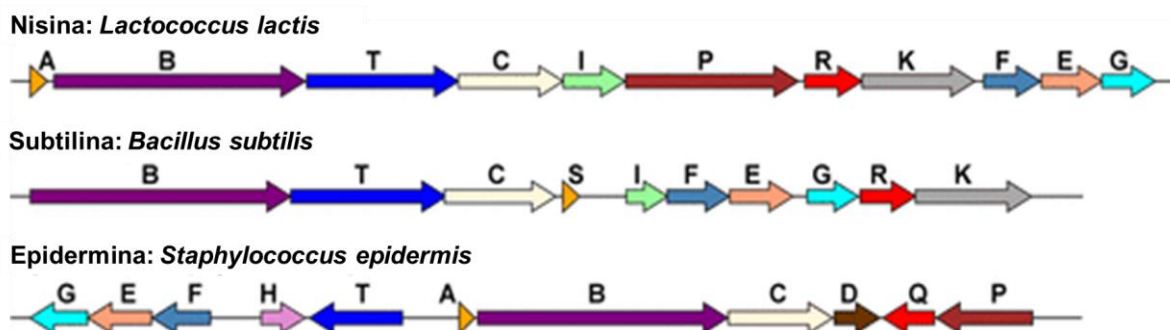
En lantipéptidos de clase I, los residuos de lantionina/metil-lantionina están formados por dos enzimas, una deshidratasa (LanB) y una ciclasa (LanC) (figura 2). Otra característica de los lantipéptidos de clase I es su estructura alargada y flexible. Esta estructura secundaria juega un papel importante en el efecto antimicrobiano al unirse al lípido II y en la formación de poros en la membrana celular (Dischinger *et al.*, 2014). Algunos ejemplos de péptidos que

pertenecen a lantipéptidos de clase I son: subtilina, microbisporicina, planosporicina, epidermina y el conocido lantibiótico nisina (cuadro 1) (Dischinger *et al.*, 2014; Ongey y Neubauer, 2016).

La deshidratación y la ciclación se llevan a cabo en el propéptido LanA, el cual se compone de dos regiones, un péptido líder y un péptido central (figura 1). Las modificaciones postraduccionales tienen lugar en el péptido central, dando lugar al péptido maduro bioactivo. El péptido modificado se exporta fuera de la célula productora a través de un transportador transmembranal de casete de unión a ATP (ABC), generalmente designado como LanT. El péptido líder se escinde intra o extracelularmente por una serín proteasa (LanP) que puede estar codificada en el mismo clúster biosintético o por otra proteasa codificada en otra parte del genoma del microorganismo productor (Knerr y van Der Donk, 2012). La biosíntesis de lantipéptidos se regula mediante el sistema regulador de dos componentes; el sensor de histidina cinasa (LanK) que está unida a la membrana y el regulador de respuesta citoplasmática (LanR). Cuando la concentración del lantipéptido secretado alcanza un cierto umbral, es detectado por el sensor LanK y éste se autofosforila, a su vez, éste fosforila a LanR, lo cual activa la transcripción de los genes involucrados en la biosíntesis y transporte del lantipéptido. LanR también activa la transcripción de los genes que codifican las proteínas de inmunidad LanE, LanF, LanG y LanI, las cuales utiliza la célula productora para protegerse a sí misma contra el efecto inhibitorio de su propio lantipéptido (Arnison *et al.*, 2013). LanI es una lipoproteína de membrana periférica que protege la célula bloqueando la formación de poros por el lantipéptido secretado. Por otro lado, las proteínas LanE, LanF y LanG son supuestos transportadores ABC especializados en bombear los lantipéptidos que han penetrado la membrana de regreso al ambiente exterior (Alkhalili *et al.*, 2018).

En los propéptidos también pueden existir otro tipo de modificaciones, para aumentar la estabilidad de los péptidos o para cambiar la carga general, por ejemplo, la instalación de un C-terminal S-[(Z)-2-aminovinil]-d-Cys (AviCys) en la epidermina, formado a través de un intermedio de enetiol generado por las flavoproteínas de descarboxilasa oxidativa (LanD) (Kupke *et al.*, 1992) (figura 3). Otras proteínas involucradas en la producción de epidermina son EpiH y EpiQ. EpiH es una proteína hidrofóbica con varias secciones transmembranales y un dominio hidrofílico central que muestra una identidad del 81.2 % con EpiT, el cual está

involucrado en el transporte de este lantipéptido (Peschel *et al.*, 1997). EpiQ es una proteína de unió al ADN que controla la producción de epidermina mediante la activación transcripcional del promotor *epiA*, utilizado para la transcripción de la mayoría de los genes biosintéticos de este clúster (Schnell *et al.*, 1992).



**Figura 3.** Grupo de genes biosintéticos que conforman tres clústeres de lantipéptidos de clase I. **A y S:** propéptido; **B:** enzima deshidratasa; **C:** enzima ciclasa; **D:** flavoproteína descarboxilasa oxidativa; **E, F, G y I:** inmunidad; **K:** sensor de histidina cinasa; **P:** proteasa; **Q:** regulador transcripcional positivo en la síntesis de epidermina; **R:** regulador de respuesta citoplasmática; **T y H:** transportador (Traducido de Repka *et al.*, 2017).

### ***Enzima lantibiótico deshidratasa (LanB)***

Las enzimas LanB generalmente tienen alrededor de 1000 residuos de aminoácidos, que consisten en un dominio de lantipéptido deshidratasa y un dominio llamado SpaB\_C (SpaB C-terminal). Unos pocos grupos de genes biosintéticos de lantipéptidos contienen genes que codifican una LanB truncada en el extremo C-terminal y una proteína independiente similar a SpaB\_C, lo que sugiere que los dos dominios de LanB podrían actuar tanto en *cis* como en *trans* (Zhang *et al.*, 2012).

Aunque los genes responsables de la producción del primer lantipéptido descubierto, la nisina, se identificaron por primera vez en 1992 (Engelke *et al.*, 1992), la base mecánica de las enzimas LanB de ningún lantipéptido había sido dilucidado, hasta hace unos años (Garg *et al.*, 2013; Ortega *et al.*, 2015; Ortega *et al.*, 2016). Uno de los factores limitantes en la caracterización de las enzimas LanB fue la falta de un sistema de expresión heteróloga y

purificación adecuada para estas enzimas de alto peso molecular. Hasta hace poco, se dilucidó la estructura cristalina de NisB, el lantibiótico deshidratasa involucrado en la biosíntesis de la nisina, los estudios bioquímicos revelaron un requerimiento inesperado de glutamil-tRNA<sup>Glu</sup> durante la catálisis (Ortega *et al.*, 2015). Estos resultados demostraron que el glutamato se transfiere del glutamil-tRNA<sup>Glu</sup> a las cadenas laterales de Ser/Thr seleccionadas dentro del péptido precursor de la nisina (NisA), dando lugar a una serie de intermedios glutamilados (Garg *et al.*, 2013; Ortega *et al.*, 2015). Tras la eliminación del glutamato, los residuos de Ser/Thr se convierten en sus homólogos insaturados (Garg *et al.*, 2013).

En otro estudio, realizado en el 2016, se caracterizó la especificidad de glutamil-tRNA<sup>Glu</sup> de *Microbispora* sp. y se resolvió la estructura cristalina del lantibiótico deshidratasa de microbisporicina (MibB), demostrándose que también MibB utiliza glutamil-tRNA<sup>Glu</sup> durante la deshidratación como fuente de glutamato necesario para catalizar la glutamilación de residuos de Ser/Thr en MibA. Estos datos proporcionan evidencia para un uso general de glutamil-tRNA<sup>Glu</sup> por las deshidratasas lantibióticas de clase I (Ortega *et al.*, 2016).

### ***Enzima lantibiótico ciclasa (LanC)***

Las enzimas LanC tienen alrededor de 400 residuos de aminoácidos y poseen una topología doble de pliegue en barril  $\alpha$  y una tríada Cys-Cys-His estrictamente conservada cerca de sus extremos C-terminal para la unión de iones zinc (Zhang *et al.*, 2012).

La caracterización inicial de la función de una ciclasa (LanC) se llevó a cabo mediante estudios genéticos en Pep5, en los que la delección de los 231 residuos del extremo C-terminal de PepC disminuyó la formación de anillos de lantionina (Meyer *et al.*, 1995). En el 2006, se dilucidó la primera estructura cristalina de NisC de *Lactococcus lactis*, con lo cual se identificaron los residuos catalíticos esenciales de la ciclasa NisC implicados en la biosíntesis de nisina (Li *et al.*, 2006).

De acuerdo al análisis filogenético de la distribución de las ciclasas (LanC), estas enzimas se clasifican en tres grupos distintos: en el grupo 1 que se encuentra en Bacteroidetes y Proteobacteria, en el grupo 2 las Actinobacterias y en el grupo 3 los Firmicutes. Los grupos

2 y 3 están relacionados entre sí y son distintos de las secuencias del grupo 1. Aunque las deshidratasas (LanB) de Bacteroidetes y Proteobacteria están estrechamente relacionadas, ya que se encuentran dentro de un grupo, los orígenes evolutivos de LanB frente a LanC denotan posibles diferencias, por lo tanto, parece LanB ha evolucionado independientemente de LanC, o que LanB o LanC pueden haber sido reclutados de otros organismos y han formado un par funcional (Zhang *et al.*, 2012).

## **Lantipéptidos de Clase II**

En los lantipéptidos de clase II participa sólo una enzima multifuncional, la lantionina sintetasa (LanM), esta enzima lleva a cabo tanto las reacciones de deshidratación y ciclación, también, este grupo generalmente presenta una estructura más globular a comparación de los de clase I y se ha reportado la presencia de un transportador bifuncional codificado dentro del grupo de genes. Este transportador cumple una doble función, es decir, el transporte del péptido a través de la membrana y la eliminación del péptido líder a través de la actividad de un dominio N-ter de peptidasa. Ejemplos de lantibióticos de clase II son la mersacidina y la procorosina 1.7, en la figura 4 se observa que ambos lantipéptidos tienen una estructura más globular en comparación con los de clase I (Zhang *et al.*, 2012).

Hasta la fecha, sólo se ha caracterizado estructuralmente una enzima LanM. CylM, la sintetasa de clase II implicada en la biosíntesis de la citolisina enterocócica, contiene un dominio de deshidratasa N-terminal que es estructuralmente similar a las cinasas de lípidos eucariotas y un dominio de ciclasa C-terminal que es estructuralmente similar a las proteínas LanC de clase I. Sin embargo, no hay estructuras unidas al sustrato disponibles y, por lo tanto, el mecanismo por el cual las LanM reconocen sus péptidos precursores afines sigue siendo poco conocido (Rahman *et al.*, 2020).

### ***Enzima LanM***

Las enzimas LanM son proteínas de 115–120 kDa (900–1200 residuos) que catalizan tanto la deshidratación como la ciclación de sus sustratos LanA (Xie *et al.*, 2004).

LanM contiene dos dominios, un dominio de deshidratación N-terminal y un dominio de ciclase C-terminal. El dominio N-terminal de las enzimas LanM es responsable de la deshidratación y el dominio C-terminal de la ciclación. La región N-terminal no muestran homología con LanB de la clase I, lo que sugiere que no evolucionaron a partir de una fusión simple de las enzimas LanB y LanC que se encuentran en los lantibióticos de clase I (Siezen *et al.*, 1996), sin embargo, el dominio de ciclase C-terminal muestra aproximadamente un 25% de identidad de secuencia con LanC de la clase I, incluidos los residuos de unión a zinc conservados (Lagedroste *et al.*, 2020).

Las proteínas LanM usan ATP para fosforilar los residuos de Ser/Thr en sus sustratos, seguido de la eliminación del éster de fosfato resultante para producir los deshidroaminoácidos. Posteriormente, el dominio C-terminal cataliza la reacción de ciclación de manera similar a las enzimas LanC. A diferencia de las enzimas LanB y LanC, las LanM prevalecen en las Proteobacterias y también se han caracterizado a partir de las Cianobacterias, Actinobacterias y algunos Firmicutes, pero no se han encontrado en Bacteroidetes, lo que nuevamente indica que las diferentes clases de lantipéptidos probablemente evolucionaron de forma independiente (Zhang *et al.*, 2012).

### **Lantipéptidos de Clase III**

Los lantipéptidos de clase III, por ejemplo, las laberintopeptinas (figura 4), al igual que la clase II, son modificados por una única enzima multifuncional denominada LanKC. RamC, la enzima que genera las lantioninas en SapB mediante la modificación postraduccional del péptido RamS, fue la primera sintetasa de clase III identificada. Recientemente, se descubrió una nueva clase de lantibióticos que contienen estructuras carbocíclicas llamadas labioninas. Estas estructuras se forman a partir de dos residuos de Ser y un residuo de Cys por sintetasas que son homólogas a RamC (Wang y van Der Donk 2012).

Los lantipéptidos de esta clase pueden ser utilizados como agentes terapéuticos antivirales, antialodínicos y antinociceptivos (Sambeth *et al.*, 2011; Repka *et al.*, 2017; Lagedroste *et al.*, 2020; Tocchetti *et al.*, 2021).

### ***Enzima LanKC***

La enzima LanKC contiene tres dominios: un dominio liasa N-terminal, un dominio cinasa central y un dominio ciclasa C-terminal. Los dominios de la liasa y la cinasa, llevan a cabo la deshidratación de residuos de Ser y Thr, mientras el dominio ciclasa forma los distintos anillos (metil) lantionina. La característica única de las enzimas LanKC es la capacidad de instalar estructuras de labioninas/metil-labionina, pero aún se desconoce el mecanismo exacto de este proceso (Hegemann y Süssmuth, 2020).

### **Lantipéptidos de Clase IV**

Una cuarta clase ha sido asignada recientemente a través del descubrimiento del lantipéptido venezuelina, producido por *Streptomyces venezuelae* (Kodani *et al.*, 2014) (figura 4). Al igual que la clase II y III, posee una sola enzima multifuncional, la lantionina sintetasa (LANL). La mayoría de los lantipéptidos de clase III y IV no muestran actividad antimicrobiana, pero poseen otras actividades, por ejemplo, funciones morfogénicas implicadas en la formación de hifas aéreas (Sambeth *et al.*, 2011), actividades antialodínicas (Hegemann y Süssmuth, 2020), antivirales (Repka *et al.*, 2017; Hegemann y Süssmuth, 2020) y como inhibidor de la proteína PTP1B, capaz de inhibir los reguladores negativos de las vías de señalización de la insulina y la leptina, potenciar la acción de la insulina y la leptina, por lo tanto, podrían ser beneficiosos para el tratamiento de la diabetes tipo 2 y la obesidad. (Iftime *et al.*, 2015).

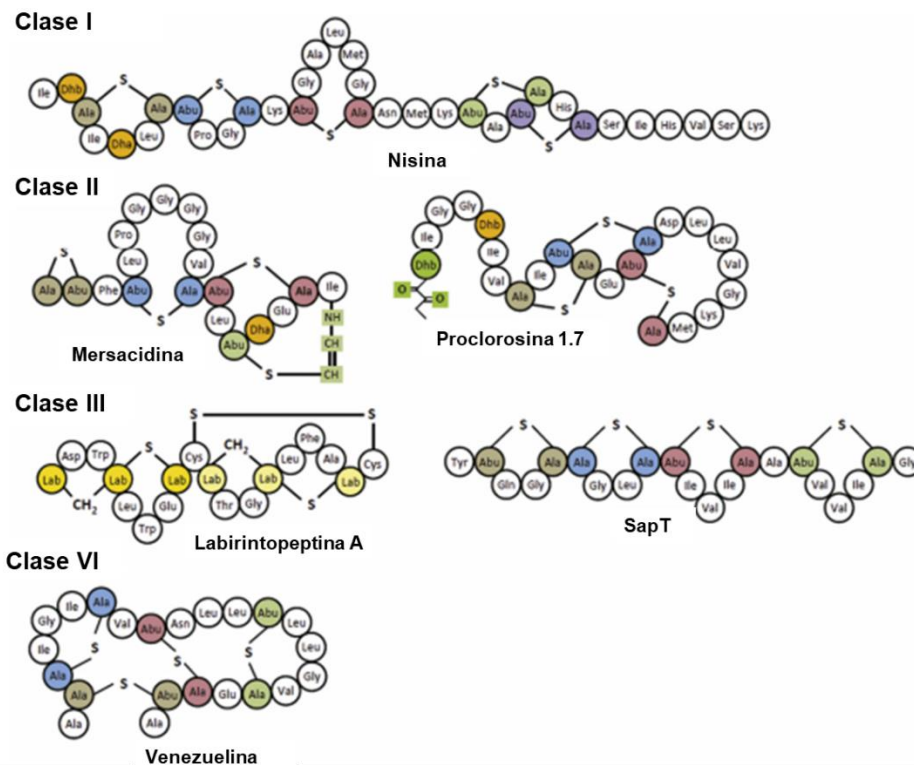
### ***Enzima LanL***

La enzima LanL contiene tres dominios distintos, un dominio liasa N-terminal, un dominio cinasa central y un dominio ciclasa C-terminal. Los dominios de cinasa y liasa catalizan las reacciones de fosforilación y eliminación de fosfato, respectivamente, para convertir los residuos de Ser/Thr en 2,3-didehidroalaninas (Dha) y 2,3-didehidrobutirinas (Dhb), respectivamente. Luego, una adición de tipo Michael en el tiol de una cadena lateral de Cys al doble enlace insaturado de Dha/Dhb, da como resultado lantionina/metil-lantionina, que es llevado a cabo por el dominio ciclasa C-terminal. Dependiendo de la selectividad de la



cara del ataque nucleofílico, se pueden formar dos diastereómeros, DL-(metil)lantionina (DL-(Me)Lan) y LL-(metil)lantionina (LL-(Me)Lan) (Ren *et al.*, 2020).

El dominio liasa y el dominio cinasa muestran homología con los dominios correspondientes de la enzima de péptidos de clase III, el dominio ciclasa de LanL es homólogo a LanC (Zhang *et al.*, 2012; Lagedroste *et al.*, 2020).



**Figura 4.** Ejemplos representativos de las cuatro clases de lantipéptidos (Traducido de Dischinger *et al.*, 2014).

### Mecanismo de acción de los lantipéptidos con actividad antimicrobiana

Comúnmente, los lantipéptidos con actividad antimicrobiana se han denominado lantibióticos, esta actividad biológica se dirige principalmente contra bacterias Gram-positivas donde el blanco de la mayoría de los lantibióticos es la pared celular y/o un receptor específico: el lípido II que es un precursor de la pared celular y que se encuentra en la

membrana celular (Bierbaum y Sahl 2009; Arnison *et al.*, 2013). Se ha demostrado que algunos miembros de los lantipéptidos de clase I, como la nisina, tienen un mecanismo de acción dual, por una parte, pueden unirse al lípido II y, por lo tanto, evita la síntesis correcta de la pared celular conduciendo a la despolarización de la membrana y con ello, la muerte celular (Dischinger *et al.*, 2014; Lagedroste *et al.*, 2020). Además, pueden utilizar el lípido II como molécula de acoplamiento para iniciar un proceso de inserción en las membranas y esto conlleva a la formación de poros dando como resultado la muerte celular (Zhang *et al.*, 2012). Se ha reportado que las moléculas de nisina y lípido II forman poros en la membrana de la célula blanco en una estequiometría de ocho moléculas de nisina y cuatro del lípido II (Hasper *et al.*, 2004). La gallidermina, otro lantipéptido de clase I, conserva un motivo de unión al lípido II similar a la nisina, pero, dado que esta molécula es más corta que la nisina, es incapaz de formar poros en la mayoría de las especies y actúa únicamente mediante la inhibición de la biosíntesis de la pared celular (Bonelli *et al.*, 2006).

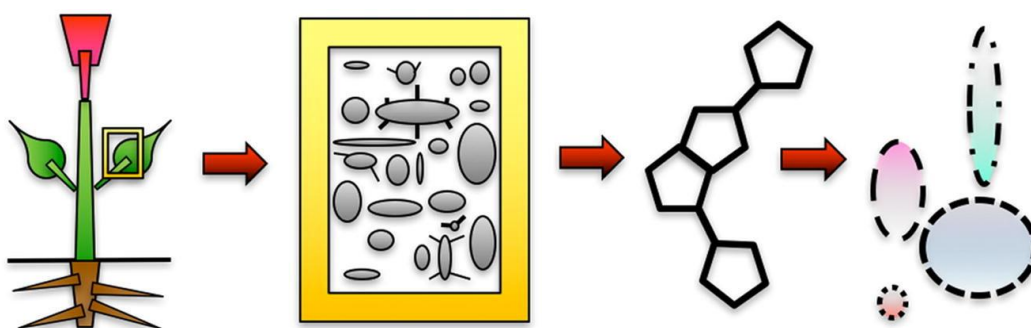
Un lantibiótico de clase II como la mersacidina, sólo tiene actividad de unión al lípido II, no forma poros, pero tienen una estructura helicoidal anfifílica, lo que le permite insertarse en la membrana de la célula blanco, conduciendo a la despolarización y la muerte celular (Lagedroste *et al.*, 2020). Se ha reportado que este lantibiótico, presentó actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas como *S. aureus* y *Enterococcus faecalis*, los cuales son resistentes a la meticilina y vancomicina, respectivamente (Carrano *et al.*, 2015). En *E. coli* y otras enterobacterias no presentó actividad, aunque fue más activa contra otras bacterias Gram-negativas como *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria* spp. y *Haemophilus influenzae*, en comparación con planosporicina, actagardina, mersacidina y nisina (Castiglione *et al.*, 2008).

## **Microorganismos endófitos**

La búsqueda de nuevos productos naturales con potencial antimicrobiano ha llevado a investigar fuentes poco exploradas (Hug *et al.*, 2018). En este sentido, la detección de compuestos antimicrobianos de microorganismo endófitos es una alternativa prometedora contra la creciente amenaza de cepas de patógenos humanos y vegetales resistentes a fármacos (Martínez-Klimova *et al.*, 2017). Los metabolitos antimicrobianos aislados de

endófitos pertenecen a diversas clases estructurales, que incluyen: alcaloides, péptidos, esteroides, terpenoides, fenoles, quinonas y flavonoides (Yu *et al.*, 2010).

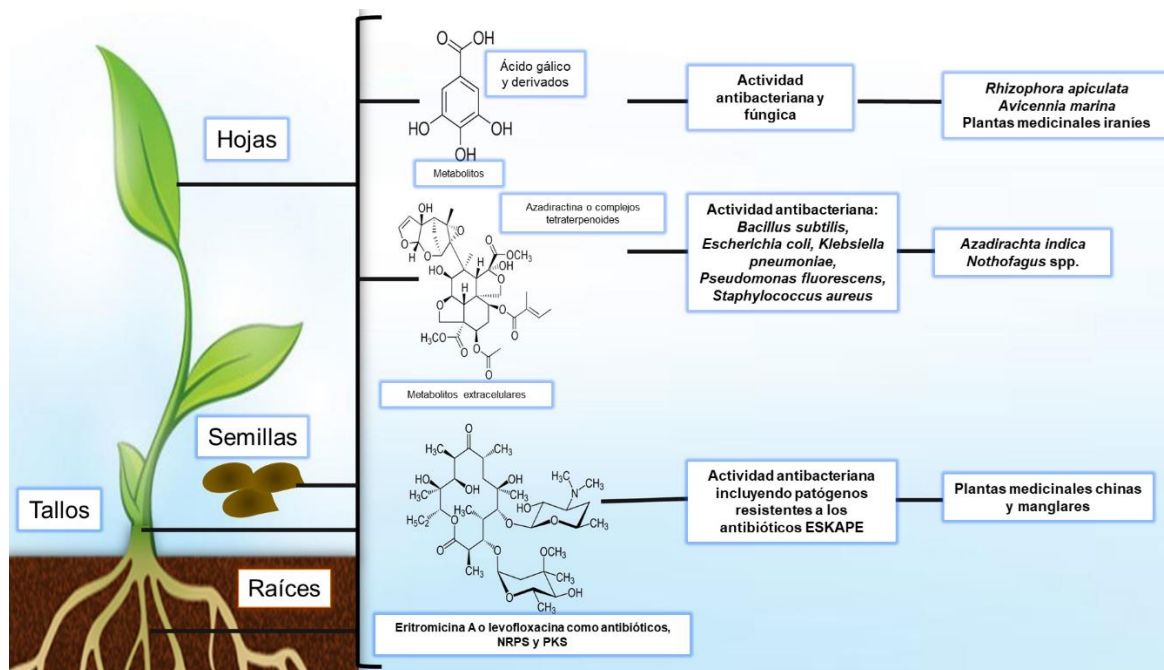
Los microorganismos endófitos son aquellas bacterias y hongos que residen en los tejidos de plantas, debajo de las capas de células epidérmicas sin causar ningún síntoma aparente de enfermedad en el huésped (Stone *et al.*, 2000) (figura 5). Son microorganismos no patógenos que viven dentro de los tejidos de plantas sanas durante todo o casi todo su ciclo de vida. Algunas bacterias endófitas pueden mejorar el sistema de defensa de la planta y promover su desarrollo (Liu *et al.*, 2017). Se ha propuesto que los endófitos benefician indirectamente el crecimiento de las plantas al producir sustancias especiales, principalmente metabolitos secundarios, para prevenir el crecimiento o la actividad de los patógenos de las plantas (Christina *et al.*, 2013).



**Figura 5.** Representación esquemática de microorganismos endófitos que residen en una planta (Martínez-Klimova *et al.*, 2017).

Muchas investigaciones han demostrado que diversas plantas terapéuticas son una fuente importante de microorganismos endófitos, que constituyen una fuente novedosa y potencial de metabolitos secundarios para su explotación en la medicina, la agricultura y la industria (Singh *et al.*, 2017), especialmente, se ha demostrado que en este tipo de plantas existe una gran cantidad de productos naturales antimicrobianos provenientes de microorganismos endófitos (figura 6), por ello, la búsqueda de productos naturales sintetizados por estos microorganismos podría ser una herramienta prometedora para contribuir a resolver el problema del aumento de bacterias resistentes a los antimicrobianos comunes (Yu *et al.*,

2010). En este sentido, los filos Ascomycota y Actinobacteria son los principales endófitos que producen moléculas antimicrobianas (Singh y Dubey, 2015; Martínez-Klimova *et al.*, 2017).



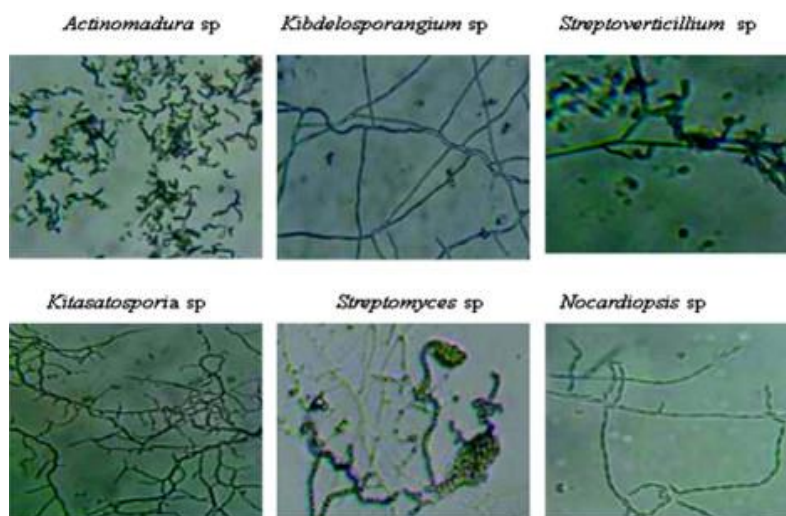
**Figura 6.** Compuestos biológicamente activos con actividad antibacteriana comprobada, aislados de microorganismo endófitos de plantas. (Traducido de Ek-Ramos *et al.*, 2019).

## Actinobacterias

Las Actinobacterias son bacterias Gram-positivas que muestran una amplia gama morfológica, que va desde organismos unicelulares hasta aquellos que forman filamentos miceliales ramificados. Además, forman esporas y su ADN contiene altos porcentajes de GC (51-70%) (Barka *et al.*, 2016). Actualmente, el grupo de las Actinobacterias endófitas están ganando una gran atención debido a su capacidad para producir una amplia gama de metabolitos secundarios que poseen diversas actividades biológicas (Dinesh *et al.*, 2017).

Las Actinobacterias presentan una amplia variedad de morfologías y se diferencian entre ellas principalmente con respecto a la presencia o ausencia de micelio aéreo o micelio sustrato (es conocido también como micelio primario o micelio vegetativo), el color del

micelio, la estructura y apariencia de sus esporas y la producción de pigmentos melanoides difusibles (figura 7). La fragmentación micelial es una forma especial de reproducción vegetativa que produce esporas o conidios (Hazarika y Thakur, 2020).



**Figura 7.** Morfología de aislados de Actinobacterias (Priyadharsini y Dhanasekaran, 2015).

Recientemente en nuestro grupo de investigación se realizó la búsqueda de microorganismos endófitos de la planta medicinal mexicana *Amphipterygium adstringens*, mejor conocida como el árbol de cuachalalate, donde se aislaron varios de estos microorganismos, los cuales fueron capaces de inhibir el crecimiento de levaduras y bacterias patógenas. Entre los microorganismos endófitos que se aislaron se encuentran tres Actinobacterias: *Actinoplanes* sp. TFC3 (GCF\_001553785.1), *Streptomyces* sp. L06 y *Embleya* sp. NF3 (GCF\_002024165.1) (Rodríguez-Peña *et al.*, 2020). Estos géneros también se han reportado como microorganismos de vida libre, especialmente se han encontrado en el suelo (Behie *et al.*, 2017).

El genoma de *Actinoplanes* sp. TFC3 está enriquecido particularmente con clústeres de genes biosintéticos que podrían codificar para terpenos y policétidos sintasas, además, se reveló un clúster involucrado en la biosíntesis de un híbrido policétido *trans*-aciltransferasa (AT), un metabolito inédito que nunca antes había sido reportado en *Actinoplanes* (Centeno-Leija *et al.*, 2016). *Streptomyces* sp. L06 contiene en su genoma clústeres de genes biosintético que

podrían codificar para nuevos RiPPs, mientras que la secuencia genómica de *Embleya* sp. NF3 reveló clústeres de genes biosintéticos asociados a la producción de nuevos NRP y RiPPs (Caicedo-Montoya *et al.*, 2021).

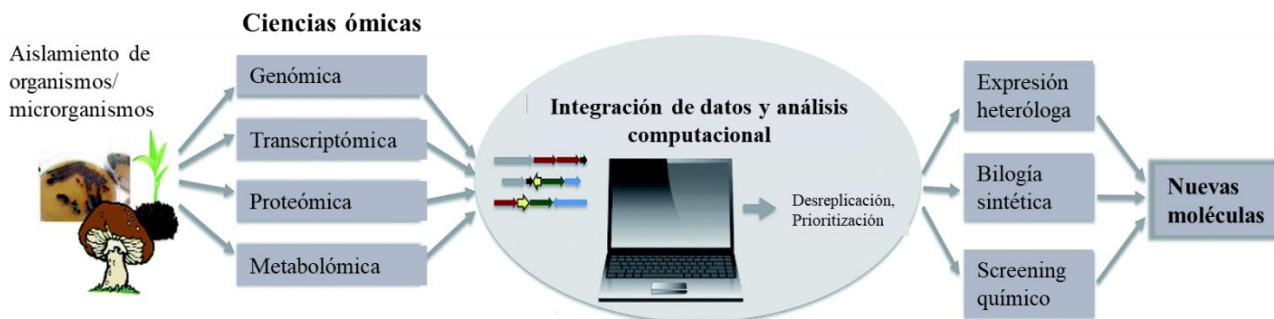
Teniendo en cuenta la importancia de los actinomicetos para la búsqueda de compuestos bioactivos, resulta interesante identificar los genes que codifican para dichos compuestos, además, el creciente número de secuencias del genoma proporciona una herramienta valiosa para identificar compuestos con actividad antimicrobiana (Gomes *et al.*, 2017).

## **Minería de genomas**

Con la finalización del Proyecto del Genoma Humano a principios de la década de 2000 y el desarrollo de nuevas tecnologías, se comenzó a secuenciar de forma masiva el genoma de muchos organismos y en particular de muchos microorganismos. Numerosas herramientas bioinformáticas han aprovechado los datos genómicos cada vez más abundantes para identificar nuevos genes y rutas biosintéticas (Martínez-Klimova *et al.*, 2017; Blin *et al.*, 2019). Los primeros enfoques implementaron técnicas simples de alineación de referencias de BGCs de productos naturales, utilizando programas como BLAST y, a menudo, se combinaron con la curación manual (Altschul *et al.*, 1990).

Uno de los métodos más nuevos es la minería de genomas, iniciado en 2000 (Challis y Ravel 2000). La minería de genomas consiste en utilizar información genética para evaluar el potencial de los microorganismos para la producción de nuevos compuestos naturales. Dicho análisis debe ir seguido de una extensa investigación experimental que incluya las ciencias ómicas para confirmar que el grupo de genes pronosticado produce el metabolito secundario deseado (Foulston, 2019). Esta herramienta, implica el análisis de genomas secuenciados para determinar si en estos organismos se pueden encontrar grupos de genes involucrados en la producción de nuevas moléculas de interés (Scheffler *et al.*, 2013). En consecuencia y debido a la creciente necesidad de la producción de nuevos antibióticos, el estudio del genoma mediante este método, se ha convertido en una estrategia común para encontrar nuevas moléculas antimicrobianas mediante el análisis bioinformático de los clústeres de genes biosintéticos que después puedan expresarse en hospederos prometedores (Guzmán-Trampe *et al.*, 2017).

Una vez que se identifican los BGCs de metabolitos secundarios de interés, las actividades a seguir pueden ser tres: (1) Clonar el BGC predicho y expresarlo en un huésped heterólogo, (2) sintetizar la molécula de interés a través de la biología sintética y (3) identificar la molécula de interés en la cepa nativa a partir de un cribado químico (figura 8) (Ziemert *et al.*, 2016; Foulston, 2019).



**Figura 8.** Descripción esquemática de posibles entradas y predicciones de salida de datos de minería genómica (modificado y traducido de Ziemert *et al.*, 2016).

La manipulación genética de cepas nativas puede ser un gran desafío debido a que la(s) molécula(s) de interés podrían expresarse en niveles bajos, además de estar “enmascarados” por otros productos naturales presentes. Gracias a la minería de genoma se facilita la exploración de fuentes más variadas y exóticas de productos naturales (Zhong *et al.*, 2020). Estas fuentes pueden incluir bibliotecas metagenómicas incluso de bacterias que no son cultivables en el laboratorio. La expresión heteróloga se puede utilizar para superar tales desafíos; el huésped elegido debe ser manejable genéticamente y tener herramientas que permitan la clonación del BGC (Foulston, 2019).

## JUSTIFICACIÓN

La prescripción inadecuada de antibióticos y la automedicación han dado lugar a un alto nivel de resistencia de microorganismos patógenos a los antibióticos. De este modo, se ha convertido en un problema emergente a nivel mundial, representando el principal desafío

sanitario del siglo XXI. En este sentido, la búsqueda de nuevos metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas resulta una estrategia prometedora para hacer frente a la problemática de la resistencia antimicrobiana.

En nuestro grupo de investigación, exploramos los microorganismos endófitos como fuente potencial de nuevos antibióticos. Una forma eficaz de la búsqueda de estas moléculas es la identificación de los genes involucrados en su producción a través de la minería genómica, aun cuando éstos permanezcan silenciados o producidos en muy bajas concentraciones. Por ello, la aplicación de minería genómica en Actinobacterias endófitas, resulta ser una herramienta prometedora en el descubrimiento de nuevos PAMs para el tratamiento de infecciones bacterianas causadas por bacterias resistentes a los antibióticos comunes.

## **HIPÓTESIS**

La aplicación de la minería de genomas a tres actinomicetos endófitos, permitirá la identificación de al menos un clúster biosintético que codifique para un péptido antimicrobiano de interés farmacéutico potencial.

## **OBJETIVO**

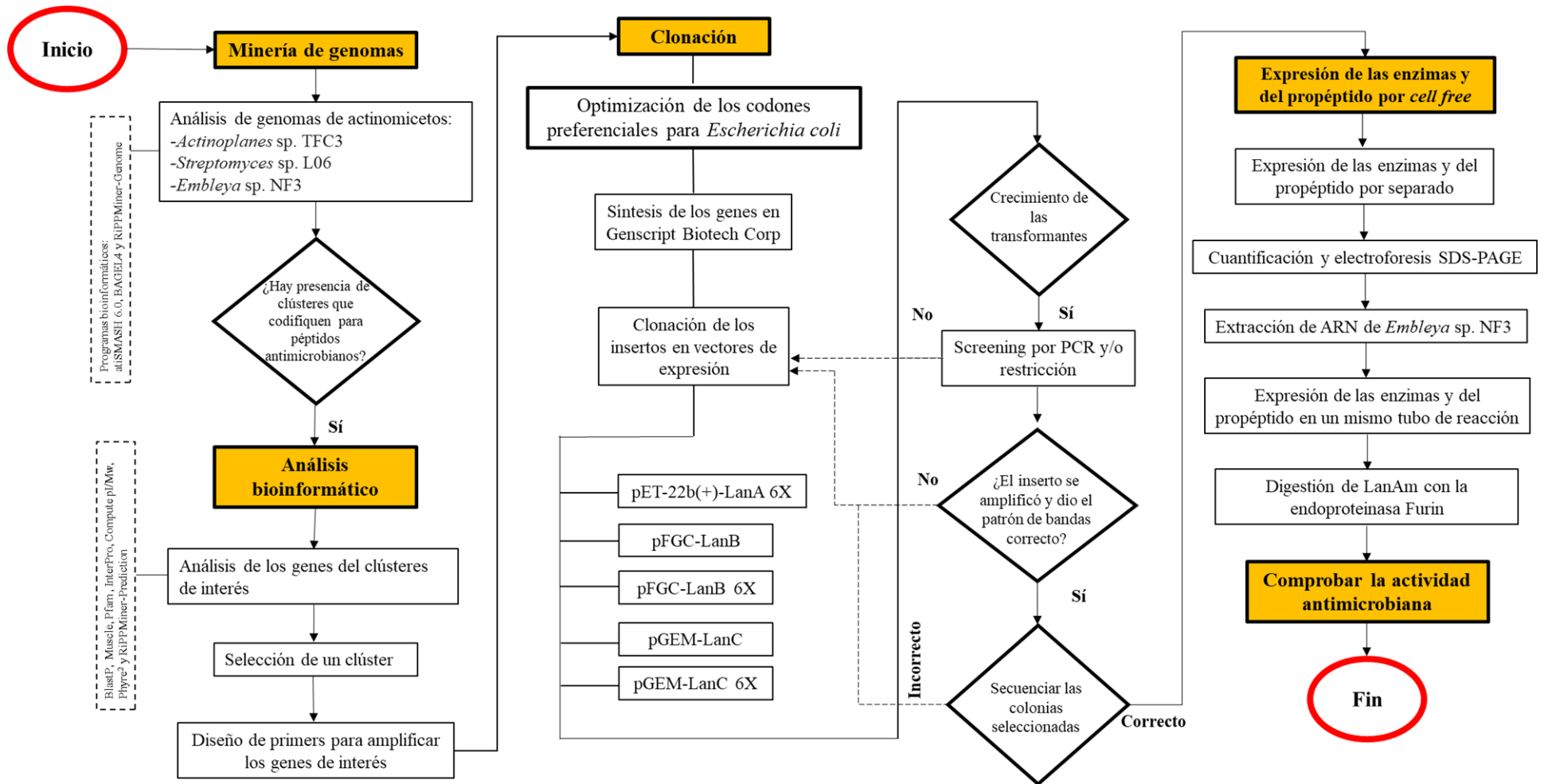
Identificar y caracterizar un clúster biosintético asociado a la producción de un lantipéptido antimicrobiano de una actinobacteria endófito.

### **Objetivos particulares**

- a) Explorar los genomas de *Actinoplanes* sp. TFC3, *Streptomyces* sp. L06 y *Embleya* sp. NF3 para seleccionar un clúster biosintético que potencialmente codifique un péptido con actividad antimicrobiana.
- b) Clonar y expresar de forma heteróloga el clúster biosintético seleccionado.
- c) Comprobar la actividad antimicrobiana del compuesto sintetizado.



# DISEÑO EXPERIMENTAL



# MATERIALES Y MÉTODOS

## Minería de genomas

Para la identificación de clústeres de genes biosintéticos de metabolitos secundarios en los genomas de *Actinoplanes* sp. TFC3, *Streptomyces* sp. L06 y *Embleya* sp. NF3, éstos fueron analizados por medio del programa antiSMASH 6.0 (<https://antismash.secondarymetabolites.org/#!/start>) (Blin *et al.*, 2021), BAGEL4 (<http://bagel4.molgenrug.nl/>) (van Heel *et al.*, 2018) y RiPPMiner-Genome ([http://202.54.226.242/~priyesh/rippminer2/new\\_predictions/index.php](http://202.54.226.242/~priyesh/rippminer2/new_predictions/index.php)) (Agrawal *et al.*, 2021). Las secuencias genómicas fueron introducidas en formato fasta en las tres plataformas de minería genómica antes mencionadas, utilizando los parámetros predeterminados.

## Análisis bioinformáticos

Los genes de los clústeres biosintéticos seleccionados fueron analizados mediante técnicas bioinformáticas para conocer la identidad de cada uno de ellos, así como su función. Los métodos bioinformáticos que se utilizaron se describen a continuación.

InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) (Blum *et al.*, 2021) y Pfam (<https://pfam.xfam.org/>) (Mistry *et al.*, 2021), se utilizaron para conocer los dominios, sitios funcionales y familias a las cuales pertenece la secuencia. Adicionalmente, se realizaron alineamientos locales con BlastP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) (Altschul *et al.*, 1990) para encontrar patrones conservados (dominios o motivos) con otras secuencias reportadas en el NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Paralelamente, se realizaron alineamientos múltiples globales con la plataforma MUSCLE (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) (Madeira *et al.*, 2019) con el objetivo de identificar residuos de aminoácidos catalíticamente importantes de los elementos de la maquinaria de las enzimas del *core* biosintético (LanB y LanC) y del propéptido (LanA).

También se calculó el punto isoeléctrico teórico y el peso molecular de las enzimas del *core* biosintético del clúster biosintético seleccionado, mediante la herramienta Compute pI/Mw

tool de la plataforma ExPasy ([https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/)) (Gasteiger *et al.*, 2005). El punto isoeléctrico de una proteína permite conocer su comportamiento en solución (solubilidad), así, estos datos pueden ser utilizados en experimentos futuros. Conocer el peso molecular de las enzimas permitió deducir su expresión a través de la migración de estas moléculas en geles de proteínas.

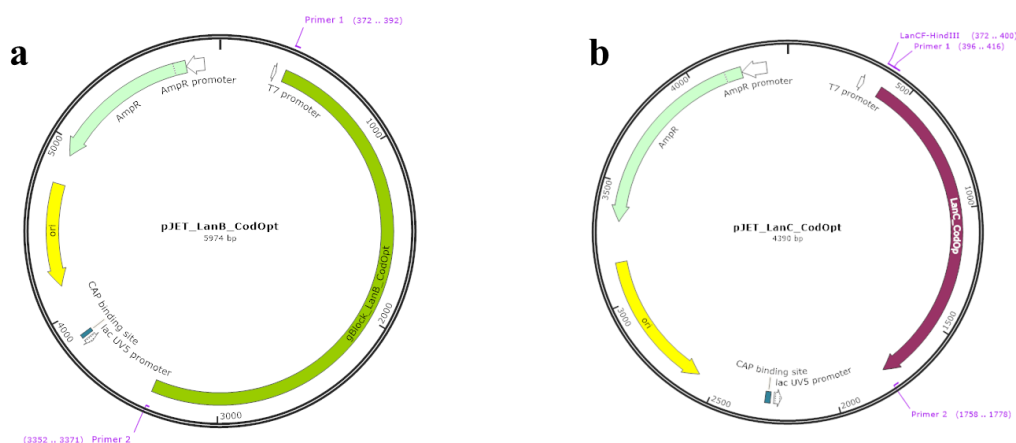
La predicción de la estructura 3D de las enzimas del *core* biosintético del clúster seleccionado fueron modelados por medio del programa Phyre<sup>2</sup> (Protein Homology/analog Y Recognition Engine V 2.0, <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>) (Kelley *et al.*, 2015). La predicción del sitio de corte y la estructura química del propéptido y del principio activo, es decir, LanA modificado y digerido con Furin (LanAm/F) se realizó mediante RiPPMiner-Prediction ([http://www.nii.ac.in/~priyesh/lantipepDB/new\\_predictions/index.php](http://www.nii.ac.in/~priyesh/lantipepDB/new_predictions/index.php)).

## **Selección del clúster biosintético de interés**

Para la selección del clúster biosintético de interés se consideraron los siguientes criterios: ser de tipo I o II, ya que se ha reportado que estos lantipéptidos tienen actividad antimicrobiana (Ongey y Neubauer, 2016; Repka *et al.*, 2017) (cuadro 1), tener las enzimas del *core* biosintético completos (como LanB y LanC para los de clase I o LanM para los de clase II), con los motivos y aminoácidos conservados, en el caso de LanC o el dominio ciclasa de LanM tener la triada catalítica de unión a ligandos de zinc. Para el propéptido (LanA), se debe identificar el péptido líder y el péptido *core*, en el caso de los lantipéptidos de clase I, contienen un motivo conservado en el péptido líder que también se debe identificar y de preferencia, se elegirá el lantipéptido que, de acuerdo a la predicción de su estructura, contenga el mayor número de modificaciones postraduccionales, ya que se ha reportado que entre más modificaciones postraduccionales contiene en su estructura será más estable frente a la degradación por proteasas y por calor (van Heel *et al.*, 2018).



Los codones de los genes *lanB* (figura 10a) y *lanC* (figura 10b) también fueron optimizados con los codones preferenciales para *E. coli* y sintetizados en el vector pJET 1.2, ambos genes contienen sitios de reconocimiento para *BsaI* en ambos extremos (N-terminal y C-terminal) para llevar la clonación por la técnica de Golden Gate, las construcciones fueron denominadas pJET\_LanB\_CodOpt y pJET\_LanC\_CodOpt (figura 10).



**Figura 10.** Construcciones pJET\_LanB\_CodOpt y pJET\_LanC\_CodOpt que contiene los genes *lanB* (a) y *lanC* (b) con codones optimizados para *E. coli*, sintetizado por la empresa Integrated DNA Technologies.

## Diseño de Primers

Se diseñaron primers de forma manual para amplificar por medio de la técnica PCR los genes optimizados *lanA*, *lanB* y *lanC* contenidos en los vectores sintetizados. Esto se realizó con la finalidad de obtener varias copias para subclonarse en vectores de expresión. También se diseñaron primers para secuenciar el fragmento *lanB* debido a que presentaba un tamaño mayor a 1.5 kb, lo cual no fue posible secuenciar con solo un par de primers. Los parámetros de contenido de GC y temperatura de fusión ( $T_m$ , por sus siglas en inglés) fueron calculados con el programa OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>). En el siguiente cuadro se muestran los primers que se usaron en este trabajo (cuadro 2).

**Cuadro 2.** Secuencia de los primers utilizados en este trabajo

|  | Primers         | Secuencia 3' →5'  |
|--|-----------------|---|
| Amplificación por PCR del gen <i>lanA</i> y secuenciación    | T7 Promotor F   | TAATACGACTCACTATAGGG  |
|  | T7 Terminador R | GCTAGTTATTGCTCAGCGG   |
| Amplificación por PCR de los genes <i>lanB</i> y <i>lanC</i> | FLanB           | ttggtctcgAATGCGCCATTCCGAGCACGAGCACGGGCGCGGCGATG<br>GCCCCGCATGAAGGCTATGACGACGCCCGCGGAGATGAAGATAC<br>ATACCGTCCTGCCGCCCCATCTTTGTTTCGTATGGCTAGC     |
|  | RLanB           | ttggtctcgaagcTCATCCATCATCGCGACGGTCACCTTCAACATCAGT<br>AGGCCACTGGCGTGGAGGGTGTGCCAAGCGGCCAAGATGATCA<br>CTAGCGATGCCGCGTAAGATGGCATATCCACGACCCTCACTAG |
|  | FLanC           | ttggtctcgAATGACTGACGAGCGCCGTACC   |
|  | RLanC           | ttggtctcgAAGCTCAAGCTACCATCAGGACACG  |
| Secuenciación  | F1-LanB6XS      | AGT CGC GTG GAC GTG GTA TTA   |
|  | R1-LanB6XS      | GTA ACG GTC GGT TTC CGG TTC ATA GAC   |
|  | F2-LanB6XS      | AGT GGA CTT ACG CAT GGA CGC   |
|  | R2-LanB6XS      | CAT CTC ATG GCG AAG TAA CGT GCG   |

### Amplificación de los genes *lanA*, *lanB* y *lanC* por PCR

Como se mencionó anteriormente, los fragmentos optimizados *lanA*, *lanB* y *lanC* fueron amplificados por PCR. Todas las amplificaciones se llevaron a cabo mediante la siguiente reacción: se utilizaron aproximadamente 150 ng de ADNp (se usaron los plásmidos sintetizados por la empresa IDT, figuras 9 y 10), 5 µl del buffer 10X, 1.5 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 1 µl de dNTPs 2.5 mM c/u, 2 µl del oligonucleótido *Forward* 10 pM/µl, 2 µl del oligonucleótido *Reverse* 10 pM/µl y 0.2 µl de la enzima Platinum™ Taq DNA Polymerase® de Invitrogen de 500 U, la reacción se completó con agua libre de nucleasas a un volumen final de 50 µl.

**Cuadro 3.** Condiciones de reacción para la amplificación del gen *lanA* por medio de PCR

| Pasos                      | Ciclos | Temperatura (°C) | Tiempo |
|----------------------------|--------|------------------|--------|
| Desnaturalización inicial* | 1      | 95               | 2 min  |
| Desnaturalización          | 25     | 95               | 30 seg |
| Alineamiento               | 25     | 48               | 30 seg |

|                 |    |    |       |
|-----------------|----|----|-------|
| Extensión       | 25 | 72 | 5 min |
| Extensión final | 1  | 72 | 7 min |
| Finalización    | -  | 4  | ∞     |

\*Cuando se realizó PCR de colonia, el tiempo de desnaturalización inicial fue de 5 min

**Cuadro 4.** Condiciones de reacción para la amplificación del gen *lanB* por medio de PCR

| Pasos                     | Ciclos | Temperatura (°C) | Tiempo  |
|---------------------------|--------|------------------|---------|
| Desnaturalización inicial | 1      | 95               | 2 min   |
| Desnaturalización         | 25     | 95               | 45 seg  |
| Alineamiento              | 25     | 56               | 45 seg  |
| Extensión                 | 25     | 72               | 3.5 min |
| Extensión final           | 1      | 72               | 5 min   |
| Finalización              | -      | 4                | ∞       |

**Cuadro 5.** Condiciones de reacción para la amplificación del gen *lanC* por medio de PCR

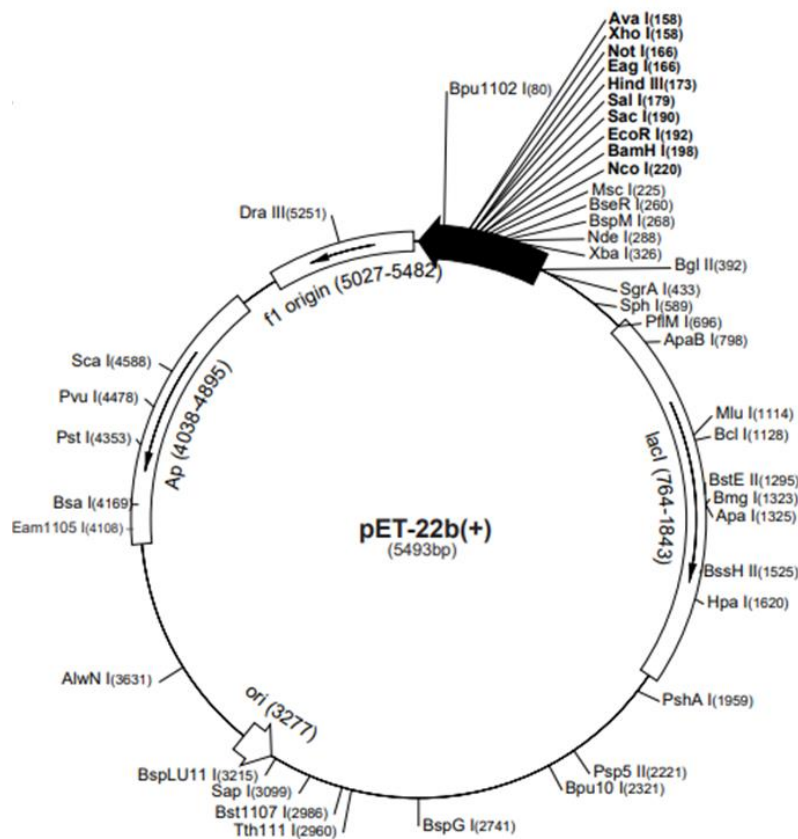
| Pasos                     | Ciclos | Temperatura (°C) | Tiempo |
|---------------------------|--------|------------------|--------|
| Desnaturalización inicial | 1      | 95               | 2 min  |
| Desnaturalización         | 25     | 95               | 45 seg |
| Alineamiento              | 25     | 54               | 45 seg |
| Extensión                 | 25     | 72               | 2 min  |
| Extensión final           | 1      | 72               | 5 min  |
| Finalización              | -      | 4                | ∞      |

## Purificación de los productos de PCR amplificados

Una vez que los fragmentos *lanA*, *lanB* y *lanC* fueron amplificados por PCR, éstos fueron purificados por medio de del kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System siguiendo las recomendaciones del fabricante.

## Vectores de expresión utilizados

Se utilizaron 3 vectores de expresión. Para expresar al propéptido LanA\_6X se utilizó el vector pET-22b(+) (figura 11), este vector (Cat. No. 69744-3) lleva una secuencia de señal pelB N-terminal para una localización periplásmica potencial, además de una secuencia opcional His-Tag® C-terminal. Tiene el promotor T7, que se origina en el bacteriófago T7, la fuerza de este promotor está determinada principalmente por la afinidad de la secuencia promotora por la ARN polimerasa T7, lo que da como resultado una alta frecuencia de iniciación de la transcripción y una elongación eficaz. Estas características dan como resultado una elongación del ARN que es aproximadamente cinco veces más rápida que la de la ARN polimerasa de *E. coli*; por lo tanto, el promotor T7 es un promotor mucho más fuerte que los promotores de *E. coli* (Tegel *et al.*, 2011). Tiene un peso de 5493 pb, se deriva del plásmido pBR322 y tiene el origen de replicación f1, contiene resistencia a ampicilina, es de bajo número de copias (~40 copias por célula) y es inducible por IPTG (Novagen, [https://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/PEPF/pET\\_vectors/pET-22b\\_map.pdf](https://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/PEPF/pET_vectors/pET-22b_map.pdf)).



**Figura 11.** Mapa del vector pET-22b(+) (Novagen, [https://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/PEPF/pET\\_vectors/pET-22b\\_map.pdf](https://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/PEPF/pET_vectors/pET-22b_map.pdf)).



Para expresar las enzimas del *core* biosintético, LanC y LanB, se utilizaron 2 vectores de expresión. El vector pFGC y el vector pFGC\_6XHis, ambos vectores fueron proporcionados amablemente por el Dr. Fernando Guzmán Chávez (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM). Estos vectores están diseñados con la finalidad de ser utilizados en la clonación Golden Gate, un método muy confiable que permite la clonación de uno o varios fragmentos de ADN al mismo tiempo (hasta 9 fragmentos) en un solo microtubo de reacción (Engler y Marillonnet, 2013).

El vector pFGC (figura 12), tiene un peso de 3748 pb, contiene un promotor fuerte T7, su origen de replicación es PMB1, es de bajo número de copias (~20 copias por célula), como marcador de selección contiene resistencia a kanamicina, es inducido por IPTG, su sitio múltiple de clonación contiene enzimas de tipo II y tipo IIS, éstas últimas son usadas para realizar la clonación por Golden Gate, a diferencia de las tipo II, los dominios de escisión de tipo IIS no tienen una especificidad de secuencia inherente, por lo que la secuencia del saliente que generan varía de un sitio de reconocimiento a otro, reconocen secuencias no palindrómicas, 4-7 pb y hasta 20 pb de distancia (New England, BioLabs Inc., <https://international.neb.com/tools-and-resources/feature-articles/everything-you-ever-wanted-to-know-about-type-ii-restriction-enzymes>).





- 1 ml de NaCl 1M
- 0.25 ml de KCl 1M
- 1 ml de una solución stock de MgCl<sub>2</sub> 2M, estéril
- 1 ml de una solución de glucosa 2M glucosa, esterilizado
- pH 7.0

Medio 2xYT para 1000 ml

- 16 g de Bacto®-Tryptona
- 10 g de Bacto®-Extracto de levadura
- 5 g de NaCl
- pH 6.5-7.5

Medio TBS para 1000 ml:

- 17.0 g de Bacto®-Tryptona
- 3.0 g de Bacto®-Extracto de soya
- 2.5 g de Glucosa
- 5.0 g de NaCl
- 2.5 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- Cuando se realizaron placas se agregó agar bacteriológico al 15 %
- pH 7.3 ± 2

### **Clonación de *lanA* en pET-22b(+)**

El fragmento *lanA* amplificado por PCR a partir de la construcción sintética pUCIDT-HisTag-LanA(Furin) y posteriormente purificado, fue digerido con las enzimas *NdeI* y *EcoRI*. El vector de expresión pET-22b(+) también fue digerido con las mismas enzimas. Posteriormente, el inserto fue purificado como producto de PCR y el vector fue purificado a partir de un gel de agarosa. El inserto y el vector fueron agregados a una reacción de ligación, en relación 3:1 (inserto: vector), utilizando la enzima T4 DNA ligasa (Promega), llevando a cabo las condiciones establecidas por el fabricante. El resultado de la construcción fue denominado pET-22b(+)-LanA\_6X y el producto de expresión de la construcción fue denominado LanA\_6X (propéptido).

## Clonación de *lanB* y *lanC* en pFGC y pFGC\_6XHis por Golden Gate

Los fragmentos *lanB* y *lanC* amplificados por PCR y purificados, fueron clonados por medio de la técnica Golden Gate, la cual consistió en una reacción que contenía el inserto purificado, el vector de expresión receptor, 0.5 µl la enzima *BsaI* de NEB® (el sitio de restricción *BsaI* está presente tanto en los insertos como en el plásmido receptor), 1 µl la enzima T4 (Promega), 1.5 µl del buffer 10X de la enzima de T4 y se completó con agua mQ estéril hasta un volumen de 15 µl. Para obtener el volumen del vector y del inserto para añadirse a la mezcla de reacción, estos fueron calculados mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Vol } (\mu\text{l}) = (\text{X fmol} * \text{Tamaño (bp)}) / [\text{Concen}] (\text{ng}/\mu\text{l}) / 1520$$

X: para el vector 10, para el inserto 20 fmol

A continuación, se muestran las condiciones de reacción para llevar a cabo la clonación de los insertos en los vectores de expresión.

**Cuadro 6.** Condiciones de reacción para llevar a cabo la clonación de los insertos *lanB* y *lanC* en los vectores de expresión por medio de Golden Gate

| Pasos               | Ciclos | Temperatura (° C) | Tiempo (min) |
|---------------------|--------|-------------------|--------------|
| Restricción inicial | 1      | 37                | 4            |
| Restricción         | 33     | 37                | 2            |
| Ligación            | 33     | 16                | 3            |
| Restricción final   | 1      | 37                | 4            |
| Inactivación        | 1      | 80                | 10           |
| Finalización        | -      | 12                | ∞            |

Las construcciones resultantes del vector pFGC fueron denominadas pFGC-LanB y pFGC-LanC y el resultado del producto de expresión de las construcciones fueron denominados LanB y LanC, respectivamente.

Las construcciones resultantes del vector pFGC\_6XHis fueron denominadas pFGC\_6XHis-LanB y pFGC\_6XHis-LanC y el resultado del producto de expresión de las construcciones fueron denominados LanB\_6X y LanC\_6X, respectivamente.

## **Preparación de células competentes**

Se prepararon células competentes bajo el método descrito por Tang *et al.*, 1994 con algunas modificaciones, para lo cual se emplearon células *E. coli* JM109 con el genotipo: recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rK<sup>-</sup>,mK<sup>+</sup>), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacIq ZΔM15].

Una colonia fue inoculada en 5 ml de caldo LB. Se dejó crecer a 37 °C, a 200 rpm toda la noche (16-20 h), del preinóculo se tomaron 2 ml y se inocularon en 10 ml de medio LB, se incubó a 37 °C a 200 rpm hasta alcanzar una DO<sub>600nm</sub> entre 0.3-0.7. Una vez alcanzada la DO los tubos se pusieron en hielo y el cultivo fue centrifugado a 3,000 g por 5 min a 4 °C y desechar el sobrenadante de manera estéril, los tubos fueron colocados en hielo. Luego se realizó el lavado del sedimento con 5 ml de una solución 80 mM de CaCl<sub>2</sub> y 50 mM de MgCl<sub>2</sub>, la mezcla de lavado se incubó en hielo por 30 min y se centrifugó a 3,000 g por 5 minutos a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Finalmente, por cada ml de cultivo se agregaron 160 μl de la solución de 80 mM de CaCl<sub>2</sub> y 50 mM de MgCl<sub>2</sub> y 40 μl de glicerol. Las células competentes fueron conservadas a -70 °C.

## **Transformación**

Una vez los insertos fueron ligados en los vectores correspondientes, estas construcciones fueron transformados en *E. coli* JM109 mediante el protocolo de Froger y Hall, 2007 (con pequeñas modificaciones), el cual consistió en centrifugar los microtubos de la reacción de

ligación, tomar todo el contenido de cada microtubo y pasarlo a un microtubo nuevo de 1.5 ml y colocarlo en hielo. Posteriormente, agregar cuidadosamente 50  $\mu$ l de células competentes *E. coli* JM109 a cada microtubo y dejarlo en hielo por 20 min, pasado el tiempo de incubación en hielo, colocar los microtubos a 42 °C durante 45 segundos (choque térmico) y luego volver a colocar los microtubos en hielo de 2 a 5 min. A cada microtubo se le añadieron 950  $\mu$ l de medio SOC y las células transformadas se incubaron a 37 °C durante 1 h con agitación.

El cultivo fue sembrado en placas LB con los antibióticos requeridos y posteriormente, se recuperaron las colonias individuales para su posterior análisis. Las placas fueron incubadas a 37 °C por 18 h.

### **Extracción de ADNp**

El ADNp se extrajo por medio del protocolo de lisis alcalina de Birnboim y Doly 1979, realizando algunas modificaciones. El cultivo celular (16-18 h) se centrifugó a 12,000 g por 3 min, posteriormente, se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 1 ml de solución I (sacarosa 8 %, Tris-HCl 0.05 M y EDTA 0.05 M a pH 8.0) en frío y se mezcló en el vórtex. La mezcla se centrifugó a 16,000 g por 1 min y se eliminó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 150  $\mu$ l de la solución I y se agregó ARNasa a una concentración final de 2 mg/ml por ml de cultivo, agitando vigorosamente en el vórtex e incubando 30 min o más a 37 °C. Posteriormente, se agregaron 300  $\mu$ l de la solución II, recién preparada (SDS 1 %, NaOH 0.2 N) y se mezcló por inversión de 5 a 6 veces, se dejó incubando en hielo por 10 min. Luego se agregaron 200  $\mu$ l de la solución fría III (acetato de sodio anhidro 3 M a pH 4.8) y nuevamente se mezcló por inversión de 5 a 6 veces, se dejó incubando en hielo por 10 min. La mezcla se centrifugó a 16,000 g a temperatura ambiente. Se recuperó el sobrenadante por decantación en un microtubo nuevo y se desechó la pastilla (pellet). El sobrenadante recuperado se lavó con un volumen igual de fenol-cloroformo (1:1) y se centrifugó a 16,000 g por 10 min. El sobrenadante fue recuperado con mucho cuidado, sin tocar la interfaz entre la mezcla de fenol-cloroformo en un microtubo nuevo y se lavó con 600-800  $\mu$ l de isopropanol, agitando por inversión 6 veces. Inmediatamente se centrifugó 10 min por 16,000

g. El sobrenadante se eliminó por decantación y la pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 70 %, mezclando por inversión 6 veces. Se centrifugó a 16,000 g por 10 min y se eliminó el sobrenadante, se dejó secar la pastilla en un concentrador al vacío por 5 min. El ADNp se resuspendió en 50 µl de agua mQ estéril.

## **Extracción de ARN total**

Estudios bioquímicos y estructurales recientes, revelaron que NisB de *Lactococcus lactis* (involucrado en la biosíntesis de la nisina), glutamila las cadenas laterales Ser/Thr como parte del proceso de deshidratación (Ortega *et al.*, 2015). En otro estudio se informó que MibB de *Microbispora* sp. 107891 (involucrado en la biosíntesis de NAI-107), también glutamila las cadenas laterales de Ser/Thr (Ortega *et al.*, 2016). El glutamato se transfiere desde glutamil-ARNtGlu a cadenas laterales Ser/Thr seleccionadas dentro del péptido precursor (LanA) dando lugar a una serie de intermediarios glutamilados (Garg *et al.*, 2013, Ortega *et al.*, 2015). Las bases del tallo del aceptor de ARNt son importantes para el reconocimiento por parte de las enzimas LanB, lo cual establece una condición para todas las enzimas LanB de tipo I (Ortega *et al.*, 2016), por ello, es de importancia incluir ARNt en la reacción *in vitro* para la generación de LanAm.

La adición de ARNt a las reacciones *in vitro* se agregó en forma de ARN total. El ARN total se extrajo por medio del método de Maes y Messens (1992), con algunas modificaciones: Se pesaron 200-300 mg de micelio deshidratado, con la ayuda de un mortero y un pistilo fue finamente triturado. Se agregaron 5 ml de la solución de acetato de sodio (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>) 20 mM + EDTA 1 mM a pH 5.5. La mezcla se transfirió a un tubo de centrífuga de 15 ml y se agregaron 500 µl de SDS 10 %. Posteriormente, se adicionaron 5 ml de fenol ácido (equilibrado con agua). Los tubos fueron agitados a 70 °C por 10 min, inmediatamente fueron enfriados en un baño de hielo seco con etanol hasta la aparición de cristales, luego los tubos fueron centrifugados a 15,000 g por 10 min a 4 °C. Después de centrifugar, se recuperó la fase acuosa y se realizó la extracción 2 veces más, adicionando 1 volumen de fenol ácido (equilibrado con agua) a la fase acuosa recuperada y la última extracción se realizó con cloroformo (omitiendo el paso de incubar a 70 °C). Al sobrenadante recuperado se le



agregaron 0.1 volumen de acetato de sodio 3 M, pH 7 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto. Los tubos fueron incubados a -70 °C durante toda la noche y al día siguiente fueron centrifugados a 15,000 g por 15 min a 4 °C. La pastilla fue lavada 2 veces con etanol al 70 % y finalmente fue resuspendido en 50 µl de agua mQ.

### **Análisis de restricción para confirmar las clonas positivas**

Se utilizaron las siguientes enzimas: *NdeI*, *EcoRI*, *EcoRV* y *KpnI*, todas son de la casa comercial New England Biolabs (NEB), siguiendo las recomendaciones de reacción del fabricante. Las restricciones de diagnóstico (para corroborar clonas positivas) se llevaron a cabo a 37 °C por 1 h y para las restricciones de los fragmentos y vectores a clonar se incubaron hasta de 16 h. Las enzimas se inactivaron a 65 °C por 20 min.

### **Electroforesis de ácidos nucleicos**

La visualización de la calidad, integridad, así como el tamaño de los fragmentos se llevaron a cabo en un gel de agarosa al 0.8 %, el gel se tiñó previamente con bromuro de etidio y los ácidos nucleicos se corrieron a 80 V de 1 a 1.5 h, según el tamaño de los fragmentos. Se utilizó el marcador Invitrogen™ de 1 kb Plus.

### **Verificación de la orientación correcta**

Una vez que se llevaron a cabo los análisis de restricción de las construcciones para verificar si contenían el inserto, las construcciones fueron enviadas a secuenciar al Instituto de Fisiología Celular, UNAM para corroborar que los fragmentos estuvieran clonados dentro del vector de expresión, en la orientación correcta y que la secuencia esté sin mutaciones.

### **Expresión de los genes de interés por *cell-free***

## Preparación del extracto celular *Escherichia coli* BL21 Star

Un sistema *cell-free* es una herramienta que aprovecha la maquinaria de transcripción y traducción de las células vivas y, en consecuencia, puede realizar los procesos fundamentales del dogma central (ADN→ARN→proteína) para permitir la síntesis de proteínas *in vitro*. Debido a que la síntesis de proteínas ocurre en los lisados celulares en lugar de dentro de las células cultivadas, se denomina *cell-free*. Se necesitan dos componentes básicos para lograr la expresión de proteínas *in vitro*: (1) el molde genético (ARNm o ADN) que codifica la proteína de interés y (2) los extractos celulares que contiene la maquinaria molecular transcripcional y traduccional necesaria (Garenne *et al.*, 2021).

La preparación de los extractos celulares se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Guzmán-Chávez *et al.*, 2022, para ello, se inocularon 5 µl de stock de glicerol *E. coli* BL21 Star (Invitrogen, C601003) en 5 ml de medio 2xYT. El precultivo se hizo crecer durante 8 h a 37 °C con agitación de 200 rpm. Posteriormente, se inocularon 50 ml de medio 2xYT con 30 µl de precultivo en un matraz de 250 ml y se cultivaron a 37 °C con agitación vigorosa (200 rpm). Al día siguiente, se utilizó el precultivo de fase estacionaria para inocular 400 ml de medio 2xYT suplementado con 18 g/l de D-glucosa en un matraz Tunair con deflectores de 2.5 L (Sigma-Aldrich, Z710822), dando una densidad óptica inicial ( $DO_{600nm}$ ) de 0.05. Los cultivos se crecieron a 37 °C con agitación (200 rpm) hasta que la  $DO_{600nm}$  alcanzó 0.5 (aproximadamente 2.5 h), y luego las células se indujeron con 400 µl de IPTG 1 M. Las células se recogieron en fase exponencial a una densidad óptica ( $DO_{600nm}$ ) de 2.0 mediante centrifugación a 5000 g a 4 °C durante 12 min. Los sedimentos se lavaron tres veces con tampón S30A (base Tris 50 mM, glutamato de magnesio 14 mM, glutamato de potasio 60 mM, DTT 2 mM, pH 7.7 ajustado con ácido acético 1:1). Posteriormente, el sedimento se pesó y resuspendió en 0.9 ml de tampón S30B (base Tris 5 mM, glutamato de magnesio 14 mM, glutamato de potasio 60 mM, ditiotreitól 1 mM, pH 8.2 ajustado con ácido acético 1:1) por gramo de sedimento. La suspensión celular se distribuyó en alícuotas de 1 ml en microtubos de 1.5 ml y luego se lisó mediante un sonicador QSonica Q125 con una sonda de 3.175 mm de diámetro, a una frecuencia de 20 kHz y una amplitud del 50 % por 10 pulsos de encendido/apagado por un total de 60 s. El lisado se centrifugó durante 10 min a 4 °C y 10,000 g. Para clarificar los extractos celulares, los sobrenadantes se centrifugaron por

segunda vez durante 15 min a 4 °C a 12,000 g. Finalmente, los extractos crudos se agruparon, se complementaron con 1 mM de DTT y se dividieron en alícuotas, las alícuotas se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se guardaron a -70 °C.

## Expresión de los genes por separado

Las reacciones expresión por *cell-free* BL21 Star del propéptido LanA\_6X y de las enzimas LanB, LanC, LanB\_6X y LanC\_6X se llevaron a cabo en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml, cada una de las construcciones se expresó de forma individual. A continuación, en los cuadros 7 y 8 se muestra los componentes y el volumen que se utilizó en cada una de las reacciones, las cuales tuvieron como volumen final 12 µl, esta cantidad ya está estandarizada para cada microtubo (Guzmán-Chávez *et al.*, 2022). Para la expresión del propéptido LanA\_6X y de las enzimas LanB y LanB\_6X los componentes se muestran en el cuadro 7, mientras que la expresión de la enzima LanC y LanC\_6X se muestran en el cuadro 8. La enzima LanC requiere de ligandos de Zinc para llevar a cabo el proceso de ciclación (Zhang *et al.*, 2012) por ello, fue agregado en la reacción de expresión *cell-free*.

Todos los plásmidos fueron llevados a una concentración final de 20 nM, como control positivo se utilizó la proteína mScarlet, esta proteína, durante su expresión emite un color rosa visible en el microtubo de reacción, como control negativo se usaron los plásmidos vacíos correspondientes. Los microtubos de reacción muy bien homogenizados, fueron colocados a 29 °C por 14 h.

Es importante mencionar que cuando el propéptido LanA\_6X y las enzimas LanB\_6X y LanC\_6X fueron purificados por columnas de Ni-NTA Spin Kit Handbook Quiagen®, se colocaron 20 microtubos de reacción.

**Cuadro 7.** Componentes para llevar la expresión del propéptido LanA\_6X y la enzima LanB\_6X por separado por *cell-free*

| 1 microtubo de reacción |              |
|-------------------------|--------------|
| Componentes             | Volumen (µl) |
| Extracto celular        | 4            |

|               |     |
|---------------|-----|
| Mix 4X Wizard | 3   |
| ADNp (20 nM)  | 3   |
| 40% PEG-8000  | 0.6 |
| Agua mQ       | 1.4 |
| Volumen final | 12  |

**Cuadro 8.** Componentes para llevar la expresión de la enzima LanC\_6X por *cell-free*

| <b>1 microtubo de reacción</b> |                     |
|--------------------------------|---------------------|
| <b>Componentes</b>             | <b>Volumen (µl)</b> |
| Extracto celular               | 4                   |
| Mix 4X Wizard                  | 3                   |
| ADNp (20 nM)                   | 3                   |
| 40% PEG-8000                   | 0.6                 |
| ZnCl <sub>2</sub> (100 µM)     | 1.2                 |
| Agua mQ                        | 0.2                 |
| Volumen final                  | 12                  |

## SDS-PAGE

La electroforesis en gel SDS-PAGE se utiliza para separar proteínas con una masa molecular relativa no inferior a 10 kD. Las proteínas menores a 10 kD son difíciles de resolver debido a la baja capacidad de unión a SDS, que puede resolverse mediante geles de gradiente o usando diferentes condiciones de electroforesis, como Tricina SDS-PAGE (Laemmli, 1970; He, 2011). Para las enzimas LanB y LanB\_6X se utilizaron geles al 10 % de acrilamida/bisacrilamida, mientras que para las enzimas LanC y LanC\_6X se corrieron geles al 11 % de acrilamida/bisacrilamida, cuando LanB, LanB\_6X, LanC y LanC\_6X fueron separadas electroforéticamente en el mismo gel, éste se realizó a una concentración de 10.5 % de acrilamida/bisacrilamida. Para el propéptido LanA\_6X, se usaron geles al 16 % (cuadro 9).

Se utilizó como marcador de peso molecular PageRuler Plus Prest Protein Ladder, de la casa comercial Thermo Scientific<sup>TM</sup>, se colocaron 4 µl del marcador y 18 µg de proteínas del extracto crudo *cell-free* y de la fracción no unida a la columna Ni-NTA Spin Kit Handbook

Quiagen®. De los lavados y de las eluciones de las enzimas purificadas LanB\_6X y LanC\_6X se colocaron 10 µl de cada uno.

Inicialmente, los geles fueron corridos electroforéticamente a 70 V, una vez que las muestras cruzaban la parte del gel apilador, se aumentó el voltaje a 90 V por aproximadamente 1.5 h. Los geles fueron teñidos con solución de azul de Coomassie (1 g de azul de Coomassie R-250; 100 ml de ácido acético, 400 ml de metanol, 500 ml de agua destilada) por 2 h y posteriormente, fueron desteñidos toda la noche con solución decolorante (100 ml de ácido acético, 400 ml de metanol, 500 ml de agua destilada).

**Cuadro 9.** Composición para un gel SDS-PAGE de 0.75 mm a diferentes concentraciones de acrilamida/bisacrilamida

| <b>Componentes</b>                   | <b>Gel apilador<br/>4 %</b> | <b>Gel separador<br/>10 %</b> | <b>Gel separador<br/>10.5 %</b> | <b>Gel separador<br/>11 %</b> | <b>Gel separador<br/>16 %</b> |
|--------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Acrilamida/bisacrilamida (29:1) 40 % | 150 µl                      | 1.25 ml                       | 1.31 ml                         | 1.375 ml                      | 2 ml                          |
| Tris 1 M pH (6.8)                    | 187 µl                      | -                             | -                               | -                             | -                             |
| Tris 1.5 M pH (8.8)                  | -                           | 1.25 ml                       | 1.25 ml                         | 1.25 ml                       | 1.25 ml                       |
| SDS 20 %                             | 3.75 µl                     | 25 µl                         | 25 µl                           | 25 µl                         | 25 µl                         |
| Agua mQ                              | 1.138 ml                    | 2.42 ml                       | 2.36 ml                         | 2.295 ml                      | 1.67 ml                       |
| Persulfato de amonio 10 %            | 15 µl                       | 50 µl                         | 50 µl                           | 50 µl                         | 50 µl                         |
| TEMED                                | 1.5 µl                      | 5 µl                          | 5 µl                            | 5 µl                          | 5 µl                          |
| <b>Volumen final</b>                 | 1.5 ml                      | 5 ml                          | 5 ml                            | 5 ml                          | 5 ml                          |

## **Cuantificación de proteínas por Bradford**

La cuantificación de las proteínas se llevó a cabo mediante el método de Bradford (Kruger, 2009), utilizando el reactivo Bradford de Bio-Rad Protein Assay. Las lecturas se realizaron en microplacas de 96 pozos, colocando 10 µl de muestra y 200 µl del reactivo Bradford, las muestras se incubaron por 15 min en oscuridad y se leyeron a 595 nm en un

espectrofotómetro para placas Multiskan FC de Thermo Scientific™. Se cuantificaron las proteínas del extracto crudo *cell-free* y las purificaciones de las enzimas LanB\_6X y LanC\_6X para cargar la misma cantidad en los geles de proteínas.

La curva patrón se realizó con diferentes concentraciones de BSA, partiendo de una solución stock de 500 µg/ml, los datos de las lecturas fueron graficados y se obtuvo la ecuación de la recta para calcular la concentración de las muestras a analizar. Todas las muestras se realizaron por triplicado y se reportó el promedio.

### **Purificación por His-Tag**

El propéptido LanA\_6X y las enzimas que contienen la etiqueta His-Tag (LanB\_6X y LanC\_6X), fueron purificados para concentrarlos y observar su expresión por medio de su peso molecular los en los geles corridos electroforéticamente. La purificación se realizó por medio del Kit Ni-NTA Spin Kit Handbook Quiagen®, siguiendo el protocolo Protein Purification under Native Conditions from *E. coli* Cell Lysates (<https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=3fc8c76d-6d21-4887-9bf8-f35f78fcc2f2&lang=en>).

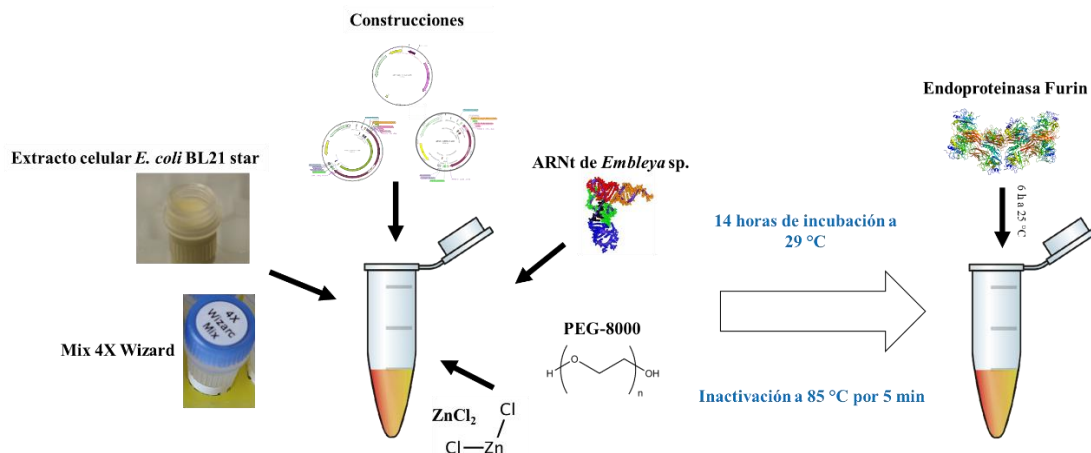
### **Expresión del principio activo (LanAm/F)**

Las construcciones pET-22b(+)-LanA\_6X, pFGC\_6XHis-LanB y pFGC\_6XHis-LanC fueron colocadas en una misma mezcla de reacción (mismo microtubo de reacción), junto con el ARN total de *Embleya* sp. NF3 y el ZnCl<sub>2</sub>, así como todos los demás componentes en un microtubo de 1.5 ml para llevar a cabo las modificaciones postraduccionales del precursor del principio activo (cuadro 10).

**Cuadro 10.** Componentes para expresar a las proteínas LanA\_6X, LanB\_6X y LanC\_6X en el mismo microtubo de reacción y simultáneamente llevar a cabo las modificaciones del propéptido (LanAm)

| <b>1 microtubo de reacción</b>              |                     |
|---|---------------------|
| <b>Componentes</b>                          | <b>Volumen (μl)</b> |
| Extracto celular                            | 4                   |
| Mix 4X Wizard                               | 3                   |
| pET-22b(+)-LanA_6X (20 nM)                  | 1                   |
| pFGC_6XHis-LanB (20 nM)                     | 1                   |
| pFGC_6XHis-LanC (20 nM)                     | 1                   |
| 40% PEG-8000                                | 0.6                 |
| ZnCl <sub>2</sub> (300 μM)                  | 0.4                 |
| ARN total <i>Embleya</i> sp. (1500-2000 ng) | 1                   |
| <b>Volumen final</b>                        | <b>12</b>           |

Se colocaron 50 tubos de reacción con un volumen final de 12 μl cada uno, estos tubos fueron incubados por 14 horas a 29 °C, una vez terminado el tiempo de incubación, éstos fueron inactivados por 5 min a 85 °C. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados por 1 min a 16,000 g para eliminar las proteínas precipitadas (Liu *et al.*, 2020). Por cada 25 μl de sobrenadante de la reacción *cell-free* LanAm se agregó 0.5 U de la endoproteinasa Furin de la casa comercial NEB® (0.25 μl, catálogo # P8077S) y se incubó por 6 h a 25 °C (figura 14). Pasado el tiempo de incubación, todos los tubos fueron colocados en uno solo y la mezcla se concentró a un volumen final de ~30 μl, en un concentrador SpeedVac Thermo Corporation ISS110, a velocidad media por 30 min.



**Figura 14.** Biosíntesis del principio activo (LanAm/F) *in vitro*.

## Ensayo antimicrobiano

Para determinar el potencial antimicrobiano del péptido modificado postraduccionalmente (principio activo/LanAm), se realizó un ensayo de difusión en agar frente a *Micrococcus luteus*. En la placa inoculada se colocó el control positivo, se usó nisina de la casa comercial Additius® grado alimenticio 1 mg/ml (10 µl). Se colocaron las muestras concentradas de la mezcla *cell-free* de 50 tubos donde se espera que se exprese LanAm sin cortar, LanAm digerido con la enzima Furin (LanA/F, principio activo) y se colocaron dos controles negativos, ambos contienen los plásmidos vacíos, uno de contiene la endoproteinasa Furin y otro no. Los 50 tubos de reacción, equivalen a 600 µl de mezcla *cell-free* y se concentraron a aproximadamente ~30 µl. La placa de antibiosis se incubó a 4 °C por 1 h y luego a 37 °C durante 18 h.



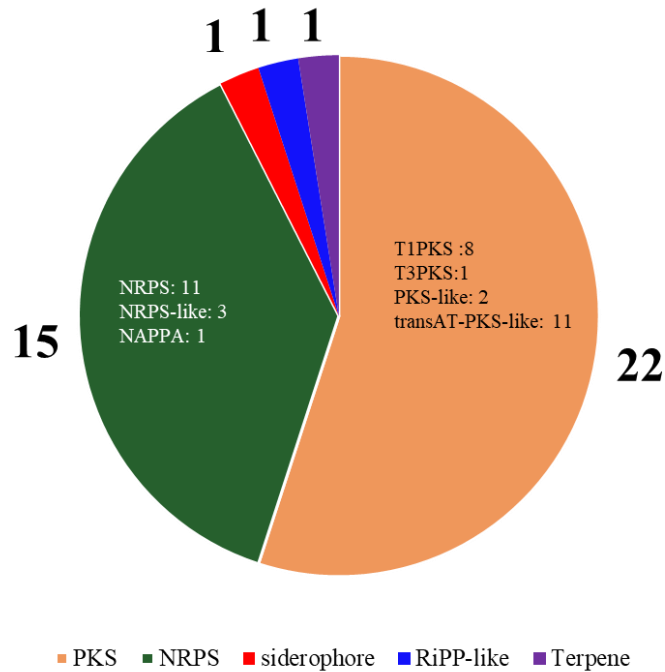
# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Minería de genomas

### Análisis de los genomas con el programa antiSMASH v 6.0

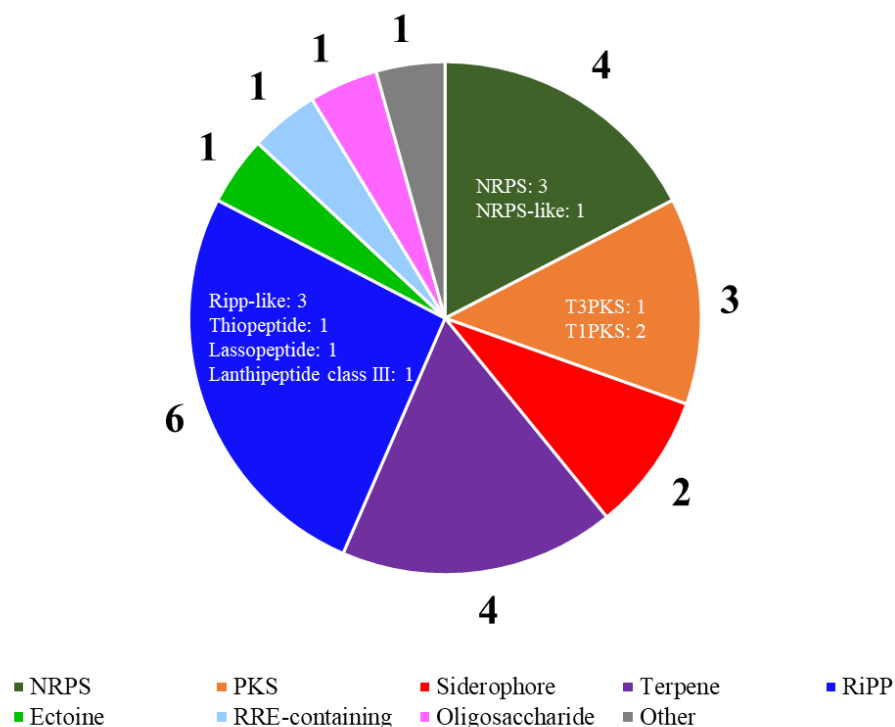
AntiSMASH es una herramienta de minería de genomas que permite la identificación y análisis de BGCs de metabolitos secundarios. Su función se basa en la comparación de clústeres de genes biosintéticos codificados en el genoma con una biblioteca seleccionada manualmente de modelos HMM. Actualmente, AntiSMASH es la herramienta más usada para la detección y caracterización de BGCs y ha sido actualizada en muchas ocasiones (Medema *et al.*, 2011; Blin *et al.*, 2013; Weber *et al.*, 2015; Blin *et al.*, 2017; Blin *et al.*, 2019; Blin *et al.*, 2021). En este caso, se eligió este programa para identificar clústeres de genes biosintético asociados a la producción de RiPPs, específicamente a la producción de lantipéptidos, los cuales se asignan determinando los dominios presentes en las enzimas biosintéticas (Medema *et al.*, 2011).

Los resultados del análisis de los genomas de las Actinobacterias endófitos con este programa, se muestran a continuación. El genoma de *Actinoplanes* sp. TFC3 tiene un tamaño de 6, 546, 651 pb y cuenta con 40 clústeres de genes biosintéticos de metabolitos secundarios (cuadro 11), la mayoría de ellos son de tipo PKS y NRPS (figura 15), además, estos resultados concuerdan con lo reportado con Centeno-Leija *et al.*, 2016, se encontró un clúster biosintético involucrado en la biosíntesis de un híbrido policétido *trans*-AT, un metabolito inédito que nunca antes había sido reportado en *Actinoplanes*.



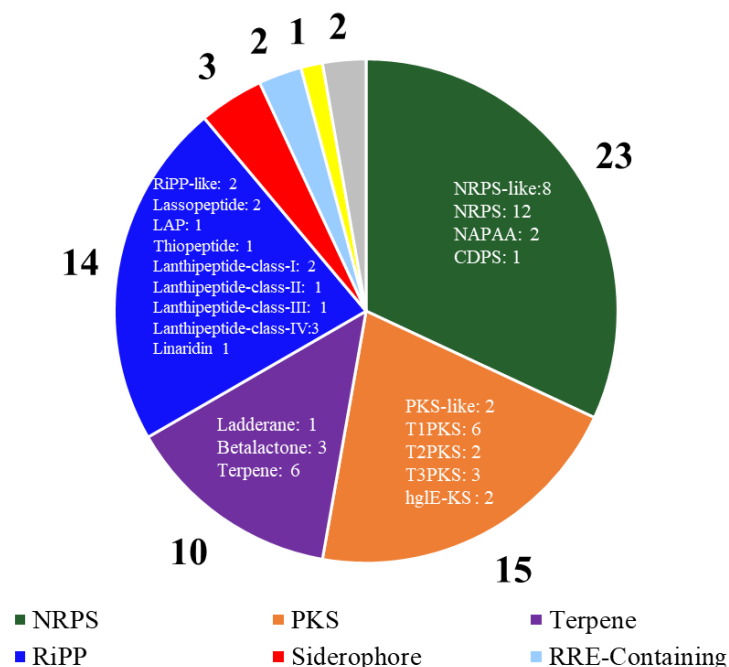
**Figura 15.** Clústeres de genes biosintéticos identificados en el genoma de *Actinoplanes* sp. TFC3 con el programa antiSMASH versión 6.0.

El genoma de *Streptomyces* sp. L06 presenta un tamaño de 6, 887, 193 pb, siendo éste el genoma más pequeño que se analizó con respecto a los otros dos genomas y se identificaron 23 clústeres de genes biosintéticos. Se encontraron seis clústeres biosintéticos asociados a la producción de RiPPs, entre los cuales se encuentran tres de tipo RiPP-like, un tiopéptido, un lasso péptido y un lantipéptido de clase III. También se encontraron cuatro clústeres biosintéticos relacionados a la producción de terpenos y cuatro más asociados a la producción de NRPS, tres de PKS y dos más de sideróforos, así como otros clústeres de genes biosintéticos (figura 16).



**Figura 16.** Clústeres de genes biosintéticos identificados en el genoma de *Streptomyces* sp. L06 con el programa antiSMASH versión 6.0

El genoma de *Embleya* sp. NF3 presenta un tamaño de 10, 968, 352 pb, convirtiéndolo en el genoma más grande analizado en este trabajo, presentó 70 clústeres de genes biosintéticos potenciales para la producción de metabolitos secundarios con interés biotecnológico (farmacéuticos, biorremediación, etc.). Además, presentó el mayor número de clústeres de genes biosintéticos asociados a la producción de RiPPs, comparado con los otros dos genomas analizados, dentro de los cuales se encuentran: dos RiPPs-like, dos lasso péptidos, un LAP, un tiopéptido, dos lantipéptidos de clase I, un lantipéptido de clase II, un lantipéptido de clase III, tres lantipéptidos de clase IV y una linaridina. También se encontraron 23 clústeres de genes biosintéticos asociados a la producción de NRPS, 15 PKS, diez terpenos, tres sideróforos, así como otros clústeres biosintéticos (figura 17).



**Figura 17.** Tipos de clústeres de genes biosintéticos identificados en el genoma de *Embleya* sp. NF3 con el programa antiSMASH versión 6.0

A continuación, se presenta un resumen de los clústeres de genes biosintéticos asociados a la producción de RiPPs en los tres genomas de los actinomicetos endófitos analizados.

**Cuadro 11.** Clústeres de genes biosintéticos asociados a la producción de RiPPs y lantipéptidos identificados con el programa antiSMASH versión 6.0 en tres genomas de Actinobacterias endófitas

| Genomas                     | No. de clústeres de RiPPs | No. de clústeres de lantipéptidos de clase I | No. de clústeres de lantipéptidos de clase II | No. de clústeres de lantipéptidos de clase III | No. de clústeres de lantipéptidos de clase VI |
|-----------------------------|---------------------------|--|---|--|---|
| <i>Actinoplanes</i> sp.     | 1                         | 0  | 0   | 0  | 0   |
| <i>Streptomyces</i> sp. L06 | 6                         | 0  | 0   | 1  | 0   |

|                           |    |   |   |   |   |
|---------------------------|----|---|---|---|---|
| <i>Embleya</i> sp.<br>NF3 | 14 | 2 | 1 | 1 | 3 |
|---------------------------|----|---|---|---|---|

Como se observa en el cuadro 11, todos los genomas analizados presentaron diferentes números y tipos de clústeres de genes biosintéticos, si bien la cantidad de genes y de clústeres en el ADN de un organismo varía de una especie a otra, no siempre es proporcional al tamaño del genoma (Friar *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2020). También se ha reportado que la abundancia de productos naturales de actinomicetos varía mucho entre géneros, lo que revela patrones subyacentes que aún no se comprenden (Doroghazi y Metcalf, 2013).

#### **Análisis de los genomas con el programa BAGEL4**

Los genomas de estas tres Actinobacterias también fueron analizados con otro programa de minería de genomas, con la finalidad de hacer más robusta la búsqueda de clústeres de genes biosintéticos asociados a la producción de lantipéptidos. En este caso, se eligió BAGEL4, debido a que es específico para la búsqueda de RiPPs y bacteriocinas, un grupo muy diverso de PAMs (Chikindas, *et al.*, 2018; van Heel *et al.*, 2018). Además, BAGEL4 tiene en cuenta el contexto genómico, analiza la secuencia de la región circundante en el genoma en busca de genes que podrían codificar proteínas implicadas en la biosíntesis, el transporte, la regulación y / o la inmunidad, así, esta herramienta resulta ser muy útil para detección de clústeres de genes biosintéticos asociados a la producción de lantipéptidos (de Jong *et al.*, 2006; de Jong *et al.*, 2010; van Heel *et al.*, 2013). En el siguiente cuadro se muestra el resumen de los resultados del análisis de los tres genomas analizados.

**Cuadro 12.** Clústeres de genes biosintéticos asociados a la producción de RiPPs y lantipéptidos identificados con el programa BAGEL4 en tres genomas de Actinobacterias endófitas

| <b>Genomas</b> | <b>No. de clústeres de RiPPs</b> | <b>No. de clústeres de lantipéptidos de clase I</b> | <b>No. de clústeres de lantipéptidos de clase II</b> | <b>No. de clústeres de lantipéptidos de clase III</b> | <b>No. de clústeres de lantipéptidos de clase VI</b> |
|----------------|----------------------------------|---|--|---|--|
|----------------|----------------------------------|---|--|---|--|

|                             |   |   |   |   |   |
|-----------------------------|---|---|---|---|---|
| <i>Actinoplanes</i> sp.     | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptomyces</i> sp. L06 | 3 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| <i>Embleya</i> sp. NF3      | 8 | 2 | 1 | 0 | 2 |

BAGEL 4.0 no detectó clúster biosintético alguno asociado a la producción de RiPPs en el genoma de *Actinoplanes* sp., mientras que el análisis con antiSMASH 6.0 identificó un clúster, pero no corresponde a la producción de lantipéptido, más bien corresponde a la producción de una molécula de tipo RiPP no identificada. En el genoma de *Streptomyces* sp. L06, BAGEL4 identificó tres clústeres asociados a la producción de RiPPs, de los cuales uno es un lantipéptido de clase III, este último resultado concuerda con el análisis reportado por antiSMASH 6.0. En cuanto a los resultados en el genoma de *Embleya* sp. NF3, la cantidad de clústeres de genes biosintéticos asociados RiPPs fueron mayores en antiSMASH 6.0 que en BAGEL4. Incluso el número y clase de lantipéptidos fue diferente a lo reportado por estos dos programas, en consecuencia, se decidió utilizar una tercera herramienta de minería de genomas para obtener datos más confiables y robustos.

### **Análisis de los genomas con el programa RiPPMiner-Genome**

Los genomas fueron sometidos a un nuevo análisis con el programa RiPPMiner-Genome, el cual es usado para la identificación de clústeres de genes biosintéticos relacionados con la síntesis de RiPPs y predicción automatizada de sus estructuras químicas. Utiliza perfiles HMM, además de implementar una versión actualizada del algoritmo ML (Machine Learning) que puede identificar correctamente el péptido precursor entre varios ORFs pequeños en BGCs relacionados a la producción de RiPPs. Este programa puede identificar hasta 13 tipos de RiPPs dentro de los cuales se encuentran los lantipéptidos (Agrawal *et al.*, 2021). A continuación, en el cuadro 13 se muestran los resultados del análisis de los tres genomas analizados.

**Cuadro 13.** Clústeres de genes biosintéticos asociados a la producción de RiPPs y lantipéptidos identificados con el programa RiPPMiner-Genome en tres genomas de Actinobacterias endófitas

| Genomas                     | No. de clústeres de RiPPs | No. de clústeres de lantipéptidos de clase I | No. de clústeres de lantipéptidos de clase II | No. de clústeres de lantipéptidos de clase III | No. de clústeres de lantipéptidos de clase VI |
|-----------------------------|---------------------------|--|---|--|---|
| <i>Actinoplanes</i> sp.     | 1                         | 0  | 0   | 0  | 0   |
| <i>Streptomyces</i> sp. L06 | 6                         | 0  | 0   | 1  | 0   |
| <i>Embleya</i> sp. NF3      | 20                        | 6  | 1   | 1  | 4   |

El genoma de *Actinoplanes* sp. no presentó algún clúster biosintético asociado a la producción de lantipéptidos. En el genoma de *Streptomyces* sp. L06 se identificó un clúster biosintético asociado a la producción de un lantipéptido de clase III. Los resultados anteriores concuerdan con lo reportado con las herramientas antiSMASH 6.0 y BAGEL4. En el genoma de *Embleya* sp. NF3 se identificaron 20 clústeres de genes biosintéticos asociados a la producción de RiPPs, de los cuales, 12 están relacionados con la producción de lantipéptidos. RiPPMiner-Genome identificó un mayor número de clústeres de genes biosintéticos de RiPPs y lantipéptidos que lo reportado con los programas anteriores, debido a que en algunos clústeres de genes biosintéticos existe más de un gen que codifica para un propéptido y, por lo tanto, al generarse más de un principio activo, este programa lo detecta como otro clúster biosintético, sin embargo, los resultados fueron los mismos.

Los genomas de *Streptomyces* sp. L06 y *Embleya* sp. NF3 poseen clústeres de genes biosintéticos asociados a la producción de lantipéptidos. De acuerdo con la literatura, los lantipéptidos de clase I y II, son los que comúnmente se han reportado con actividad antimicrobiana (Dischinger *et al.*, 2014; Ongey y Neubauer, 2016; Repka *et al.*, 2017), curiosamente, sólo en el genoma de *Embleya* sp. NF3 presentó este tipo de clústeres de genes biosintético, de manera que el siguiente paso fue analizar cada uno de ellos y elegir uno para su posterior expresión heteróloga.

## **Caracterización bioinformática de los genes de los clústeres biosintéticos seleccionados**

### **Clústeres de genes biosintéticos relacionados a la producción de lantipéptidos con actividad antimicrobiana**

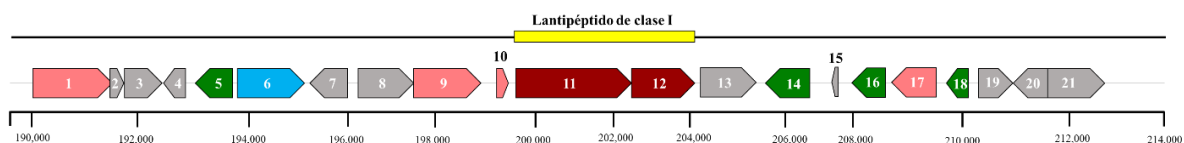
Para hacer más específica la búsqueda, se optó por analizar los clústeres de genes biosintéticos relacionados a la producción de lantipéptidos de clase I. Se comenzó analizando cada uno de los clústeres identificados en el genoma de *Embleya* sp. NF3. Con los programas de AntiSMASH 6.0 y BAGEL4 se identificaron 2 clústeres de genes biosintéticos asociados a la producción de lantipéptidos de clase I, siendo éstos los mismos clústeres de genes biosintéticos identificados, mientras que con el programa RiPPMiner-Genome, además de estos dos clústeres, se identificaron 4 más asociados a la producción de lantipéptidos de clase I. Todos los clústeres de genes biosintéticos identificados fueron analizados bioinformáticamente para conocer si tienen la maquinaria enzimática completa para llevar a cabo las modificaciones postraduccionales y el propéptido completo, es decir, si presentaba el péptido líder y el péptido *core*, así como el motivo conservado FNLD característico en los lantipéptidos de clase I.

Los clústeres de genes biosintéticos que presentaron las enzimas del *core* biosintético necesarias para llevar a cabo las modificaciones postraduccionales en el propéptido, así como el propéptido completo fueron denominados como 1.4 y 7.2 (de acuerdo con la nomenclatura de AntiSMASH 6.0), (cuadro 14) y en las figuras 18 y 19, se muestra la organización de los genes en cada uno de estos clústeres biosintético, en los cuadros 15 y 16, se muestra la función que desempeña cada uno de los genes dentro del clúster biosintético, como resultado de la caracterización bioinformática de las secuencias de nucleótidos como de aminoácidos. Conocer las funciones que desempeña cada uno de los genes dentro del clúster biosintético, permitió delimitarlo con los genes esenciales para lograr la expresión heteróloga del principio activo.

**Cuadro 14.** Número de genes del clúster biosintético y características del principio activo



| Clúster | No. de genes del clúster biosintético | No. de genes del <i>core</i> biosintético | Peso molecular del principio activo (kDa) | Punto isoelectrico del principio activo | Modificaciones del principio activo   |
|---------|---------------------------------------|---|---|---|---------------------------------------|
| 1.4     | 21                                    | 3   | 2.67                                      | 5.93                                    | 4 puentes tioéter y una hidroxilación |
| 7.2     | 23                                    | 4   | 2.22                                      | 6.07                                    | 3 puentes tioéter                     |

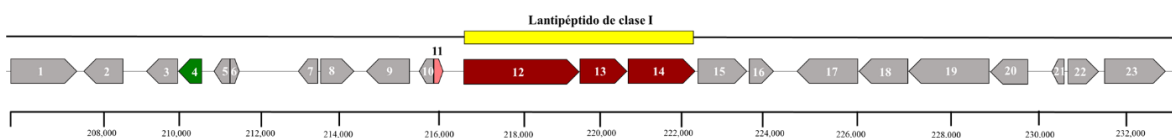


**Figura 18.** Organización de los genes en clúster biosintético 1.4 asociado a la producción de un lantipéptido de clase I identificado en el genoma de *Embleya* sp. NF. Los genes en color rojo vino, representan los genes del *core* biosintético (enzimas de modificaciones postraduccionales), en color rosa, genes biosintéticos adicionales, en verde, genes reguladores y en gris, otros genes.

**Cuadro 15.** Función de los genes del clúster biosintético 1.4 identificado en el genoma de *Embleya* sp. NF3

| Genes | Función                                      |
|-------|--|
| 1     | Aldehído deshidrogenasa                      |
| 2     | Proteína putativa                            |
| 3     | Glutamina amidotransferasa tipo 1            |
| 4     | Proteína que contiene el dominio DUF4259     |
| 5     | Regulador transcripcional de la familia MarR |
| 6     | Permeasa de la familia APC                   |

|    |  |
|----|--|
| 7  | Proteína de la familia acetoacetato descarboxilasa     |
| 8  | Glutamina sintetasa                                    |
| 9  | Citocromo P450   |
| 10 | Péptido precursor de clase I                           |
| 11 | Lantibiótico deshidratasa                              |
| 12 | Proteína de la familia de lantionina sintetasa C       |
| 13 | Proteína putativa                                      |
| 14 | Proteína de unión al ADN de la familia HU              |
| 15 | Proteína putativa                                      |
| 16 | Regulador transcripcional de la familia TetR / AcrR    |
| 17 | Quinona oxidorreductasa                                |
| 18 | Proteína de unión al ADN de la familia MmcQ / YjbR     |
| 19 | Proteína de la familia de la anhidrasa gamma carbónica |
| 20 | Proteína putativa                                      |
| 21 | Flavoheмоproteína                                      |



**Figura 19.** Organización de los genes en clúster biosintético 7.2 asociado a la producción de un lantipéptido de clase I en el genoma de *Embleya* sp. NF3. Los genes en color rojo vino, representan los genes del *core* biosintético (enzimas de modificaciones postraduccionales), en color rosa, genes biosintéticos adicionales, en verde, genes reguladores y en gris, otros genes.

**Cuadro 16.** Función de los genes del clúster biosintético 7.2 identificado en el genoma de *Embleya* sp. NF3

| Genes | Función           |
|-------|-------------------|
| 1     | Proteína putativa |

|    |  |
|----|--|
| 2  | Proteína putativa  |
| 3  | Proteína putativa  |
| 4  | Regulador transcripcional de la familia GntR                         |
| 5  | Proteína putativa  |
| 6  | Proteína putativa  |
| 7  | Proteína putativa  |
| 8  | Proteína putativa  |
| 9  | Proteína que contiene el dominio hélice-vuelta-hélice                |
| 10 | Proteína putativa  |
| 11 | Lantipéptido precursor de la familia FxLD                            |
| 12 | Lantibiótico deshidratasa  |
| 13 | Lantionina sintetasa C   |
| 14 | Metiltransferasa   |
| 15 | Proteína putativa  |
| 16 | Proteína putativa  |
| 17 | Proteína de la familia TniQ  |
| 18 | Proteína de unión a NTP de la familia TniB                           |
| 19 | Integrasa / transposasa / recombinasa de tipo DDE                    |
| 20 | Subunidad de endonucleasa de transposasa heteromérica similar a TnsA |
| 21 | Proteína putativa  |
| 22 | Hidrolasa de NUDIX   |
| 23 | Hidrolasa de NUDIX   |

En ambos clústeres de genes biosintéticos, se identificaron las enzimas del *core* biosintético, así como el propéptido que dará lugar al principio activo, sin embargo, en ninguno se identificó la proteasa que llevará a cabo la escisión del péptido líder del péptido *core*. Se han secuenciado genomas especialmente en Proteobacteria y Bacteroidetes que contienen grupos de genes biosintéticos de lantipéptidos de clase I con un transportador/proteasa bifuncional

(Repka *et al.*, 2017) y se ha reportado que los clústeres de genes biosintéticos de lantipéptidos de Actinobacterias no contienen una proteasa dentro del clúster biosintético, más bien, podría encontrarse en otra parte del genoma (Chen *et al.*, 2019). Debido a la falta de la proteasa dentro del clúster biosintético, se decidió incorporar un sitio de corte de una endoproteinasa comercial entre el péptido líder y el péptido *core*.

Con base en el análisis bioinformático, se decidió trabajar con el clúster biosintético 1.4 de *Embleya* sp. NF3, que codifica para un lantipéptido de clase I. Se eligió este clúster debido a que presentó los genes completos necesarios para llevar a cabo la modificación del propéptido. El clúster biosintético 1.7 también presentó los genes *lanB* y *lanC* completos, además de tener una O-metiltransferasa en el *core* biosintético, hasta hace poco se descubrió que es una enzima que cataliza la transposición de un residuo de aspartato altamente conservado a isoaspartato en el péptido *core*, sin embargo, no se sabe con certeza si esta enzima podría realizar otras modificaciones que puedan alterar la función de los lantipéptidos de clase I, lo que resulta interesante su estudio previo para obtener más información sobre su función (Acedo *et al.*, 2019). Además, de acuerdo con el análisis de antiSMASH 6.0 y RiPPMiner-Genome, el lantipéptido del clúster biosintético 1.4, fue el predicho con mayor número de puentes tioéter, de acuerdo con la literatura, le conferiría una mayor resistencia y estabilidad frente a la degradación por calor y degradación proteolítica (Repka *et al.*, 2017; Lagedroste *et al.*, 2020). Por las dos razones anteriores, se decide continuar trabajando con el clúster biosintético 1.4.

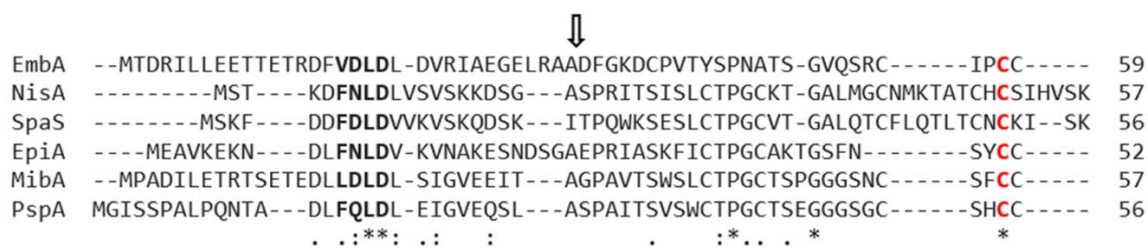
### **Alineamiento múltiple de LanA, LanB y LanC del clúster biosintético 1.4 de *Embleya* sp. NF3**

*lanA*, es un gen de 180 nucleótidos que da lugar a un precursor de 59 residuos de aminoácidos (péptido líder más péptido *core*), después de la maduración proteolítica tendría una longitud de 26 residuos de aminoácidos (principio activo).

Para determinar dominios, motivos y aminoácidos conservados en los genes del *core* biosintético del clúster biosintético 1.4, se realizaron alineamientos múltiples globales de las secuencias aminoacídicas de LanA, LanB y LanC con otras secuencias ya reportadas de clase

I. Los lantipéptidos de clase I proveniente de actinomicetos son microbisporicina de *Microbispora corallina* (número de accesoión NCBI: ADK32554.1) y planosporicina de *Planomonospora alba* (número de accesoión NCBI: CCQ18695.1).

A continuación, en la figura 20, se muestra el alineamiento múltiple global con el programa Muscle de LanA de *Embleya* sp. NF3, denominado como EmbA con otros propéptidos reportados y caracterizados.



**Figura 20.** Alineamiento global en Muscle de la secuencia de aminoácidos de LanA del clúster biosintético 1.4 de *Embleya* sp. NF3 denominada como EmbA con otras secuencias LanA reportadas, se muestra el porcentaje de identidad tomando a la secuencia EmbA como 100 %: Nisina (NisA: BAA00602.1) 22 %; subtilina (SpaS: AAA22778.1) 20 %; epidermina (EpiA: P08136.1) 22 %; microbisporicina (MibA: ADK32554.1) 35 % y planosporicina (PspA: CCQ18695.1) 29 %. La flecha indica el sitio de corte en la secuencia LanA de *Embleya* sp. NF3 (EmbA). Las letras en negrita indican el motivo conservado en el péptido líder de los lantipéptidos de clase I. La letra en rojo indica una cisteína conservada que posiblemente está involucrada en la unión al lípido II para llevar a cabo el mecanismo de acción.

El gen *lanB* tiene una longitud de 3201 nucleótidos que corresponde a 1066 residuos de aminoácidos, la masa molecular teórica es de 118 kDa y su punto isoelectrico teórico es de 6.34. La secuencia de aminoácidos de LanB se alineó con otras secuencias deshidratadas reportadas y caracterizadas. En la figura 21 se muestran los resultados del alineamiento múltiple global con el programa Muscle. La secuencia LanB analizada fue denominada como EmbB.

EmbB MRHSEHEHGRGDGPHEGYDDARGDEDYRPA GPIFVRMAS-----VPCAEPEPDAVTSSA  
MibB -----MTDSPFRAWDVFMVRTPVGYAYPTPLSN SNGFDSPASSP  
EpiB -----M-NTIYEPS SICMIRTP-----LSVEFFNFLNTE  
NisB -----MIQNSFK-AQPFLVRNTI-----LSVKDKQSFT---  
spaB -----M-KSLYTPTDYMYMIRVPL-----VHQALKNENSQ----

. : : \* . : :

EmbB DPADAETP-----AALRRATADPLFREALGIA  
MibB GFGEFEPDPAPVPSDVS GHGAGSSEASVRASGRPPAGDHL SLLRAACEDGPLMEAVE LA  
EpiB QI---KYS-----DLQLNAQMKESILTT  
NisB ----EYT-----QVIETANNKVFLEQLLIA  
spaB ----DTD-----QLLDLHCNDSLFREQILVS

. : : \* : :

EmbB GGSLSAALDRL---DAGIDPGPKRLRGMAMSVSR YALRMSGRPTPFGLFAGVATGRFGPN  
MibB SPSLAGLLARVARGDTGGLKD-KLRRRAALALLRYDIRMTRPTPFGLFAGVSGGRF-DT  
EpiB TFNLYCTLQEI---NFDGDN---KKVRDAKESLLKYLIRMSTRPTPFGLLSGINLGHFVNE  
NisB NPKLYDTLQKY---NAGLLKK-KRVKCLFESVYKYKRSYLRSTPFGLFSETSIGTFSEN  
spaB SRTL YDTMNI FLQ-TPDKLKG-KKKRN FQQA ILKYATRRATRTTPFGLFSSVGIGAFSDK

. \* : . \* . : : \* \* \* \* \* : \* \*

EmbB ARVVVRGHA-AKAVRLDAERLHERVQAWLALPEVRSRVDVVLNDLSRVRDGRILIP---  
MibB SAKWLAGTGHRTTRADMEWLLSAVHRLERDRVLLAGVTVQAHQTLTVRGDRIVLDCPSA  
EpiB PTRLKVGNSIQYVKVDGEWLYKLVSYIESIDEYYQNLKVIWNSKAHIIINDRIYLNQSA  
NisB SKSELNGET-TKGVILDTQWLIRLVH QME--RDFSRLKLSFVINNANYEFGDRIYFQV----  
spaB NQLSFNQHSFYKKARVDFEWLYQLTRKLE--NEYIDRLSFTLNPACYIKGDRAYLL----

. . \* : \* . : : . \*

EmbB -----GPT-RELSVRHSALVEHVCATVTHPVP-YESVLDR TAEAFPDPAPRDLDAVAQ  
MibB LGKPLNGSTRSTVSARRSPWAEILGAARRPVL-AGRLAQSVAQRFEL-PADRV TGLLAD  
EpiB I-YLNNNKD-TSFSIKNSELLVFIKTTVTN NNITFSNLAEKINQEF EINDITKVKVYIHN  
NisB --YTINSSDLEEVNIKSTNVYQII SKTCESGFQKYEEICESVTASYGDEYRELSEQYINS  
spaB --YSTDGKS-EEVSVRATSVFHLINELCGECVA-YHDIIRSLTENYENTPISKINQYVAD

. . . : : : : : : :

EmbB LLRYGFLISSITPHRLDDALFDRIAGAI EELP-----EAAATFRATRIAV  
MibB MAAQELLITALRPPLDGDDPLQHVL DVVAAA EARAGSPA EAMSSESAALVAALREVDARC  
EpiB LVSKEI IYSTIRPPLSYSDNLNYILNKLSLHN-----D--DFVKKIREIQKLI  
NisB LIVNHLYVSNLQKDI L SDFSWETFLNKVEEID-----DSKKYLIPLKRVQKLI  
spaB LIDKEFLISNLRPPMTVSDQFQYL I AQAESSR-----IPNEL LQACRKIQYQI

: : : . : .

EmbB REYEKVPPEGGD AWRRLTALLDPDADTDHP PAQVDLRM-DADIVLPTAVGDEAAAYADA  
MibB HAYDR TAVGQGRRELAELIQSTRRVHPHDT-PLHVDLRI-DLEVRLPEVV RTEIERAAEA  
EpiB LAYEKTEIGFGEELYKDI IHMKALFKCKN-YLQIDTKIDMINNYLHQDIATNISEAAYL  
NisB QEYSELEIGEGLEK LKEIYQEMS QILANDN-YIQIDL-FSDSEITFDTEQKQQLERLAD-  
spaB DEYNRITIGEGEDQYLNLIETMNLVKTSS-PLQVDTGLGDSSIQLDNETSLAISELASM

. \* \* : . : \* : . : \*

EmbB MWALSDAWTHL-HMRDYRDRFLDRYGTTRLVPLAELVDPHRGLGFPSGYEAARAG--GG  
MibB LWRLSPPRRGMR-ALRRYHEAF LERYGADRAVPLEL LDDTRGLGPPAGYKWP PSETPAG  
EpiB LWLLSRNNIGFT-DLKVLHNR FIEKYGFEQLVNIKDLISDITGFG-----TTIFQE  
NisB FIGNTTKSVNRT-YLDDYKDKFIEKYGVDQEVQIVELFDSTFGIGAPYNYTHPQNDFYEL  
spaB FTYMAAPSAERLDHLEKYKNVFLERYGYEREVPLEMLELCSNAGIGAPATYTPNVNEFFEE

: : : : \* : \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

EmbB PAPDDYRADRRRVLTAELVQEALLGDDRELRLTP--DLIERLAA-TMRPEGDVPAPPPN  
MibB PQEPRRSAAALARLVAKA-----ARRGEREIVIDE--ETIAELAY-----DEAAPADLPN  
EpiB EETDGNNIVMLKQKFLH-----ALRNNDEIVINE--KDVESLINDNEINHYHAPMSADV  
NisB EPNTAYFSEEREKYLKYSKYVE--AIKNNEAINFEDLESHYQKIAA-----EKNSKLQ---  
spaB ISFEDQFSPEMKQFFMKKYFE--SVRKKAPIQLHD--ETFHRICN-----YEIADEEIPV

. : : . :

EmbB SLELNLQLLADDTAALDEGRFRLIGSAQAGSWLAGAMTGRFAELTD--MTEELAGLVAAA  
MibB SLELGHVHVAPSLDELSAGTFRVWLAPGPGSHHAGATLGRFTGLLP--DVD--AESAAARQ  
EpiB YAELYLGR-----FYNQYNELIVISPLTASFNAGATFGRFHHLIDTETLAKLEHEKGHY  
NisB GLEFLFDL-----AKKDEKDIFVLGNIIGNNNLGGASGRFSALSP--ELKNYHKSIVDS  
spaB SFELNFFV-----KLRNGRVMLYLGNVVGSTRAGKTGFRFTHLSD--SINAVVKNI-HN

\*\* . . . \* \*\*\* \*

EmbB A-----DPGTVPAQISFAPTGRRALNMSQVPELIPYRIPVGIHADRNPHCLDWRELLVG  
MibB AGRPLHIQDAVAADVAFIPRSGRAANLAHTPSYSGRRISVGLPD-SGRAQEIPLDELGVG  
EpiB YQKMICDDNVEMISINNIPKYPRNHNL TNHDSYEYSLNLGSSN-SYSKYELTLDIIVYG  
NisB IEKENESKGITSCEIVFLPENIRHANVMHTS IERKRVLPVFTST---SHDEVQLTNIYIG  
spaB KEKELTGKKNKICELSIVPNQVRSQVTRNVSUREKEMNLFNSVLHHNDSVKAEDVLIG

. .: \* \* \*: : : : : : \*

EmbB LDPIGLTLLMPDTGRRVLPVPPHVALDHWAVEVRLMVDIAFGRSRTWTGWDWAGL-EV  
MibB ANLERLCLVHLPTGREVVPALPNMVSFAAQAPNPARLLELGLLEGQRLWEPWDWAGL-SE  
EpiB ATFNKLYLYSSQLNKRVL-FESNNMYNFKLKECNLYRLREISMESVKCIEPMNDVSI-DS  
NisB IDDNEEFYARDISTQEVLKFYVTSMYNKTLFSNELRFLEYISLDDN--FGNLPWELIYRD  
spaB IDKKHIFYAKHKCTGEILSFESNHMFNPLLMPNVLRFLEISRDKRKNWDFPVMGIYS

. : : : \* : : . :

EmbB LPQLPRVTHGRVVAAPRRWIPSRAMR--ASVGEPREFDRALREWSRDYEVPRVQLVDGD  
MibB MPFLPGVRYGRTLLAAPLWRMDQLRGPADDSGPAADWDAALDRWRAEWNVPRRVLAVSMD  
EpiB FSYSPRIRYKNVILKPAYWKINEMVPLP--KNEEWDQQFLKYQEQFNIPNIVNLVYGD  
NisB FDYVPRLVFGDIVVSPAKWKIREEDM-----KTEITKEFLQSKGV---PKEFYIVNGD  
spaB FKYIPEIKYKEIILSCEQWLIHKSDLSIHSNSSIDEVKSAFFEFHRTYDLPQRFYIVNAD

: \* : . : \* : : \* . \* \*

EmbB RAHGLDLDLSDAHRVLLRHEMRRS--RIALLEDLTERGRGCGWA-----AGHRTELVVP  
MibB QRLLLDLDDAHRVLLRDELRRT--PELIAQQA--GDEEGWLDRGDAGFPGHLAEIVVP  
EpiB NKLLLNLSLANHRYLLMKEYKXH-KRVLVESFLPQSK-----NDHVYEIVTP  
NisB NKVYLSQENLLDMSMLEAQIKKSAKRNDFVE LQEYIEDGDVVSKRQ----KGRVSDVVVP  
spaB NRLLIDIEDDRTLDFVFWELKKT-NHNPQLQLVAAELDANALKDRNQ---NVYSGEIVVP

. :. . : : : : : : : \*

EmbB LVRRRPTRTTRPDVPAVPAIPAPLPDRYHLPGEDWLVKLYAIPGTHDELLRTHLPTLL  
MibB LERRDR-HAARPPHIRATVSGREPTGAGGP----WLYLRLRVPRRNQDDFLRDQVPVLV  
EpiB IYKKS---YRGPEIEIPKYKNTDIEYD-----KDFALHIHIDKPSQDTFIIDNLYPFV  
NisB FVRKTT---PDNDSKKFTREKRVSVEQREKLPFDWLYIKLYISTNRQDEFLLSYLPEIQ  
spaB LIRKTP---EKPLKLPVLSVEENGSEKIKMPFEDWLFIKLYCKQTREEELIAFEIADIY

: .. \* : : : : : :

```

EmbB   DTVG--GHIDRWFFIRYLD-PRPHVRVRLHGDPARLREVVLPPELARRVRVMRERGAIRSM
MibB   RAGIE-HGADRWFFIRYSDTAGQHLRVRFRGEREKLWAGLLPEIGARLVEWQRQGLLAGH
EpiB   KHLKDKGDIDQYFLMRYIK-QGDILKLRFRNDENYAE-IYSILKNWLPHVROTTEVSDY
NisB   EIIENLGG--QLFLLRYTD-PQPHIRLRI--KCSNFL-AYNSILEILKKSRENRMSTF
spaB   NQISD-QYPVRHFFMRYRD-PKPHIRLRLNGKAEVLYS-LFPQLLNWLKSLREKGLVTEF
      . *::** .      ::*: .      : : . :

EmbB   ALDVYEPETDRYAGPDALVAAERLFTLDSRSALAQLGMRARGGLAVPNEVLIAVNHALLL
MibB   ELGQYDPEYERYGGDALAEFTETAFAQHDSAAAISLLRLTRRAGFRYTLDEVTAISAAALA
EpiB   EFVSYEPEFFRYGGKNTINEIEAFFEYDTNLAVNII----ENDFKFDRPYIVAISIMYLF
NisB   DISTYDQEVERYGGFETLELSEQIFCADSKTIPTLLTVTKEANNDWSVDDVSILM-----
spaB   VITQYEREIERYGGLDLMDAAEQVFCEDSKVETMIRMHRMKDIAISKEIAGMVSIVLFL
      : *: * **.*      * * *:      :      .      :

EmbB   ESL-----GDWDW-----CSWVVSFAFVKGPAQTVFRRHRPLVRELIR
MibB   DAFGPPAPWPEVPLVGGQLQWAPDLFDGDPAAAWMSSTGGRRELPPDYRRDPARWQKLID
EpiB   EMF-----SISN-----EERMEIVNNYVPTSFKSKDIRPFKNELVITICN
NisB   -----DYRY-----LKWFFQNDNQEILKFLHLVSPKVEENVN
spaB   EQF-----ELTF-----EEQLAFLEKNCQLQNEYRTEFKKDREMYIEICN
      . .

EmbB   P--GRATAAVEQRLGVSALADMWTRPAEGRAYGRTVLSDSGRRPANARHENALLG-LLHM
MibB   PT-GGWPLLRADEDGCQVLAALAESRDEAVRRFG-TAYREAFRPTDSPSTQLRLVGSLLHM
EpiB   PA-NNFEYMAKHYSYGIYRILKDGNIKLSKLNK-----LKKTLTTKR--SRIIGSLIHM
NisB   EKIVHYHNLLETDNLGRIFSDKNFEDLKRTVEALFYKMVSQNYDTQK-VYSIIDSIIHV
spaB   SD-RDWDNLRKTS DGRILYEILKTRKIAAANYACL----INKAFDNKEAVYSRIGSVIHL
      . . . . . :. :*:

EmbB   QHNRLLGIDRASEGRGYAILRGIASDHLGRLAHPQRQWPTDVEGDRRDDG
MibB   TCNRLIGGSAERERSVLGLARGAVQDNLNRRRHLA-----
EpiB   RCNRFIDKDKQETFVLSIVKEIVKTQKHWCQDKND-----
NisB   HNNRLIGINRDKEKVIYYGLQRLFTSEEYMK-----
spaB   HCNRLFQTDREMENKILTLCRHSLYAQRYQKKNGLAWK-----
      **::* .      *      .

```

**Figura 21.** Alineamiento global en Muscle de la secuencia de aminoácidos LanB del clúster biosintético 1.4 de *Embleya* sp. NF3 denominada como EmbB con otras secuencias LanB reportadas, se muestra el porcentaje de identidad tomando a la secuencia EmbB como 100 %: microbisporicina (MibB: ADK32555.1) 31 %, epidermina (EpiB: YP\_500451.1) 21 %, Nisina (NisB: CAA48381.1) 21 % y subtilina (SpaB: AAA22779.1) 23 %.

El gen *lanC* tiene una longitud de 1383 nucleótidos que corresponde a 460 residuos de aminoácidos, la masa molecular teórica es de 48.9 kDa y su punto isoeléctrico teórico es de 6.02. La secuencia de aminoácidos de LanC se alineó con otras secuencias ciclasas reportadas



y caracterizadas. En la figura 22 se muestran los resultados del alineamiento múltiple global con el programa Muscle. La secuencia LanC fue denominada como EmbC.

```

EmbC   MTDERRTDVVTPTRGAGEPPHAERARATVARVLDRLADPAAVADDTIAIAARSWAPECAS
MibC   -----MTTDPLEVAVHVADRLARPEDSGL-----RAGE
NisC   -----MNKKNIKRNVEKIIAQWDERTRKNKENF-----
EpiC   -----MIDMNLILKKKFQEI SEVDDFI-----SKASTETD
SpaC   -----MLNNYIDKIIKTSKQISDLQLVL-----NLQ
                :   :           .   :

EmbC   PWSELSLSSGCPGVSLAFGGTTPRGPE--HTVRAHAYLKRAEMVAREDFPTGGMFDGPG
MibC   SWWPQSLAHGAPGVALLHVELAAHGAAP-WDR-VHAWLC-AATWATVTGGPDSHLYYGAP
NisC   DFGELTSTGLPGIILMLAELKNKDNSKIYQKKIDNYIEYIVSKLSTYGLLTGSLYSGAA
EpiC   YFEPSTLSHGIPGIILFLDAYQKVF DIN-TEQIVHKYIMKLAPYLQS-GQYNNSLFGGLS
SpaC   RLDDISVASGISSVCILFAELDYTFPNRGWDRIGHEYL IHIKKKLEGMEDYSPSCLGGMG
                ::: *  . . :   :           ::           *

EmbC   AVAVATLVAHEAT--GGYVSALARLDDHRR-RVIRATLPRPRTHVPLVSNA--EFETVRGL
MibC   AVAHWACAADHQPGAYRRALDALNRQITADALSRARAGHARIDADTLPTLSEFDVIRGL
NisC   GIALSILHLREDD-EKYKNLLDSLNRVIE-YFVIEKIEGFN-LENI TPPD---YDVI EGL
EpiC   GIAFSMDLASQNG-KNYQNILNNIDGHIV-NEIENKFDQIL-QEPLNPLN---YDTVSGL
SpaC   GIGFCILALSNG-NRYRNFLTDFNLYYF-DIIKKHIEEFKDLSSLQKNDLFLYETIYGF
                . . .       .       *   *   : :       :           : : : * :

EmbC   SGMGRYLLARVDGGSGTDAGIDEVRMVL SYLVGLTEGEITHRRRVP RWASGAPKI--G
MibC   SGIGAYLLRRDPGGAALTA-----VLEYLVRLTE-PITVDGETLPGWVAQVGP SG--R
NisC   SGILSYLLLINDEQYDDLK-----IL--IINFLS-NLTKENKGLISLYIKSENQMSQS
EpiC   AGIGRYLLNRVDENEFNVK-----ALKSILVYFK-DIQYSK---NSWVVPQESQFLES
SpaC   AGIGRYLLFFRDQRESRD-----LLEKILVLIT---RMANKNVNSL-----A
                : * :   ***           *   : :

EmbC   QEADFPAGHLNLGLSHGVAGPLALLASAWRAGVRVPGHQAMESLVALLVRCVPTGEAL
MibC   SDPALPGGHANHGMAHGVGGLLALLAALHGVTVTGHHDAIARILTWLDQWRTHNG---
NisC   ESEMYP LGCLNMGLAHGLAGAGCILAYAHIKGYSNEASLSALQKIFIYKFELEIKNQF
EpiC   DKNYFTEGNINLGLAHGVLGPMSL FALCVIKGITIENHQHILKDMYKFIMDEKFCNHERW
SpaC   DEKYV----LDCGLAHGVSGPLSLLSLSYINNIIVEGQLDAIKKISNFLIKTKTKSANGY
                . .           : * : ** : * . . : : .       :   :

EmbC   WWPPSYSLDQWAAGSPGDPFRPRPSWCYGVPGVSRAIQLAALALDRPDWHEL TRRS LIG
MibC   -WPYWTRPQLHAGQLMATP-VRRP SWCYGTVGLARAQQLAALATGDSTRRRAENALLR
NisC   LWKDGLVADELKKEKVI REASFIRDWCYGGPGISLLYLYGGLALDNDYFVDKAEKILES
EpiC   LQRYVLI SERNHFN-----FIRNGWCYGN TGVM T T L F L I G Q A L Q D D E I I K M S K K V M L Q
SpaC   LFPNGIILNEKNKQTVDI--TTRDAWCYGS PGTCRALLLAKEATGDAKYSNCAVTVFKD
                * . **** *           *           :   :

EmbC   LLATPIS EWGVDSALCHGRAGLLHLLGLLGEHVDDARLPWRDELAALILDGYDDEHRF
MibC   AVTDPMHLLAATDDSLCHGRAGFAHLA--LRAADAAPDPGVQLRAAALRL-----LEVM
NisC   AMQRK---LGIDSYMICHGYSGLIEICSLFKRLLNTKKFDSYIEEF-----
EpiC   VVNDK--DENLISPTICHGLSSQILMLTIMNLFELNEVSDYITV L INKLI SHYKEDYLV
SpaC   VIKRNF EQQKNYSPTFCHGLSGLLTITFLFNESIRDPKF KSYQIYLVKKL LGYYNDNNVL
                :           . : ** : . .       :   :

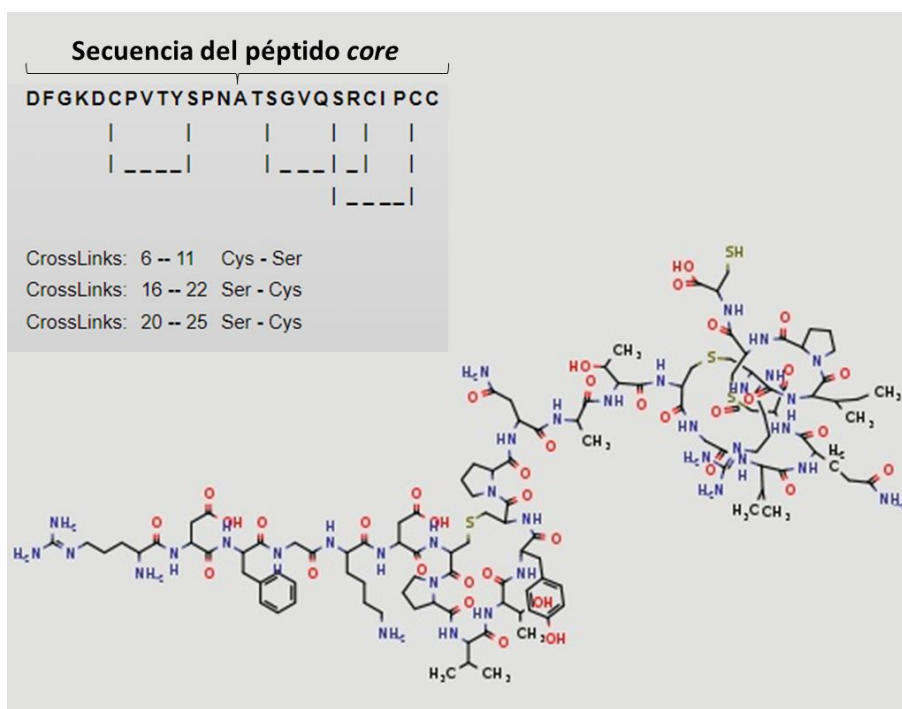
EmbC   GF----RVAMTDAAVGADIPSFLEGAAGVALALDAYAEG--RARAGWDRVLMVA-----
MibC   HPPGTD AKDTAGQLL TLAGPEF LEGTAGIAL TFAATASPS-GPVTGWD T C L L I S-----
NisC   ---NVNSEQILEEYGD E SGTGF LEGISGCILVLSKFEYS--INF TYWRQALL F D D F L K G
EpiC   NF--IDINENKQDVFKSRKVGLLEGELGVYLTMLTKNTKILNEKNWNTNAFLIS-----
SpaC   GFQNIERDNLNKEIV-SDELGLINGVTGVLTL LAFRNQ--MTYTRWESILLLN-----
                : * : * * * . :           *   : :

```

|      |      |
|------|------|
| EmbC | ---- |
| MibC | ---- |
| NisC | GKRK |
| EpiC | ---- |
| SpaC | ---- |

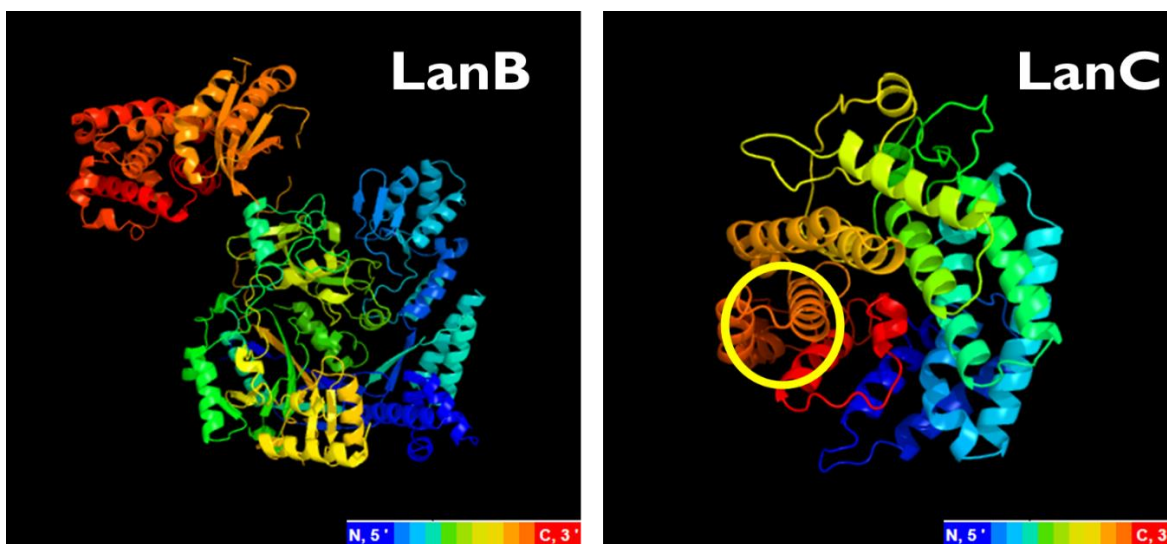
**Figura 22.** Alineamiento global en Muscle de la secuencia de aminoácidos LanC del clúster 1.4 de *Embleya* sp. NF3 denominada como EmbC con otras secuencias LanC reportadas, se muestra el porcentaje de identidad tomando a la secuencia EmbC como 100 %: microbisporicina (MibC: ADK32556.1) 23 %, Nisina (NisC: CAA48383.1) 21 %, epidermina (EpiC: CAA44254.1) 23 % y subtilina (SpaC: AAA22777.1) 23 %. Las letras en rojo indican los aminoácidos involucrados en la triada catalítica de unión a ligandos de zinc.

A continuación, se presenta la estructura química del principio activo predicho con la herramienta RiPPMiner-Prediction.



**Figura 23.** Estructura química del principio activo (26 residuos de aminoácidos) del clúster biosintético 1.4 del genoma de *Embleya* sp. NF3 predicho con el programa RiPPMiner-Prediction.

También se llevó a cabo el modelado por homología de las enzimas LanB y LanC por medio del programa Phyre<sup>2</sup>, en la figura 24 se muestran los resultados.



**Figura 24.** Modelo tridimensional de las enzimas LanB y LanC del clúster biosintético 1.4 del genoma de *Embleya* sp. NF3 con el programa Phyre<sup>2</sup>. Los modelados se realizaron con un 100 % de confianza en relación con las secuencias molde. LanB realizó el modelado con la estructura cristalina de lantibiótico deshidratasa MibB de *Microbispora* sp. 107891782 con el cual presentó una cobertura del 92 % y LanC realizó el modelado con la estructura cristalina LanC *L. lactis* subsp. *lactis* con el cual presentó una cobertura del 82 %. El círculo amarillo en la imagen de la derecha representa el sitio de unión para ligandos de zinc.

De acuerdo con los resultados de los alineamientos globales de LanB y LanC (figuras 21 y 22), ambas enzimas se encuentran completas y presentan los aminoácidos altamente conservados para llevar a cabo su función enzimática (Ortega *et al.*, 2015); en su caso, LanC presenta la triada catalítica de unión a ligandos de zinc necesarios para llevar a cabo el proceso de ciclación (Zhang *et al.*, 2012). Por lo tanto, estas secuencias, según los análisis bioinformáticos, pueden realizar sus funciones enzimáticas.

Con el programa Phyre2, se obtuvieron los modelos de las enzimas del *core* biosintético, logrando una confianza del 100 % y una alta cobertura de la secuencia de aminoácidos con los plantados seleccionados del PDB. El modelado por homología de LanB se realizó con la estructura cristalina de lantibiótico deshidratasa MibB de *Microbispora* sp. 107891782 con

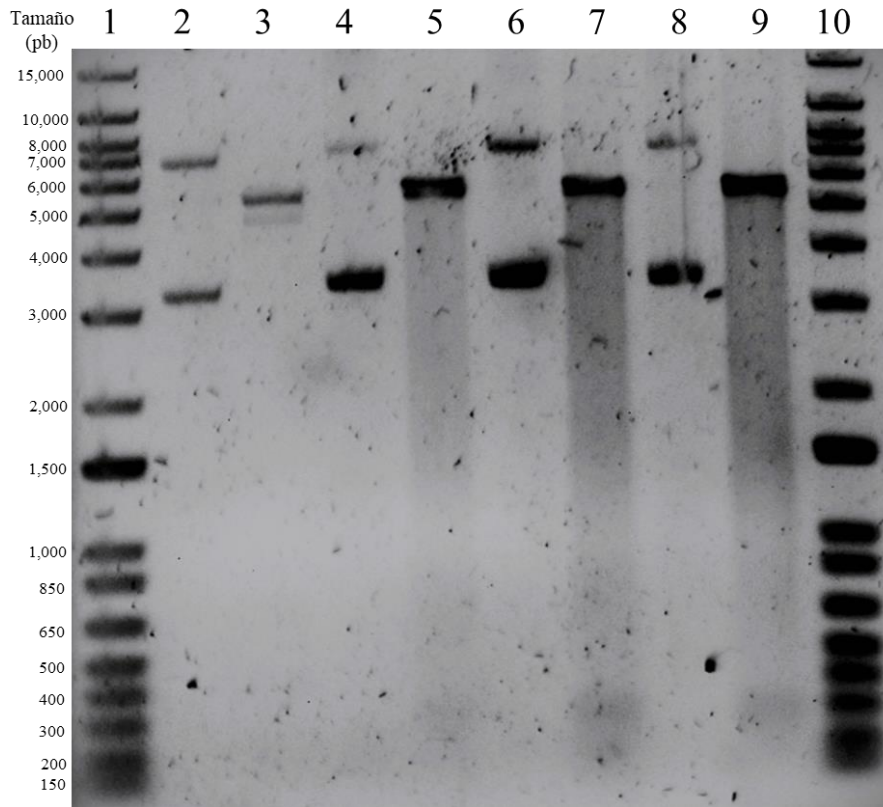
una cobertura del 92 % y el modelado por homología de LanC se realizó con la estructura cristalina LanC *L. lactis* subsp. *lactis* con una cobertura del 82 %.

Una vez que se caracterizaron bioinformáticamente las secuencias de los genes del *core* biosintético del clúster biosintético 1.4 de *Embleya* sp. NF3 y se confirmó que este clúster presentó los genes necesarios para la producción del principio activo, se realizó la síntesis y clonación de estos genes por la empresa IDT.

## **Clonación**

### **Construcción de los vectores de expresión**

Una vez que se amplificaron los fragmentos de interés, estos fueron clonados en los vectores de expresión correspondientes. El fragmento *lanA* amplificado por PCR y purificado de un gel de agarosa, fue clonado en el vector pET-22b(+), por compatibilidad de sitios de restricción (tanto el vector como el inserto fueron digeridos con las mismas enzimas). De las colonias resultantes de la transformación en *E. coli* JM109, se analizaron 4 de ellas, por digestión enzimática con *NdeI* y *EcoRI* (mismas que se usaron para clonar), esto con la finalidad de liberar el inserto del vector y comprobar clonas positivas. En la figura 25 se muestra el resultado de dicha reacción de restricción. Las colonias analizadas fueron las denominadas colonia 18, 28, 34 y 43. Los plásmidos digeridos de las colonias 28, 34 y 43 (carriles 5, 7 y 9), mostraron el patrón de bandas esperados, en la parte superior se observó una banda alrededor de 5.5 kb que correspondería al vector (el vector digerido tiene un peso de 5.3 kb) y en la parte inferior hay una banda muy tenue alrededor de 3 kb que corresponde al tamaño del inserto (el inserto tendría un tamaño de 276 pb). Los plásmidos de estas tres colonias fueron enviadas a secuenciar al Instituto de Fisiología Celular, UNAM y después de analizar las secuencias se corroboró que los plásmidos presentaron el inserto correctamente clonado en el vector y no contenía mutaciones (ver anexo 1). Para la expresión del propéptido se eligió la colonia 28.

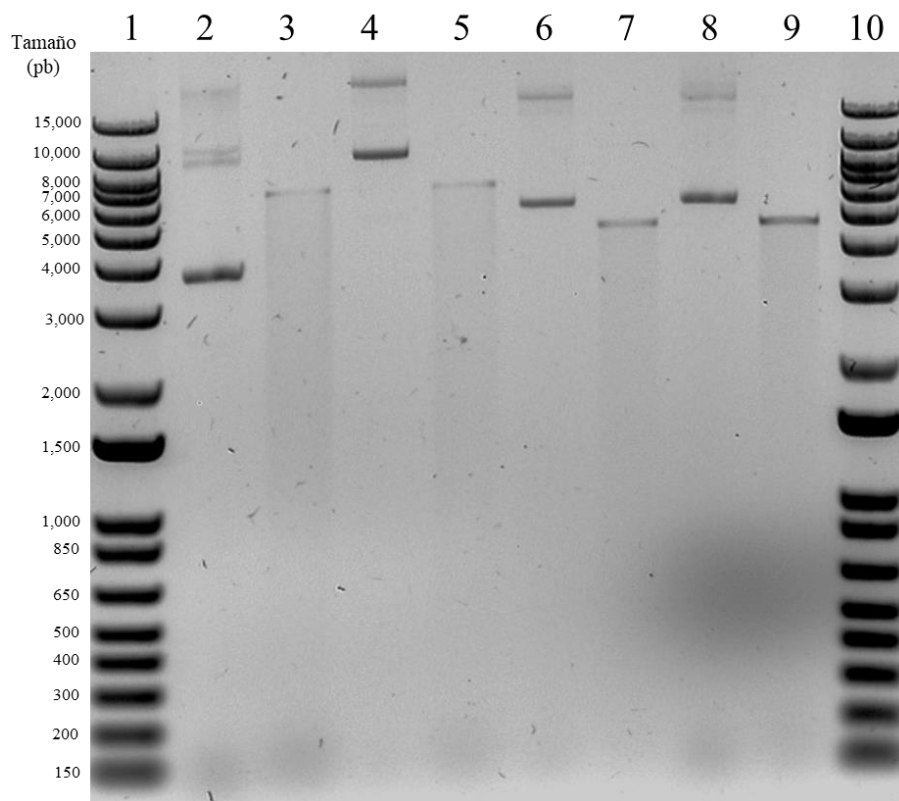


**Figura 25.** Restricción de las clonas resultantes de la transformación LanA\_6X en el vector pET-22b(+) en *E. coli* JM109. 0.8 % agarosa a 80 V por 1 hora. Carril 1) marcador Invitrogen™ de 1 kb Plus, 2) clona 18 sin digerir, 3) clona 18 digerido con *NdeI* y *EcoRI*, 4) clona 28 sin digerir, 5) clona 28 digerido con *NdeI* y *EcoRI*, 6) clona 34 sin digerir, 7) clona 34 digerido con *NdeI* y *EcoRI*, 8) clona 43 sin digerir, 9) clona 43 digerido con *NdeI* y *EcoRI* y 10) marcador Invitrogen™ de 1 kb Plus.

Los genes *lanB* y *lanC* amplificados por PCR, fueron clonados en los vectores pFGC y pFGC\_6XHis por medio de la técnica Golden Gate, usando la enzima *BsaI* para digerir los fragmentos y vectores. Esta técnica es bastante confiable, por lo que se decidió analizar solo una colonia resultante de la transformación. En la figura 26 se muestran los resultados del análisis de restricción de cada una de las transformaciones realizadas. Las construcciones pFGC-LanB y pFGC\_6XHis-LanB fueron digeridas con la enzima *EcoRV*, dichas construcciones tienen un sitio de corte en el inserto LanB. En los carriles 3 y 5 se muestra el análisis de restricción de las pFGC-LanB y pFGC\_6XHis-LanB respectivamente, en ambos

carriles se observó una sola banda correspondiente al tamaño esperado de las construcciones, para pFGC-LanB se espera un tamaño de 6.3 kb y pFGC\_6XHis-LanB de 6.4 kb.

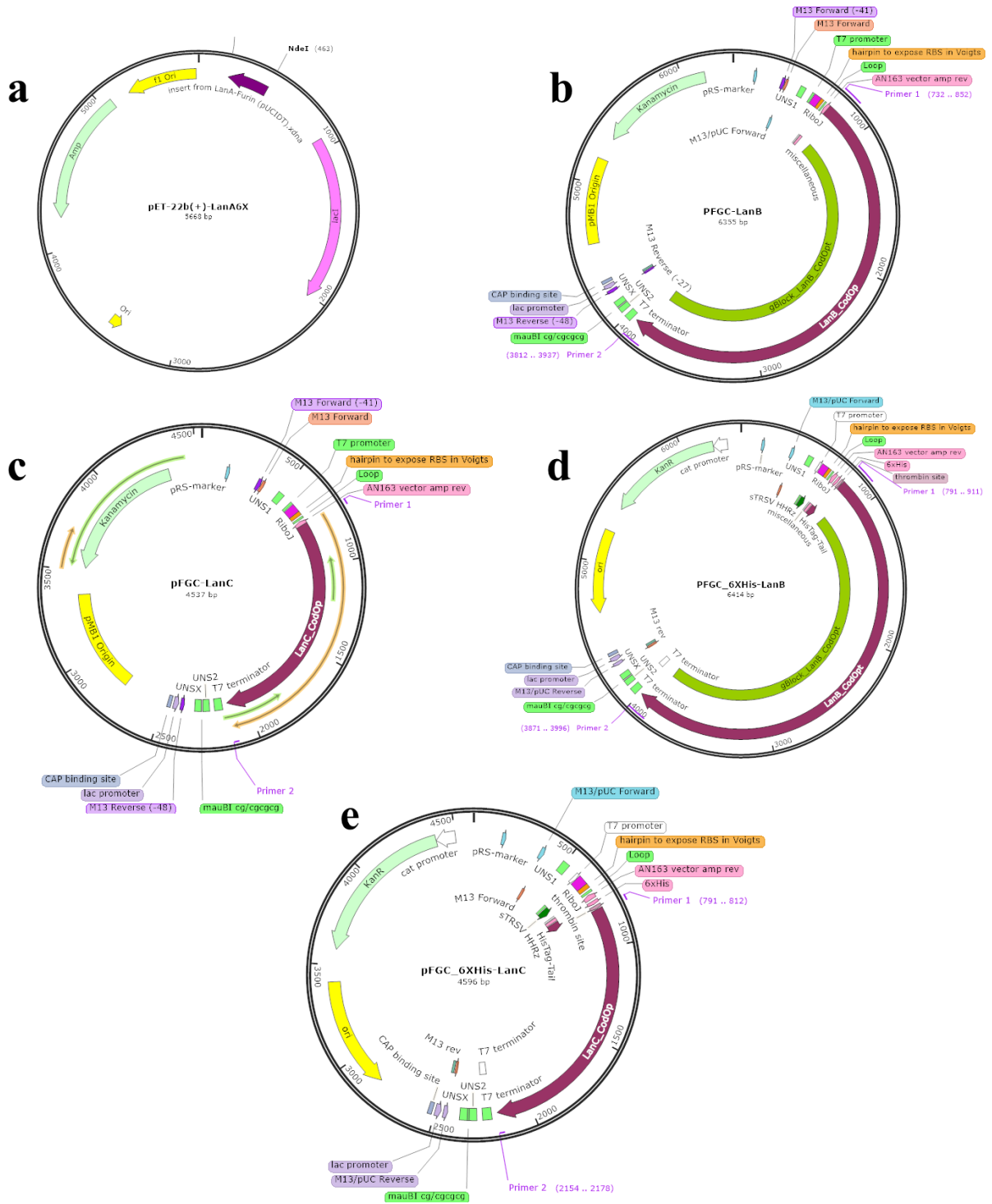
Las construcciones pFGC-LanC y pFGC\_6XHis-LanC fueron digeridas con la enzima *KpnI*, dichas construcciones presentan un sitio de corte en inserto *lanC*, por lo que también se espera solo una banda en el análisis de restricción. Los carriles 7 y 9 muestran los resultados de la digestión de las construcciones pFGC-LanC y pFGC\_6XHis-LanC respectivamente, en ambos carriles se observó una sola banda correspondiente al tamaño esperado de las construcciones. pFGC-LanC tiene un tamaño de 4.53 kb y pFGC\_6XHis-LanC de 4.59 kb. Los plásmidos de las colonias analizadas fueron enviadas a secuenciar al Instituto de Fisiología Celular y después de analizar las secuencias se corroboró que los plásmidos presentaron el inserto correctamente clonado en el vector y no contenía mutaciones (ver anexo 2, 3, 4 y 5).



**Figura 26.** Restricción de las clonas resultantes de la transformación de LanB y LanC en los vectores pFGC y el vector pFGC\_6XHis en *E. coli* JM109. 0.8 % agarosa a 80 V por 1 hora. Carril 1) marcador Invitrogen™ de 1 kb Plus, 2) clona pFGC-LanB sin digerir, 3) clona

pFGC-LanB digerido con *EcoRV*, 4) clona pFGC\_6XHis-LanB sin digerir, 5) clona pFGC\_6XHis-LanB digerido con *EcoRV*, 6) clona pFGC-LanC sin digerir, 7) clona pFGC-LanC digerido con *KpNI*, 8) clona pFGC\_6XHis-LanC sin digerir, 9) clona pFGC\_6XHis-LanC digerido con *KpNI* y 10) marcador Invitrogen™ de 1 kb Plus.

Los mapas de las construcciones obtenidas en este trabajo fueron diseñados *in silico* con el programa Snap Gene versión 6.0. En la figura 27 se muestran los mapas de dichas construcciones.



**Figura 27.** Mapa de las construcciones de expresión *in silico* realizadas en el programa Snap Gene versión 6.0. a) pET-22b(+)-LanA\_6X, b) pFGC-LanB, c) pFGC-LanC, d) pFGC\_6XHis-LanB y e) pFGC\_6XHis-LanC.

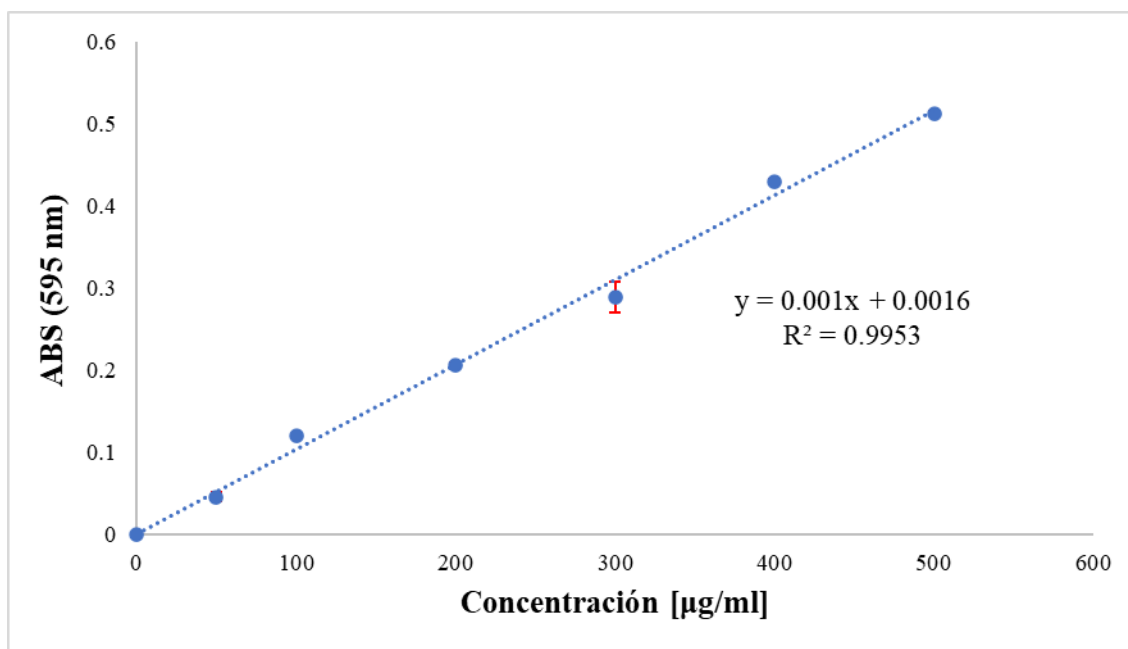


## **Expresión de los genes de interés**

Cada una de las construcciones pET-22b(+)-LanA\_6X, pFGC-LanB, pFGC\_6XHis-LanB, pFGC-LanC y pFGC\_6XHis-LanC fueron agregadas por separado a una reacción *cell-free* para expresar el propéptido y las enzimas del *core* biosintético (sin y con etiqueta His-Tag). Posteriormente, se eligieron algunas construcciones para ser colocadas dentro de un mismo tubo de reacción para lograr las modificaciones postraduccionales en el propéptido. De esta forma, el propéptido LanAm se digirió con la enzima Furin, para obtener el principio activo. Las muestras del extracto crudo *cell-free* y de las purificaciones provenientes de la expresión *cell-free* fueron cargadas en geles SDS-PAGE, debido a que el propéptido presenta un tamaño muy pequeño (10 kDa) no fue posible observarlo en este tipo de geles por la baja resolución para fragmentos de 10 kDa o menos, aunque se usaron geles del 16 % de acrilamida/bisacrilamida (imágenes no mostradas). Para este tipo de fragmentos, los geles Tricina SDS-PAGE son los más recomendados, se intentaron realizar este tipo de geles en varias ocasiones, sin embargo, no se tuvo éxito en su preparación, por lo tanto, después de varios intentos, se decidió monitorear la expresión de LanA\_6X como la producción del principio activo mediante el ensayo antimicrobiano.

## **Cuantificación de las proteínas**

La figura 28 muestra la curva de calibración realizada con diferentes concentraciones de BSA, por el método de Bradford. Los datos de las absorbancias obtenidos se promediaron y se graficaron. A partir de la recta se obtuvo la ecuación, la cual fue utilizada para calcular la concentración de las muestras. La gráfica tiene un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0.99, lo que indica que es bastante confiable.



**Figura 28.** Curva de calibración obtenida a partir de diferentes concentraciones de BSA cuantificado por el método de Bradford a 595 nm. Las barras rojas en vertical representan la desviación estándar de tres muestras.

Los resultados de la cuantificación de proteínas totales del extracto crudo *cell-free* para la expresión del propéptido y de las enzimas del *core* biosintético se muestran en el cuadro 17 y en el cuadro 18 se muestran los resultados de la cuantificación de las fracciones y las eluciones correspondientes a las purificaciones de LanB\_6X y LanC\_6X.

**Cuadro 17.** Cuantificación de proteínas totales del extracto crudo *cell-free*

| Muestra                              | Concentración (µg/µL) |
|--------------------------------------|-----------------------|
| Control positivo (proteína mScarlet) | 15.388                |
| Control negativo pET-22b(+)          | 13.048                |
| Control negativo pFGC                | 14.348                |
| pET-22b(+)-LanA_6X                   | 15.468                |

|                 |        |
|-----------------|--------|
| pFGC-LanB       | 13.648 |
| pFGC-LanC       | 14.708 |
| pFGC_6XHis-LanB | 14.848 |
| pFGC_6XHis-LanC | 15.728 |

**Cuadro 18.** Cuantificación de proteínas de las fracciones de purificación y elución de las enzimas LanB\_6X y LanC\_6X.

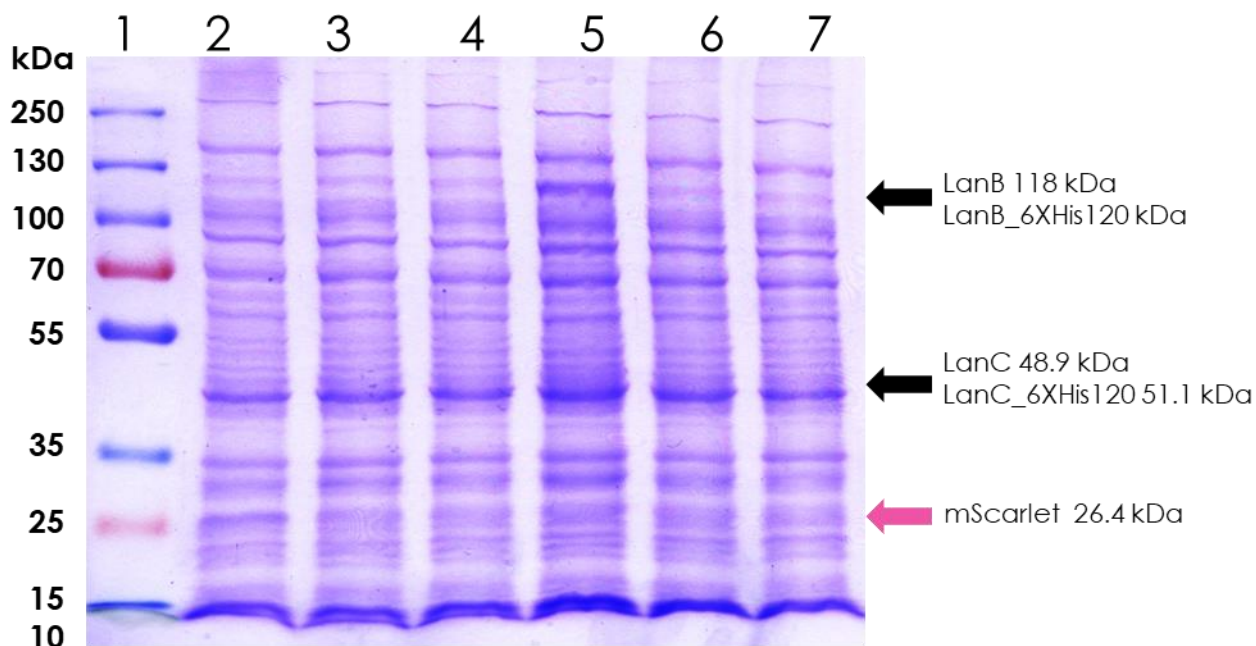
| Muestra | Fracción no unida ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) | Lavado 1 ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) | Lavado 2 ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) | Lavado 3 ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) | Elución 1 ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) | Elución 2 ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) |
|---------|---|--|--|--|---|---|
| LanB_6X | 9.448   | 0.6794                                 | 0.1014                                 | 0.0174                                 | 0.2764                                  | 0.1614                                  |
| LanC_6X | 13.288  | 0.8594                                 | 0.0834                                 | 0.0144                                 | 0.3944                                  | 0.3844                                  |

### SDS-PAGE extracto crudo *cell-free*

Una vez que las muestras fueron cuantificadas, éstas fueron corridas electroforéticamente en SDS-PAGE con la finalidad de observar la expresión de las enzimas del *core* biosintético (con y sin etiqueta His-Tag). En la figura 29 se muestran los resultados del SDS-PAGE de las muestras del extracto crudo *cell-free* en un gel al 10.5 % de acrilamida/bisacrilamida. En el carril 2 se observó una banda alrededor de 26 kDa, la cual corresponde a la expresión de la proteína mScarlet, usado como control positivo, el carril 3 corresponde al control negativo, el vector pFGC sin contener inserto. El carril 4 corresponde a la expresión de LanB, se esperaba una banda sobresaliente alrededor de 118 kDa, sin embargo, no se observó ninguna banda evidente, esto podría deberse a la baja cantidad de transcrito que se genera y/o baja o nula expresión de la enzima. El carril 5 muestra la expresión de LanB\_6X, se observó una banda evidente alrededor de 120 kDa, que corresponde al tamaño esperado de la expresión de LanB\_6X. Cabe mencionar que, debido a estos resultados, se repitió de nuevo la corrida electroforética del extracto crudo *cell-free* y los resultados fueron los mismos (datos no

mostrados). Investigando en la literatura, se reporta que la longitud y posición de las etiquetas His-Tag, pueden influir en la estabilidad de la expresión de las proteínas y sus efectos pueden ser tanto beneficiosos como perjudiciales (Mohanty y Wiener, 2004; Booth *et al.*, 2018), en el caso de la expresión de LanB\_6X, podría ser un efecto beneficioso, al expresarse una mayor cantidad del producto en comparación cuando no se tiene la etiqueta His-Tag, sin embargo, se tendrían que realizar más estudios sobre la cantidad de transcrito que se genera y la influencia de la etiqueta His-Tag en la estabilidad de estas enzimas.

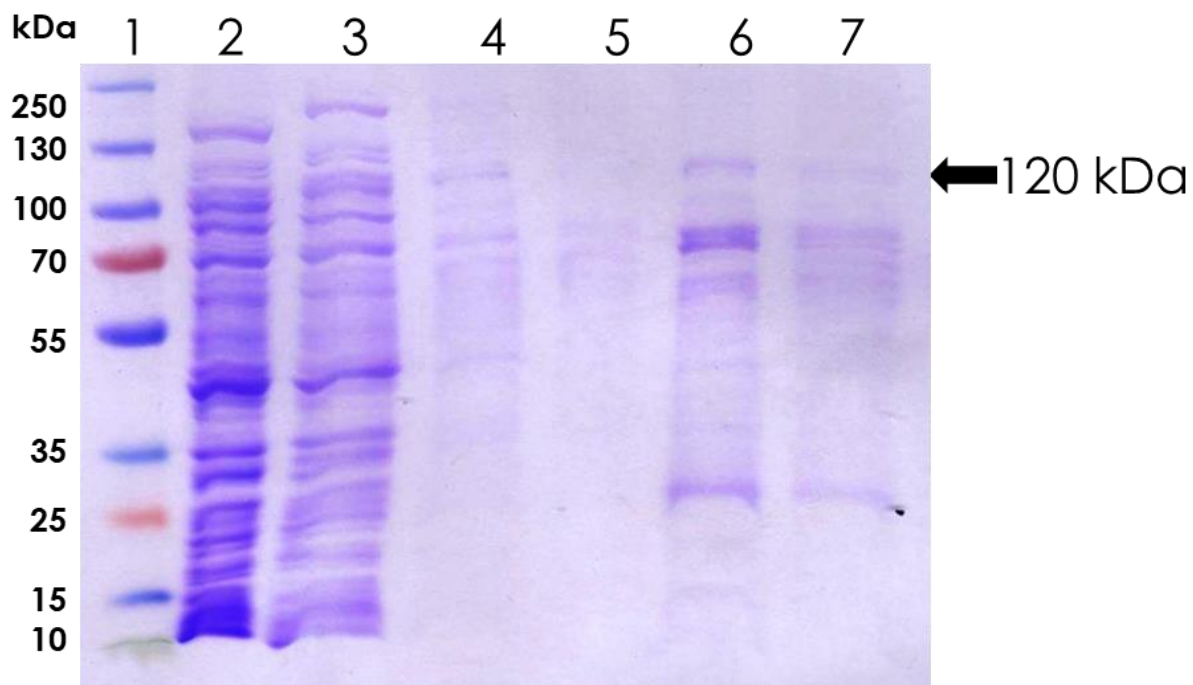
Los carriles 6 y 7, corresponden a la expresión de las enzimas LanC y LanC\_6X, respectivamente, en estos carriles se esperaban bandas evidentes alrededor de 48.9 y 51.1 kDa, sin embargo, no se observaron, lo cual podría ser consecuencia de la baja cantidad de transcrito que se produce y/o puede existir un problema con la expresión de dichas enzimas. Debido a este resultado, se decidió llevar a cabo la purificación de las enzimas que presentan una etiqueta His-Tag para concéntralas y de esta manera observar en un gel SDS-PAGE si se expresaba al menos una pequeña cantidad de estas enzimas.



**Figura 29.** SDS-PAGE (10.5 % de acrilamida/bisacrilamida) del extracto crudo *cell-free* de la expresión de las enzimas del *core* biosintético por separado. Carril 1) Marcador PageRuler

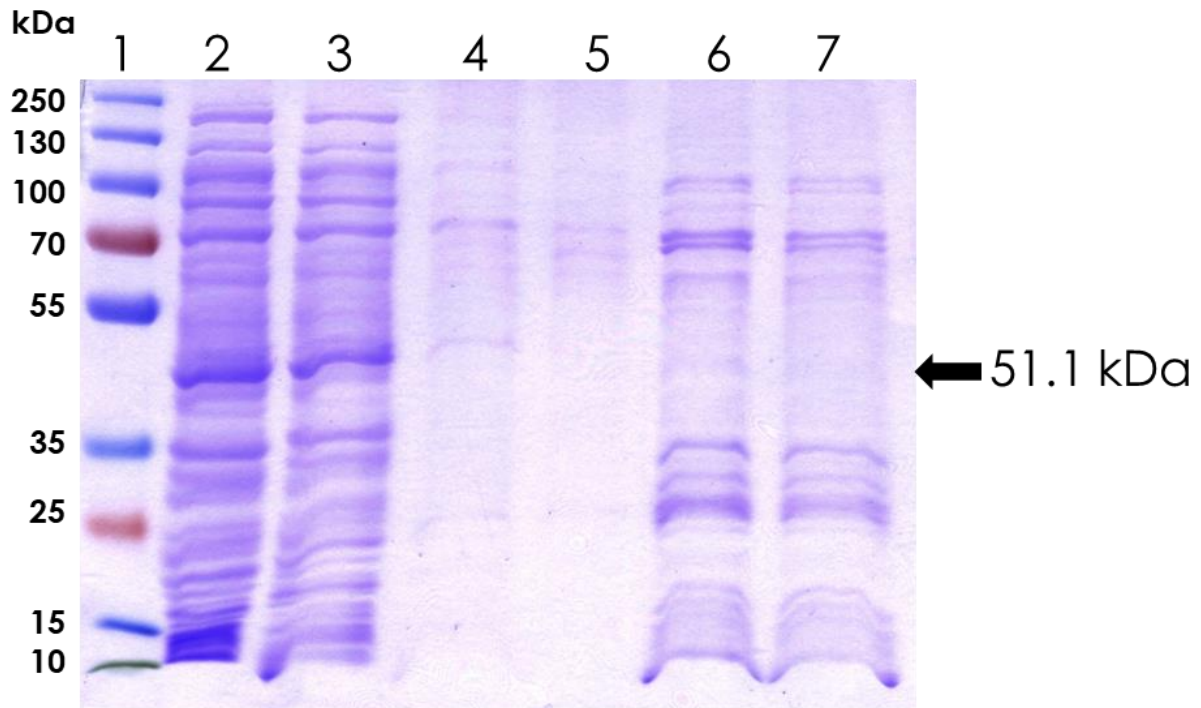
Plus Prest Protein Ladder, de la casa comercial Thermo Scientific™, 2) control + (expresión de la proteína mScarlet), 3) control negativo (vector pFGC), 4) expresión de LanB, 5) expresión de LanB\_6X, 6) expresión de LanC y 7) expresión de LanC\_6X. Se colocaron 18 µg de muestra en cada carril. Las flechas color negro indican el tamaño donde se espera que se encuentren las enzimas, mientras que la flecha en rosa indica el tamaño esperado de la proteína control.

En las figuras 30 y 31 se muestran los resultados de las purificaciones de LanB\_6X y LanC\_6X, respectivamente. En la figura 30, el carril 2 corresponde a las proteínas no unidas a la columna, los carriles 3, 4 y 5 corresponden a los lavados, los carriles 6 y 7 corresponden a la primera y segunda elución de LanB\_6X, respectivamente. En estos últimos carriles se observaron bandas alrededor de 120 kDa, las cuales no fueron observadas en los demás carriles (proteínas no unidas a la columna ni en lavados), por lo que, de acuerdo al peso molecular, se trata de la expresión de LanB\_6X. En la primera elución (carril 6), se observó una banda más intensa que en la segunda elución (carril 7), esto quiere decir que la mayor parte de la enzima se encuentra en la primera elución.



**Figura 30.** SDS-PAGE (10 % de acrilamida/bisacrilamida) de la purificación de LanB\_6X. Carril 1) Marcador PageRuler Plus Prest Protein Ladder, de la casa comercial Thermo Scientific™, 2) fracción no unida, 3) lavado 1, 4) lavado 2, 5) lavado 3, 6) elución 1 y 7) elución 2. De la fracción no unida se colocaron 18  $\mu\text{g}$  de muestra, mientras que de los carriles 3-7 se colocaron 10  $\mu\text{l}$  de muestra. La flecha color negro indica el tamaño donde se espera que se encuentre la enzima LanB\_6X.

La figura 31 corresponde a la purificación de LanC\_6X, en el carril 2, se muestran las proteínas no unidas a la columna, los carriles 3, 4 y 5 muestran los lavados, los carriles 6 y 7 corresponden a la primera y segunda elución de la enzima, respectivamente. En el carril 6 se observó una banda tenue alrededor de 51 kDa, de acuerdo al peso molecular de LanC\_6X correspondería a dicha enzima, en el carril 7, que corresponde a la segunda elución, esta misma banda se muestra mucho más tenue.



**Figura 31.** SDS-PAGE (11 % de acrilamida/bisacrilamida) de la purificación de LanC\_6X. Carril 1) Marcador PageRuler Plus Prest Protein Ladder, de la casa comercial Thermo Scientific™, 2) fracción no unida, 3) lavado 1, 4) lavado 2, 5) lavado 3, 6) elución 1 y 7) elución 2. De la fracción no unida se colocaron 18 µg de muestra, mientras que de los carriles 3-7 se colocaron 10 µl de muestra. La flecha color negro indica el tamaño donde se espera que se encuentre la enzima LanC\_6X.

A través de la plataforma *cell-free* se expresaron las posibles enzimas del *core* biosintético, de acuerdo al tamaño de las bandas esperadas, las cuales solo fueron evidenciadas cuando se purificaron por medio las columnas Ni-NTA Spin Kit Handbook Quiagen®. Ambas bandas se observaron en mayor concentración en la primera elución. Sin embargo, faltaría realizar el western blot de estas bandas para corroborar su identidad por medio de la etiqueta His-Tag y monitorear su producción, así también medir la cantidad de transcrito por RT-qPCR. La banda correspondiente al tamaño de LanC\_6X se observó muy tenue, probablemente se debe a la baja expresión. Esta limitante, podría ser superado colocando un mayor número de microtubos de reacción (Guzmán-Chávez *et al.*, 2022).

La expresión por *cell-free* permite obtener en un menor tiempo la producción de las proteínas de interés (Liu *et al.*, 2020; Guzmán-Chávez *et al.*, 2022), por ello, la primera ventaja de este método es la eficiencia, como segunda ventaja es que la producción de estas enzimas no depende del crecimiento celular, descartando que la producción de las proteínas se vaya a cuerpos de inclusión (Garenne *et al.*, 2021). De acuerdo con Li *et al.*, 2009, las enzimas LanB y LanC en la expresión convencional (con células), se encuentran la fracción soluble del cultivo celular después de la sonicación y centrifugación, sin embargo, esto depende mucho de las condiciones de cultivo como temperatura, concentraciones de IPTG, tiempo de inducción, rpm, medio de cultivo, cepa, concentración de antibióticos, etc. (Tolia y Joshua-Tor, 2006). Por otro lado, se ha reportado que el propéptido LanA se encuentra en la fracción del pellet (Li *et al.*, 2009), para purificar al propéptido, es necesario utilizar agentes desnaturalizantes, los cuales podrían interferir con la actividad de las enzimas del *core* biosintético una vez que se lleve a cabo la reacción *in vitro* de la biosíntesis del principio activo (LanAm/F), si no se purifica correctamente. Otra ventaja que la expresión por *cell-free* ofrece, son los esfuerzos que se han realizado para reducir los costes de fabricación. Recientemente, Guzmán-Chávez *et al.*, 2022 desarrollaron un conjunto de estrategias alternativas para lograr la producción e implementación de extractos *cell-free* con solo \$ 177 USD, sin el uso de equipos costosos.

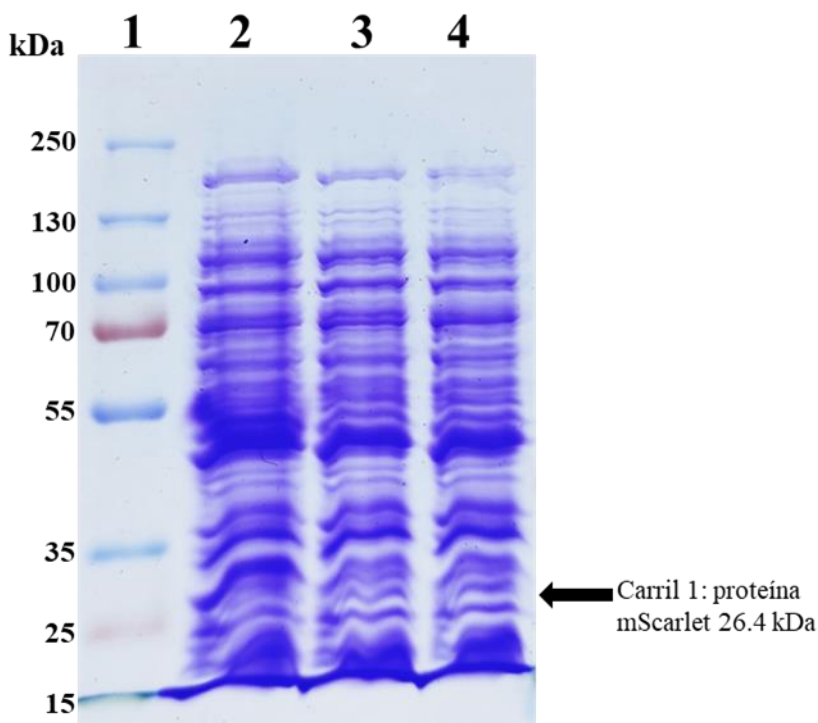
### **Expresión de LanA modificado (LanAm)**

Conforme a los resultados de los SDS-PAGE, se logró visualizar la expresión de las enzimas del *core* biosintético de acuerdo al peso molecular, cuando éstas fueron purificadas (figura 30 y 31), en el caso de LanB\_6X su expresión se logró visualizar desde el extracto crudo *cell-free* (figura 29), por lo tanto, se eligieron las construcciones de las enzimas que presentaban la etiqueta His-Tag, asumiendo que estas etiquetas le proveen de cierta estabilidad a las enzimas, evitando su degradación. Las construcciones pFGC\_6X-LanB y pFGC\_6X-LanC junto con la construcción pET-22b(+)-LanA\_6X, cofactores, ARN y PEG-8000 fueron colocados dentro de un mismo tubo de reacción para obtener LanAm y posteriormente, el principio activo (LanAm/F). A continuación, en la figura 32 se presenta el resultado del SDS-PAGE, donde se esperaría que estén las bandas correspondientes a la



expresión de LanAm (10 kDa), LanB\_6X (120 kDa) y LanC\_6X (51.1 kDa) de un mismo tubo de reacción, sin embargo, no fue posible visualizar estas bandas. Como se mencionó anteriormente, esto podría deberse a la baja cantidad de transcrito que se genera, un problema con la traducción de las proteínas o incluso otros mecanismos involucrados en la estabilidad del propéptido y de las enzimas del *core* biosintético.

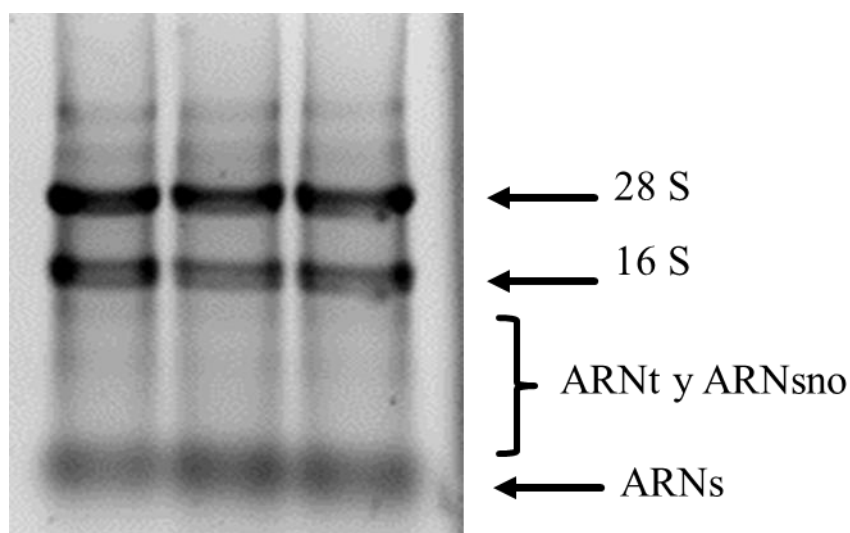
Para corroborar la presencia de las enzimas y del propéptido, se decidió monitorear la producción del principio activo a través de su actividad antimicrobiana, lo cual se logró colocando 50 microtubos de reacción, estos tubos fueron concentrados y luego se digirió a LanAm con la enzima Furin.



**Figura 32.** SDS-PAGE (10.5 % de acrilamida/bisacrilamida) del extracto crudo *cell-free* de la expresión de las enzimas del *core* biosintético y del propéptido en un mismo tubo de reacción. Carril 1) Marcador PageRuler Plus Prest Protein Ladder, de la casa comercial Thermo ScientificTM, 2) control + (expresión de la proteína mScarlet), 3) control negativo (vectores vacíos pET-22b(+) y pFGC\_6XHis), 4) expresiones de LanA\_6X, LanB\_6X y LanC\_6X.

### Adición de ARN total a las reacciones *cell-free*

Como se había mencionado anteriormente, la adición de ARNt a la reacción *in vitro* para la formación de LanAm es necesario para que LanB glutamile las cadenas laterales Ser/Thr del propéptido (LanA) como parte del proceso de deshidratación (Ortega *et al.*, 2015). La incorporación de ARNt fue agregado como ARN total. En la figura 33, se presenta el resultado de la extracción de ARN total de *Embleya* sp. NF3.



**Figura 33.** Extracción de ARN total de *Embleya* sp. NF3. 0.8 % agarosa, 80 V por 1 hora. Las primeras dos flechas superiores representan a las subunidades 28 S y 16S, seguido de los ARN de transferencia (ARNt) y los ARN nucleolares pequeños (ARNsno), en la parte inferior se encuentran los ARN pequeños bacterianos (ARNs).

### Ensayo antimicrobiano

A continuación, se presentan el resultado del ensayo antimicrobiano frente a *Micrococcus luteus* de diferentes extractos *cell-free* que contiene al propéptido modificado (LanAm), el principio activo (LanAm/F), los respectivos controles negativos y como control positivo, la adición de nisina. Estudios previos han demostrado que *M. luteus* es una cepa modelo para

evaluar el potencial antimicrobiano de los lantipéptidos, al ser una bacteria Gram-positiva, permite al principio activo llegar a su blanco más fácil, el lípido II, el cual se encuentra en la membrana celular interna, en comparación con una Gram-negativa, por la doble membrana celular (Arnison *et al.*, 2013; Dischinger *et al.*, 2014). Como se observó en la figura 34, el control positivo (pozo 1), la nisina (un lantipéptido de clase 1) fue capaz de inhibir el crecimiento de *M. luteus*. En el pozo 2 se encuentra la mezcla donde se produce LanAm, sin tratamiento con la endoproteinasa, por lo tanto, el péptido líder, sigue unido al péptido *core*. Se ha reportado que el propéptido no escindido puede tener actividad muy reducida o nula (van Kraaij *et al.*, 2000; Xie *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2007), lo que proporciona más evidencia de que el agente antimicrobiano activo se encuentra cuando la enzima Furin fue agregado a la mezcla de reacción (LanAm/F), lo cual se evidenció con el halo de inhibición en el pozo 3. Para corroborar que el principio activo (LanAm/F) fue el que provocó el halo de inhibición y no los componentes *cell-free* o la endoproteinasa, se colocaron dos controles negativos, uno con el extracto *cell-free* con los plásmidos vacíos (pozo 4) y otro con el extracto *cell-free* con los plásmidos vacíos y la enzima Furin (pozo 5), de esta forma, se concluye que LanAm/F tiene actividad antimicrobiana frente a *M. luteus*.



**Figura 34.** Ensayo antimicrobiano del principio activo LanAm/F frente a *M. luteus* en medio TBS. Pozo 1) control positivo, Nisina Additius® 1 mg/ml (10  $\mu$ l), 2) LanAm (propéptido

modificado), 3) LanAm/F (principio activo, LanA modificado y digerido con la enzima Furin), 4) control negativo, vectores vacíos pET-22b(+) y pFGC\_6XHis y 5) control negativo, vectores vacíos pET-22b(+) y pFGC\_6XHis digeridos con la enzima Furin. Este experimento se realizó por duplicado.

Cheng *et al.*, 2007, probaron la actividad antimicrobiana de la nisina sintetizada *in vitro* mediante RTS frente a *M. luteus*, reportan que la concentración aproximada de nisina en la reacción RTS fue de aproximadamente 2 µg/ml y 3 µl de la mezcla de reacción fueron suficientes para inhibir el crecimiento de esta cepa. En otro estudio publicado por Liu *et al.*, 2020, reportan el desarrollo de CFPS para la producción de nisina Z, ellos concentraron 400 µL de la mezcla de reacción a 20 µl y usaron 2 µl de la mezcla concentrada para obtener un halo de inhibición evidente frente a *M. luteus*, sin embargo, discuten que la expresión del propéptido modificado fue muy bajo comparado con la producción de nisina que se obtiene a través de la expresión convencional (usando células), así llegan a la conclusión que la baja eficiencia de producción de nisina Z se debe a la baja expresión de las enzimas biosintéticas responsables de las modificaciones postraduccionales de la nisina (NisB y NisC). Para superar esta limitante, deciden sobreexpresar NisB y NisC con etiquetas His-Tag en *E. coli* y luego purificarlos para ser añadidos a la mezcla de reacción *cell-free*, lo que trajo como resultado una mayor acumulación de principio activo. Debido a que, en este trabajo, el western blot no reveló la presencia de LanA\_6X, posiblemente por la poca acumulación del propéptido en un tubo de reacción, se decidió concentrar el producto con la expresión de LanAm de 50 tubos de reacción y posteriormente, éste fue escindido con la enzima Furin para lograr un halo de inhibición evidente. En futuras investigaciones se pretende mejorar la eficiencia de la producción del principio activo, estudiando más a fondo la cantidad de transcrito que se genera, su expresión, así como la estabilidad de las enzimas del *core* biosintético y del propéptido.

## CONCLUSIONES

- Los genomas de *Streptomyces* sp. L06 y *Embleya* sp. NF3 poseen clústeres de genes biosintéticos potenciales que codifican para lantipéptidos.
- El genoma de *Embleya* sp. NF3 posee clústeres de genes biosintéticos codificantes de lantipéptidos de clase I y II, los cuales se han reportado que poseen actividad antimicrobiana.
- El clúster biosintético 1.4 de *Embleya* sp. NF3 codifica para un lantipéptido de clase I y se predice que posee el mayor número de modificaciones postraduccionales en comparación con los demás clústeres analizados, lo que teóricamente le confiere mayor resistencia frente a la degradación por proteasas y por calor.
- El clúster biosintético 1.4 de *Embleya* sp. NF3 contiene los genes necesarios para la producción del principio activo. Los genes *lanA*, *lanB* y *lanC* fueron seleccionados para ser expresados de forma heteróloga en la plataforma *cell-free*.
- Las bandas correspondientes al peso molecular de las enzimas biosintéticas con etiquetas His-Tag se evidenciaron cuando éstas fueron purificadas, por esta razón, solo las construcciones con etiqueta His-Tag fueron seleccionadas para la generación del principio activo.
- El principio activo (LanAm/F) generado en este trabajo, presentó actividad antimicrobiana frente a *M. luteus*.

## PERSPECTIVAS

- Conocer cuáles son los pasos limitantes en la reacción de *cell-free*.
- Realizar un análisis de expresión por RT-qPCR de los genes expresados.
- Estandarizar el western blot de las enzimas y del propéptido.
- Estudiar la estabilidad de las enzimas LanB, LanB\_6X, LanC y LanC\_6X, así como del propéptido LanA\_6X.
- Cuantificar la producción del principio activo.
- Realizar pruebas antimicrobianas frente a otras cepas patógenas Gram-positivos y Gram-negativos.
- Secuenciar el principio activo y las enzimas del *core* biosintético.
- Caracterizar estructuralmente el principio activo.

# ANEXO

## Anexo 1

### Secuenciación de LanA\_6X colonia 28

CATATGCACCATCATCACGGTCATCACCACCATAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCGGTTCTGGAAGCGCAGCAGC  
ACCTAAGATGACCGATCGTATTCTGCTCGAAGAAACCACCGAAACCCGTGATTTTGTGGATCTGGATCTGGATGTGCGTA  
TTGCGGAAGGCGAACTGCGTGCGCGTCTGTGATTTTCGGCAAAGATTGCCCGGTGACCTATAGCCCGAACGCCACCAGCGGC  
GTGCAGAGCCGTTGCATTCCGTGCTGCTAAGAATTC

### Secuenciación de LanA\_6X colonia 34

CATATGCACCATCATCACGGTCATCACCACCATAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCGGTTCTGGAAGCGCAGCAGC  
ACCTAAGATGACCGATCGTATTCTGCTCGAAGAAACCACCGAAACCCGTGATTTTGTGGATCTGGATCTGGATGTGCGTA  
TTGCGGAAGGCGAACTGCGTGCGCGTCTGTGATTTTCGGCAAAGATTGCCCGGTGACCTATAGCCCGAACGCCACCAGCGGC  
GTGCAGAGCCGTTGCATTCCGTGCTGCTAAGAATTC

### Secuenciación de LanA\_6X colonia 43

CATATGCACCATCATCACGGTCATCACCACCATAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCGGTTCTGGAAGCGCAGCAGC  
ACCTAAGATGACCGATCGTATTCTGCTCGAAGAAACCACCGAAACCCGTGATTTTGTGGATCTGGATCTGGATGTGCGTA  
TTGCGGAAGGCGAACTGCGTGCGCGTCTGTGATTTTCGGCAAAGATTGCCCGGTGACCTATAGCCCGAACGCCACCAGCGGC  
GTGCAGAGCCGTTGCATTCCGTGCTGCTAAGAATTC

## Anexo 2

### Secuenciación de LanB colonia 1

ATGCGCCATTCCGAGCAGGACGACGCGGGCGCGGCGATGGCCCGCATGAAGGCTATGACGACGCCCGGGAGATGAAGATA  
CATACCGTCTGCCGGCCCCATCTTTGTTTCGATGGCTAGCGTGCCATGTGCAGAGCCCGAGCCTGATGCTGTCCACAGTT  
CTGCAGACCCAGCTGATGCGGAGACGCCCCCGCTCTGCGCCGCGCTACAGCTGACCCCTTTATTCCGTGAGGCTTTAGGAA  
TCGCAGGCGGATCTCTGTACGCGGCTTAGACCGCTTGACGCGGGGATCGATCCCGGACAAAACGCTTGCGCGGGATG  
GCGATGAGCGTATCTCGCTACGCACTGCGCATGAGTGGACGTCGCCGACGCCCTTTTGGCCTGTTCGCCGGGGTAGCAACCG  
GCGCTTTGGCCAAATGCGCGTGTGTGGTGGCGTGGGCATGCTGCGAAGGCAGTTCGTCTGGACGCCGAACGTTTACACG  
AGCGTGTACAGGCGTGGTTGGCACTTCCAGAAGTCCGAGTCCGCTGGACGTTGTTAAATGATTTGTCGCGGTTCTGTT  
ATGGCCGCTTATTCTGCCCGGTCCAACCTCGTGAGTTAAGCGTCCGCCACTCCGCGCTTGTGGAGCACGTTTGTGCGACCG  
TAACTCATCCTGTACCATATGAGTCAGTGTGGACCGCACTGCCGAGGCATTTCTGACGCGCCTCGTGATCGCCTGGACG  
CAGCGGTGCGCAGCTGCTGCGTTACGGCTTTCTGATTAGCTCAATTACCCCCACCCTTAGACGATGCGTTATTTCGACC  
GCATCGTGGCGGATCGAAGAGTTGCCCGAAGCCGCTGCCACTTTCCGCGCCACCCGATTGACAGTACGTAATACGAA  
AAAGTCCCACCAGGAGAAGGAGGGGATGCATGGCGCCGTTAACGGCTTTACTTGACCCGGATGCTGATACCGACCATCC  
CCCGGCCAAGTGGACTTACGCATGGACGCTGATATTGTAAGTGCCTACCGCTGTGGGCGACGAGGCTGCTGCATACGCA  
ATGCGATGTGGGCACTTTCCGACGCAATGGTCACTCATTTGCACATGCGTGACTATCGTGACCGTTTTTTGGATCGTTACG  
GAACACCCGTTGGTGCCTCTGGCCGAGTTGGTGGATCCGCATCGTGGATTTGGTTTTCTTCTGGCTATGAGCCCGCCC  
GTGCAGGGGGGGGCCCGCCAGACGATTACCGTGCCGACCGTGACCGTCTGTCTTGACGGCAGAATTAGTACAAGAG  
GCGCTTCTGGGAGACGACCGTGAGTTACGCCTTACGCCTGATTTGATCGAACGCTCTGGCTGCCACAATGCGCCCTGAAGGG  
GATGTTCCAGCCCCCGCCGAACAGTTTGGAGTAAATTTGCAGTTATTAGCTGACGATACTGCAGCTTTGACGAGGGC  
CGTTTTCGTTTGTATTGGTTCCGCTCAGGCTGGGTCTGGCTGGCTGGCGCGATGACGGGCCGCTTTGCCGAGTTGACAGAC  
ATGACTGAAGAGCTTGTGGCCTTGTAGCTGTGACGCTGACCCCGGACTGTTCCGGCCAGATCTCATTCCGCGCCGACA  
GGACCGCGTGCCTGAACATGTCTCAGTACCGGAACCTGCTGCCGATCCGCATTCCCGTCCGTTTTCGCTGATCGTAAAC  
GACCCACATTGTTTGGACTGGCGGAGCTGTTGGTAGGTTTATAGTCCAATTGGACTGACATTACTGATGCCGGACACGGGA  
CGCCGCTACTTCCAGTCTGATCCCATATGGTGGCCTTGGATCACTGGGCTCCAGAAGTCTGCTTCCGCTTATGGTTGATATC  
GCGTTCCGGCGCAGCCGACCTGGACCGGTGGGATTTGGGCCGCTTGTAGGTAAGTCCACAACCTCCCGCTGTACGCA  
CGGCGCGTTGTAGCAGCCCCCGTCTGCTGGATCCCGTCCGCGGCCATGCGCGCTAGTGTAGGCGAGCCTCGCGAATTTGA  
CCGTGCCCTTCCGAGTGGAGTACGCTACGAAGTCCCGATCGTGTGCAATTGGTGCACGCGCACCCGCCCCACGGGT  
TAGACCTGACTCGGCATGGCACCGTACTTTCGCCATGAGATGCGTCTGATGCCGATCGCCTTACTTGAAGACTTAA  
CGGAACGCGGCCGCGGATGTGGTTGGGCTGCCGGACACCGCACCGAATTAGTAGTACCATTAGTTCGTCGTCCTACG  
CGACAACCCGCCAGACGTGCCCGGCTGCTCGCATTCGGCACCTTTGCCTGACCGCTATCATCTGCCCGGTGAG

GATTGGTTGTTTCGTCAAACTGTACGCCATCCCAGGGACACATGACGAACTGCTTCGTA CTCTGCCAACGCTGTTAGAC  
ACGGTAGGGGGGCATATTGACCCTGGTTTTTATCCGTTATTTAGACCCACGTCCACATGTGCGTGTTCGCTTACACGGG  
GATCCCGCCCTTGCAGCTATGAACCGGAAACCGACCGTTACGCCGGACCGGACGCTTTGGTTGCTGCAGAGCGCTTATTC  
AGTATGGCCCTTGACGTATGAACCGGAAACCGACCGTTACGCCGGACCGGACGCTTTGGTTGCTGCAGAGCGCTTATTC  
ACTTTAGATTTCGCGCTCGGCCTTGGCGCAACTTGGTATGCGTGCACGCGGAGGACTGGCGGTGCCAACGAAGTCTTGATC  
GCCGTCAACCACGCACTGTTGTTGGAGTCTCTTGGCGACTGGGATTGGTGTTCATGGGTGGTATCTGCTTTCGTGAAAGGT  
CCCGCACAAACCGTATTTCCGCCGTACCGTCCCTTAGTTCCGCAACTTATTCGCTCTGGTCTACAGCAGCCGCTGTTGAA  
CAACGCTTGGCGTTTCAGCTTTGGCTGACATGTGGACTCGCCCTGCCGAAGGCCGCGCATATGGACGTACGGTGTCTTCT  
GATCCCGCCCGCCCTGCGAATGCGCGTCACGAAAATGCATTATTAGGGTTGTTGCACATGCAACATAACCCGCTTTTG  
GGCATTGACCGCGCTAGTGAGGGTCTGGATATGCCATCTTACGCGGCATCGTAGTGATCATCTTGGCCGCTTGGCACAC  
CCTCCACGCCAGTGGCCTACTGATGTTGAAGGTGACCGTCGCGATGATGGATGA

### Anexo 3

#### Secuenciación de LanB\_6X colonia 1

TACAATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCAAATGCGCCATTCCGAGC  
ACGAGCACGGGCGCGCGGATGGCCCGCATGAAGGCTATGACGACGCCCGGAGATGAAGATACATACCGTCTGCCGG  
CCCCATCTTTGTTGCTATGGCTAGCGTGCCATGTGCAGAGCCGAGCCTGATGCTGTACACAGTTCTGCAGACCCAGCTGA  
TGCGGAGACGCCCCCGCTCTGCGCCGCGCTACAGCTGACCCTTTATCCGTGAGGGCTTAGGAATCGCAGGCGGATCTCT  
GTCAGCGCGCTTAGACCGTCTTACGCGGGGATCGATCCCGACCAAAACGCTTGCAGCGGATGGCGATGAGCGTATCTC  
GCTACGCACTGCGCATGAGTGGACGTCCGACGCTTTTGGCTGTTCCGCGGGGTAGCAACCGGGCGCTTTGGCCCAAATG  
CGCGTGTGTTGGTGCCTGGGCATGCTGCGAAGGCAGTTCGCTGACGCGCAACGTTTACACGAGCGTGTACAGGCGTGG  
TTGGCACTTCCAGAAGTCCGCACTGCGTGGACGTGGTATTAATGATTTGTCGCGGTTCTGTGATGGCCGCTTATTCTG  
CCCGGTCCAACCTCGTGAAGTAAAGCGTCCGCCACTCCGCGCTTGTGGAGCACGTTTGTGCGACCGTAACTCATCCTGTACCA  
TATGAGTCAGTGTGGACCGCACTGCCGAGGCATTTCTGACGCGCCTCGTGTATCGCCTGGACGCGAGCGGTGCGCAGCTG  
CTGCGTTACGGCTTCTGATTAGCTCAATTACCCCCACCGTTTAGACGATGCGTATTTCGACCGCATCGCTGGCGCGATCG  
AAGATTGCCCGAAGCCGTGCCACTTCCGCGCCACCCGTATTGCAGTACGTAACGAAAAAGTCCACAGGAGAA  
GGAGGGGATGCATGGCGCCGCTTAAACGGCTTACTTACCCGGATGCTGATACCGACCATCCCCGGCCAAAGTGGACTT  
ACGCATGGACGCTGATATTGACTGCCTACCGCTGTGGGCGACGAGGCTGCTGCATACGCAGATGCGATGTGGGCATTTT  
GGACGCATGGGTCACCTATTGCACATGCGTGACTATCGTGACCGTTTTTTGGATCGTTACGGAACCCCGTCTGGTGCC  
TCTGGCCGAGTTGGTGGATCCGCATCGTGATTTGGTTTTCTTCTGGCTATGAGGCCCGCGTGCAGGGGGGGCCCCCG  
CCCAGACGATTACCGTGCCGACCGGTGACCGTGTCTTACGCGCAGAAATTAGTACAAGAGGCGCTTCTGGGAGACGACC  
GTGAGTTACGCCTTACGCCTGATTTGATCGAACGCTCTGGCTGCCACAATGCGCCCTGAAGGGGATGTTCCAGCCCCCGC  
CGAACAGTTTGGAGTTAAATTTGCAGTTATTAGCTGACGATACTGCAGCTCTTACGAGGGCCGCTTTCGTTTGATTGGTT  
CCGCTCAGGCTGGGCTCTGGCTGGCTGGCGCGATGACGGGCCGCTTTGCCGAGTTGACAGACATGACTGAAGAGCTTGT  
GGCCTTGTAGCTGCTGACGCTGACCCCGGACTGTTCCGGCCAGATCTCATTGCGCCGACAGGACGCGGTGCGCTGAAC  
ATGCTCAGGTACCGAACTGCTGCCGTACCGCACTCCCGTCCGTTATCATGCTGATCGTAACGACCACATTGTTTGGAC  
TGGCGGAGCTGTTGGTAGGTTAGATCCAATTGGACTGACATTACTGATGCCGGACACGGGACCGCGTACTTCCAGTC  
GTACCCCATATGGTGGCCTTGGATCACTGGGCTCCAGAAGTCTTCCGCTTATGGTTGATATCGCGTTCCGGGCGCAGCCGC  
ACCTGGACCGGTTGGGATTTGGCCGGTCTTGAAGTACTGCCACAACCTCCCGTGTACGCACGGCCGCGTTGTAGCAGCC  
CCCCGTGCTGGATCCCGTCCGCGGCCATGCGCGCTAGTGTAGGCGAGCCTCGCGAATTTGACCGTGCCTTCCGCGAGTGG  
AGTATCGCTACGAAGTCCCGATCGTGTGCAATTGGTTCGACGGCGACCGCGCCACGGGTTAGACTGGACTCGGCATG  
GCACCGCACGTTACTTCCCATGAGATGCGTCTGAGCCGATCGCCTTACTTGAAGACTTAAACGGAACCGCGCCGCGGAT  
GTGGTTGGGCTGCCGACACCGCACCAATTAGTAGTACCATTAGTTTCGTCGTCCTACGCGACAACCCGCCAGACG  
TGCCCGCGTGCCTGCTGCATTCCGGCACCTTTGCCTGACCGCTATCATCTGCCCGGTGAGGATTGGTTGTTCTGTCAAACT  
GTACGCCATCCCAGGGACACATGACGAACTGCTTCGTA CTATCGCAACGCTGTTAGACACGGTAGGGGGGCATATTG  
ACCGCTGGTTTTTATCCGTTATTTAGACCCACGTCCACATGTGCGTGTTCGCTTACACGGGGATCCCGCCCGCTTGC  
AGTATATTGCCGGAACCTGCGCGCCGTGTCGTTAATGCGCGAGCGCGGCCATTCTGATAGTATGGCCCTTGCAGCTTA  
TGAACCGGAAACCGACCGTTACGCCGACCGGACCGCTTTGGTTGCTGCAGAGCGCTTATCACTTTAGATTCCGCTCGGC  
CTTGGCGCAACTTGGTATGCGTGCACGCGGAGGACTGGCGGTGCCAACGAAGTCTTGATCGCCGTCACCCACGCACTGT  
TGTTGGAGTCTCTTGGCGACTGGGATTGGTGTTCATGGGTGGTATCTGCTTTCGTGAAAGGTCCCGCACAAACCGTATTT  
GCCGTACCGTCCCTTAGTTCGCGAACTTATTCTGCTGGTGTACAGCAGCCGCTGTTGAACAACGCTTGGCGTTTCAGC  
TTTGGCTGACATGTGGACTCGCCCTGCCGAAGGCCGCGCATATGGACGTACGGTGTCTTCTGATTCCGGCCCGCCCTG  
GAATGCGCGTACGAAAATGCATTATTAGGGTTGTTGCACATGCAACATAACCCGCTTTTGGGCATTGACCGCGCTAGTA  
GGGTCGTGGATATGCCATCTTACGCGGCATCGTAGTGATCATCTTGGCCGCTTGGCACACCCTCCACGCCAGTGGCCTAC  
TGATGTTGAAGGTGACCGTCGCGATGATGGATGA

### Anexo 4

#### Secuenciación de LanC colonia 1



ATGACTGACGAGCGCCGTACCGACGTAGTGACGCCACTCGTGGTGCAGGAGAACCCCCCATGCAGAACGTGCGCGCGC  
TACTGTTGCCCGCGTGTGCTGGATCGTTTGGCGGACCCGGCCCGCTGGCTGATGATAACAATCGCGATCGCGGCTCGCTCCTG  
GGCACCTGAGTGCCTTCTCCCTGGTCAGAATTGAGCTTGTGAGCGGGTGCCTTAAAGCGTGCAATGGAAGTCATGGCGCGTGAGGATTT  
TACCCCCGCGGTCCGGAACACACAGTTCTGTCGCACGCCTATCTTAAGCGTGCAATGGAAGTCATGGCGCGTGAGGATTT  
TCCGACTGGAGGGATGTTTCGATGGCCAGGTGCTGTCGCTGTGGCAACTCTTGTGCGCATGAAGCAACGGGTGGCTATGT  
AAGCGCACTTGCCCGCTTGGACGATCATCGTCGCCGTGTATTTCGCGCGACGTTGCCGCGCCCGCGCACGCATGTCCCCCT  
TGTTTCTAACCGCGAGTTTGAAaACaGTCCGTGGGTTATCCGGGATGGGTCTTACTTGCTTGCAGCGCTTGATGGAGGCTCG  
GGGACCGATGCCGGGATCGACGAGGTCCGTATGGTTTTATCTTATTTGGTGGGTCTGACCGAAGGTGAGATCACTCACCGT  
GGGCGCCGCTGCCACGCTGGTGGGCGTGGGTGCGCCAAAATTGGCCAGGAAGCGGATTTCCCGCCGGTCACTTAAA  
CCTTGGTTTAAAGTCACGGCGTAGCTGGTCTCTTGCCTTTTGGCTTCGGCCTGGCGCGCCGGCTGCGCGTGCCAGGTCA  
CCAAGCTGCTATGGAGTCGTTAGTGGCCTTGTGGTCCGTTGTGCGGTACCCACTGGCGAAGCGTTATGGTGGCCACCGTC  
CTATTCTCTGGATCAATGGGCAGCGGGCTCACCTGGCCCCGACCCTCGTTTCCACGCCCTTCATGGTGCTATGGTGTCCCG  
GGAGTTAGCCGTGCCATTCAGTTAGCCGCGTTAGCACTTGATCGTCCGGATTGGCATGAATTGACGCGTCGCTCATTGATC  
GGTCTGTGGCTACACCTATTTCCGAGTGGGGAGTAGAGGACAGCGCTTATGCCACGGCCGCGCAGGGTTGCTTCACTTA  
TTAGGCTTGTGGTGAGCACGTAGATGACGCCCGCTTACCAGTCGTACGTGACGAGTTGGCAGCATTGATCTTGTGATGGT  
TACGACGATGAACACCGTTTTGGCTTCCGCGTGGCCATGACCGACGCTGCGGTGGGGGCAGACATTCCATCCTTCTTAGAA  
GGAGCTGCAGGTGTGGCTTATAGCTCTGGACGCTTACGCAGAAGGACGTGCACGTGCAGGATGGGATCGTGTCTGATGGT  
AGCTTGA

## Anexo 5

### Secuenciación de LanC\_6X colonia 1

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCAGGAGAACCCCCCATGCAGAACGTGCGCGCGCTACTGTGCCCGCGTGG  
CGACGTAGTGACGCCACTCGTGGTGCAGGAGAACCCCCCATGCAGAACGTGCGCGCGCTACTGTGCCCGCGTGG  
ATCGTTTGGCGGACCCGGCCCGCTGGCTGATGATAACAATCGCGATCGCGGCTCGCTCCTGGGCACCTGAGTGCCTTCTC  
CCTGGTCAGAATTGAGCTTGTGAGCGGGTGCCTTAAAGCGTGCAATGGAAGTCATGGCGCGTGAGGATTTCCGACTGGAGGGATGTT  
ACACAGTTCGTGCGCACGCCTATCTTAAGCGTGCAATGGAAGTCATGGCGCGTGAGGATTTCCGACTGGAGGGATGTT  
GATGGCCAGGTGCTGTCGCTGTGGCAACTCTTGTGCGCATGAAGCAACGGGTGGCTATGTAAGCGCACTTGCCCGCTT  
GACGATCATCGTCGCCGTGTATTTCGCGCGACGTTGCCGCGCCCGCGCACGCATGTCCCCCTTGTCTAACCGCGAGTT  
GAaACaGTCCGTGGGTTATCCGGGATGGGTCTTACTTGCTTGCAGCGCTTGATGGAGGCTCGGGGACCGATGCCGGGATC  
GACGAGGTCCGTATGGTTTTATCTTATTTGGTGGGTCTGACCGAAGGTGAGATCACTCACCGTGGGCGCCGCTGCCACGC  
TGGTGGGCGTCCGGTGCGCCAAAATTGGCCAGGAAGCGGATTTCCCGCCGGTCACTTAAACCTTGGTTTAAAGTCACGGC  
GTAGCTGGTCTCTTGCCTTTTGGCTTCCGGCTGGCGCGCCGGCTGCGCGTGCCAGGTACCAAGCTGCTATGGAGTCG  
TTAGTGGCCTTGTGGTCCGTTGTGCGGTACCCACTGGCGAAGCGTTATGGTGGCCACCGTCTTCTCTGGATCAATGG  
GCAGCGGGCTCACCTGGCCCCGACCCTCGTTTCCACGCCCTTCATGGTGCTATGGTGTCCCGGGAGTTAGCCGTGCCATT  
CAGTTAGCCGCGTTAGCACTTGATCGTCCGGATTGGCATGAATTGACGCGTCGCTCATTGATCGGTCTGTTGGCTACACCT  
ATTTCCGAGTGGGGAGTAGAGGACAGCGCTTATGCCACGGCCGCGCAGGGTTGCTTCACTTATTAGGCTTGTGGTGAG  
CACGTAGATGACGCCCGCTTACCAGTCGTACGTGACGAGTTGGCAGCATTGATTCTTGTGATGGTTACGACGATGAACACCGT  
TTTGGCTTCCGCGTGGCCATGACCGACGCTGCGGTGGGGGCAGACATTCCATCCTTCTTAGAAGGAGCTGCAGGTGTGGCT  
TTAGCTCTGGACGCTTACGCAGAAGGACGTGCACGTGCAGGATGGGATCGTGTCTGATGGTAGCTTGA

## BIBLIOGRAFÍA

1. Abriouel, H., Franz, C. M., Omar, N. B., Gálvez, A. 2011. Diversity and Applications of *Bacillus* Bacteriocins. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(1): 201-232. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x
2. Acedo, J. Z., Bothwell, I. R., An, L., Trouth, A., Frazier, C., van der Donk, W. A. 2019. O-Methyltransferase-Mediated Incorporation of a  $\beta$ -Amino Acid in Lanthipeptides. *Journal of the American Chemical Society*, 141(42): 16790-16801. DOI: 10.1021/jacs.9b07396.
3. Agrawal, P., Amir, S., Deepak, Barua, D., Mohanty, D. 2021. RiPPMiner-Genome: A Web Resource for Automated Prediction of Crosslinked Chemical Structures of RiPPs by Genome Mining. *Journal of Molecular Biology*, 433(11): 166887. DOI: 10.1016/j.jmb.2021.166887.
4. Al-Hadidi, S. H., Alhussain, H., Abdel Hadi, H., Johar, A., Yassine, H. M., Al Thani, A. A., Eltai, N. O. 2021. The Spectrum of Antibiotic Prescribing During COVID-19 pandemic: A Systematic Literature Review. *Microbial Drug Resistance*, 27(12): 1705-1725. DOI: 10.1089/mdr.2020.0619.
5. Alkhalili, R. N., Canbäck, B. 2018. Identification of Putative Novel Class-I Lanthipeptides in Firmicutes: A Combinatorial *in silico* Analysis Approach Performed on Genome Sequenced Bacteria and a Close Inspection of Z-geobacillin Lanthipeptide Biosynthesis Gene Cluster of the Thermophilic *Geobacillus* sp. Strain ZGt-1. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9): 2650-2681. DOI: 10.3390/ijms19092650.
6. Allgaier, H., Jung, G., Werner, R. G., Schneider, U., Zähler, H. 1986. Epidermin: Sequencing of a Heterodet Tetracyclic 21-Peptide Amide Antibiotic. *European Journal of Biochemistry*, 160(1): 9-22. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1986.tb09933.x.
7. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D. J. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
8. Andryukov, B., Mikhailov, V., Besednova, N. 2019. The Biotechnological Potential of Secondary Metabolites from Marine Bacteria. *Journal of Marine Science and Engineering*, 7(6): 176. DOI: 10.3390/jmse7060176.
9. Arias, C. A., Reyes, J., Carvajal, L. P., Rincon, S., Diaz, L., Panesso, D., Ibarra, G., Rios, R., Munita, J. M., Salles, M. J., Alvarez-Moreno, C., Labarca, J., Garcia, C., Luna, C. M., Mejia-Villatoro, C., Zurita, J., Guzman-Blanco, M., Rodriguez-Noriega, E., Narechania, A., Rojas, L. J., Planet, P. J., Weinstock, G. M., Gotuzzo, E., Seas, C. 2017. A Prospective Cohort Multicenter Study of Molecular Epidemiology and Phylogenomics of *Staphylococcus aureus* Bacteremia in Nine Latin American Countries. *Antimicrobial Agents Chemother*, 61(10): e00816-17. DOI: 10.1128/AAC.00816-17.
10. Arnison, P. G., Bibb, M. J., Bierbaum, G., Bowers, A. A., Bugni, T. S., Bulaj, G., Camarero, J. A., Campopiano, D. J., Challis, G. L., Clardy, J., Cotter, P. D., Craik, D. J., Dawson, M., Dittmann, E., Donadio, S., Dorrestein, P. C., Entian, K. D., Fischbach, M. A., Garavelli, J. S., Göransson, U., Gruber, C. W., Haft, D. H., Hemscheidt, T. K., Hertweck, C., Hill, C., Horswill, A. R., Jaspars, M., Kelly, W. L., Klinman, J. P., Kuipers, O. P., Link, A. J., Liu, W., Marahiel, M. A., Mitchell, D. A.,

- Moll, G. N., Moore, B. S., Müller, R., Nair, S. K., Nes, I. F., Norris, G. E., Olivera, B. M., Onaka, H., Patchett, M. L., Piel, J., Reaney, M. J., Rebuffat, S., Ross, R. P., Sahl, H. G., Schmidt, E. W., Selsted, M. E., Severinov, K., Shen, B., Sivonen, K., Smith, L., Stein, T., Süßmuth, R. D., Tagg, J. R., Tang, G. L., Truman, A. W., Vederas, J. C., Walsh, C. T., Walton, J. D., Wenzel, S. C., Willey, J. M., van der Donk, W. A. 2013. Ribosomally Synthesized and Post-translationally Modified Peptide Natural Products: Overview and Recommendations for a Universal Nomenclature. *Natural Product Reports*, 30(1):108-160. DOI: 10.1039/c2np20085f.
11. Banin, E., Hughes, D., Kuipers, O. P. 2017. Editorial: Bacterial pathogens, antibiotics and antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3): 450-452. DOI: 10.1093/femsre/fux016.
  12. Baquero, F., Lanza, V. F., Baquero, M. R., Del Campo, R., Bravo-Vázquez, D. A. 2019. Microcins in Enterobacteriaceae: Peptide Antimicrobials in the Eco-Active Intestinal Chemosphere. *Frontiers in Microbiology*, 10: 2261. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02261.
  13. Barbosa, J., Caetano, T., Mendo, S. 2015. Class I and Class II Lanthipeptides Produced by *Bacillus* spp. *Journal of natural products*, 78(11): 2850-2866. DOI: 10.1021/np500424y.
  14. Barbosa, J., Caetano, T., Moesker, E., Süßmuth, R., Mendo, S., 2019. Lichenicidin rational site-directed mutagenesis library: A Tool to Generate Bioengineered Lantibiotics. *Biotechnology and Bioengineering*, 116(11): 3053-3062. DOI: 10.1002/bit.27130.
  15. Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., van Wezel, G. P., 2016. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1): 1-43. DOI: 10.1128/MMBR.00019-15.
  16. Behie, S. W., Bonet, B., Zacharia, V. M., McClung, D. J., Traxler, M. F. 2017. Molecules to ecosystems: Actinomycete Natural Products *In Situ*. *Frontiers in Microbiology*, 7: 2149. DOI: 10.3389/fmicb.2016.02149.
  17. Bierbaum, G., Sahl, H. G. 2009. Lantibiotics: Mode of Action, Biosynthesis and Bioengineering. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10(1): 2-18. DOI: 10.2174/138920109787048616.
  18. Bimboim, H. C., Doly, J. 1979. A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6): 1513-1523. DOI: 10.1093/nar/7.6.1513.
  19. Blin, K., Medema, M. H., Kazempour, D., Fischbach, M. A., Breitling, R., Takano, E., Weber, T. 2013. antiSMASH 2.0-A Versatile Platform for Genome Mining of Secondary Metabolite Producers. *Nucleic Acids Research*, 41(W1): W204-W212. DOI: 10.1093/nar/gkt449.
  20. Blin, K., Shaw, S., Kloosterman, A. M., Charlop-Powers, Z., van Wezel, G. P., Medema, M. H., Weber, T. 2021. antiSMASH 6.0: Improving Cluster Detection and Comparison Capabilities. *Nucleic Acids Research*, 49(W1): W29-W35. DOI: 10.1093/nar/gkab335.
  21. Blin, K., Shaw, S., Steinke, K., Villebro, R., Ziemert, N., Lee, S.Y., Medema, M. H., Weber, T. 2019. antiSMASH 5.0: Updates to the Secondary Metabolite Genome

- Mining Pipeline. *Nucleic Acids Research*, 47(W1): W81-W87. DOI: 10.1093/nar/gkz310.
22. Blum, M., Chang, H. Y., Chuguransky, S., Grego, T., Kandasamy, S., Mitchell, A., Nuka, G., Paysan-Lafosse, T., Qureshi, M., Raj, S., Richardson, L., Salazar, G. A., Williams, L., Bork, P., Bridge, A., Gough, J., Haft, D. H., Letunic, I., Marchler-Bauer, A., Mi, H., Natale, D. A., Necci, M., Orengo, C. A., Pandurangan, A. P., Rivoire, C., Sigrist, C. J. A., Sillitoe, I., Thanki, N., Thomas, P. D., Tosatto, S. C. E., Wu, C. H., Bateman, A., Finn, R. D. 2021. The InterPro Protein Families and Domains Database: 20 Years On. *Nucleic Acids Research*, 49(D1): D344-D354. DOI: 10.1093/nar/gkaa977.
  23. Boakes, S., Cortés, J., Appleyard, A. N., Rudd, B. A., Dawson, M. J. 2009. Organization of the Genes Encoding the Biosynthesis of Actagardine and Engineering of a Variant Generation System. *Molecular Microbiology*, 72(5): 1126-1136. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2009.06708.x.
  24. Bonelli, R. R., Schneider, T., Sahl, H. G., Wiedemann, I. 2006. Insights Into *In Vivo* Activities of Lantibiotics from Gallidermin and Epidermin Mode-of-Action Studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(4): 1449-1457. DOI: 10.1128/AAC.50.4.1449-1457.2006.
  25. Booth, W. T., Schlachter, C. R., Pote, S., Ussin, N., Mank, N. J., Klapper, V., Offermann, L. R., Tang, C., Hurlburt, B. K., Chruszcz, M. 2018. Impact of an N-terminal Polyhistidine Tag on Protein Thermal Stability. *ACS Omega*, 3(1): 760-768. DOI: 10.1021/acsomega.7b01598.
  26. Caicedo-Montoya, C., Gómez-Román, M. P., Vázquez-Hernández, M., Mora-Rincón, R. A., Rodríguez-Luna, S. D., Rodríguez-Sanoja, R., Sanchez, S. 2021. Evolutionary Genomics and Biosynthetic Potential of Novel Environmental Actinobacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 5(23): 8805-8822. DOI: 10.1007/s00253-021-11659-3.
  27. Cao, L., Do, T., Link, A. J. 2021. Mechanisms of Action of Ribosomally Synthesized and Posttranslationally Modified Peptides (RiPPs). *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 48: (3-4). DOI: 10.1093/jimb/kuab005.
  28. Carrano, L., Abbondi, M., Turconi, P., Candiani, G., Marinelli, F. 2015. A Novel Microbisporicin Producer Identified by Early Dereplication During Lantibiotic Screening. *BioMed Research International*, 2015: 419383. DOI: 10.1155/2015/419383.
  29. Castiglione, F., Lazzarini, A., Carrano, L., Corti, E., Ciciliato, I., Gastaldo, L., Candiani, P., Losi, D., Marinelli, F., Selva, E., Parenti, F. 2008. Determining the Structure and Mode of Action of Microbisporicin, a Potent Lantibiotic Active Against Multiresistant Pathogens. *Chemistry & Biology*, 15(1): 22-31. DOI: 10.1016/j.chembiol.2007.11.009.
  30. Ceapă, C. D., Vázquez-Hernández, M., Rodríguez-Luna, S. D., Cruz-Vázquez, A. P., Jiménez-Suárez, V., Rodríguez-Sanoja, R., Alvarez-Buylla, E. R., Sánchez, S. 2018. Genome Mining of *Streptomyces scabrisporus* NF3 Reveals Symbiotic Features Including Genes Related to Plant Interactions. *PLoS One*, 13(2): e0192618. DOI: 10.1371/journal.pone.0192618.

31. Centeno-Leija, S., Vinuesa, P., Rodríguez-Peña, K., Trenado-Uribe, M., Cárdenas-Conejo, Y., Serrano-Posada, H., Rodríguez-Sanoja, R., Sánchez, S. 2016. Draft Genome Sequence of an Endophytic *Actinoplanes* Species, Encoding Uncommon *trans*-Acyltransferase Polyketide Synthases. *Genome Announcements*, 4(2): e00164-16. DOI: 10.1128/genomeA.00164-16.
32. Challis, G. L., Ravel, J. 2000. Coelichelin, a New Peptide Siderophore Encoded by the *Streptomyces coelicolor* Genome: Structure Prediction From the Sequence of its Non-Ribosomal Peptide Synthetase. *FEMS Microbiology Letters*, 187(2): 111-114. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09145.x.
33. Chen, S., Xu, B., Chen, E., Wang, J., Lu, J., Donadio, S., Ge, H., Wang, H. 2019. Zn-Dependent Bifunctional Proteases are Responsible for Leader Peptide Processing of Class III Lanthipeptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(7): 2533-2538. DOI: 10.1073/pnas.1815594116.
34. Cheng, F., Takala, T. M., Saris, P. E. 2007. Nisin Biosynthesis *In Vitro*. *Microbial Physiology*, 13(4): 248-254. DOI: 10.1159/000104754.
35. Chikindas, M. L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V. A., Dicks, L. M. 2018. Functions and Emerging Applications of Bacteriocins. *Current Opinion in Biotechnology*, 49: 23-28. DOI: 10.1016/j.copbio.2017.07.011.
36. Christina, A., Christopher, V., Bhore, S. J. 2013. Endophytic Bacteria as a Source of Novel Antibiotics: An Overview. *Pharmacognosy reviews*, 7(13): 11. DOI: 10.4103/0973-7847.112833.
37. Cotter, P. D., Ross, R. P., Hill, C. 2013. Bacteriocins a Viable Alternative to Antibiotics? *Nature Reviews Microbiology*, 11(2): 95-105. DOI: 10.1038/nrmicro2937.
38. Cubillos-Ruiz, A., Berta-Thompson, J. W., Becker, J. W., van Der Donk, W. A., Chisholm, S. W. 2017. Evolutionary Radiation of Lanthipeptides in Marine Cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(27): E5424-E5433. DOI: 10.1073/pnas.1700990114.
39. da Silva Jr. J. B., Espinal, M., Ramón-Pardo, P. 2020. Antimicrobial resistance: time for action. *Revista panamericana de Salud Pública*, 44, e131. DOI: 10.26633/RPSP.2020.131.
40. de Arauz, L. J., Jozala, A. F., Mazzola, P. G., Penna, T. C. V. 2009. Nisin Biotechnological Production and Application: A Review. *Trends in Food Science & Technology*, 20(3-4): 146-154. DOI: 10.1016/j.tifs.2009.01.056.
41. de Jong, A., van Heel, A. J., Kok, J., Kuipers, O. P. 2010. BAGEL2: Mining for Bacteriocins in Genomic Data. *Nucleic Acids Research*, 38(suppl\_2): W647-W651. DOI: 10.1093/nar/gkq365.
42. de Jong, A., van Hijum, S. A., Bijlsma, J. J., Kok, J., Kuipers, O. P. 2006. BAGEL: A Web-Based Bacteriocin Genome Mining Tool. *Nucleic Acids Research*, 34(suppl\_2): W273-W279. DOI: 10.1093/nar/gkl237.
43. Di, Y. P., Lin, Q., Chen, C., Montelaro, R. C., Doi, Y., Deslouches, B. 2020. Enhanced Therapeutic Index of an Antimicrobial Peptide in Mice by Increasing Safety and Activity Against Multidrug-Resistant Bacteria. *Science Advances*, 6(18): eaay6817. DOI: 10.1126/sciadv.aay6817.
44. Dinesh, R., Srinivasan, V., TE, S., Anandaraj, M., Srmbikkal, H. 2017. Endophytic Actinobacteria: Diversity, Secondary Metabolism and Mechanisms to Unsilence

- Biosynthetic Gene Clusters. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(5): 546-566. DOI: 10.1080/1040841X.2016.1270895.
45. Dischinger, J., Chipalu, S. B., Bierbaum, G. 2014. Lantibiotics: Promising candidates for Future Applications in Health Care. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(1): 51-62. DOI: 10.1016/j.ijmm.2013.09.003.
  46. Doroghazi, J. R., Metcalf, W. W. 2013. Comparative Genomics of Actinomycetes with a Focus on Natural Product Biosynthetic Genes. *BMC Genomics*, 14(1): 1-13. DOI: 10.1186/1471-2164-14-611.
  47. Ek-Ramos, M. J., Gomez-Flores, R., Orozco-Flores, A. A., Rodríguez-Padilla, C., González-Ochoa, G., Tamez-Guerra, P. 2019. Bioactive Products from Plant-Endophytic Gram-Positive Bacteria. *Frontiers in microbiology*, 10: 463. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00463.
  48. El Shazely, B., Yu, G., Johnston, P. R., Rolff, J. 2020. Resistance Evolution Against Antimicrobial Peptides in *Staphylococcus aureus* Alters Pharmacodynamics Beyond the MIC. *Frontiers in Microbiology*, 11: 103. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00103.
  49. Engelke, G., Gutowski-Eckel, Z., Hammelmann, M., Entian, K. D. 1992. Biosynthesis of the Lantibiotic Nisin: Genomic Organization and Membrane Localization of the NisB protein. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(11): 3730-3743. DOI: 10.1128/aem.58.11.3730-3743.1992.
  50. Engler, C., Marillonnet, S. 2013. *Combinatorial DNA Assembly Using Golden Gate Cloning*. In *Synthetic Biology*, pp. 141-156. Humana Press, Totowa, NJ.
  51. Foulston, L. 2019. Genome Mining and Prospects for Antibiotic Discovery. *Current Opinion in Microbiology*, 51: 1-8. DOI: 10.1016/j.mib.2019.01.001.
  52. Foulston, L. C., Bibb, M. J. 2010. Microbisporicin Gene Cluster Reveals Unusual Features of Lantibiotic Biosynthesis in Actinomycetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)*, 107(30): 13461-6. DOI: 10.1073/pnas.1008285107.
  53. Friar, J. L., Goldman, T., Pérez-Mercader, J. 2012. Genome Sizes and the Benford Distribution. *PLoS One*, 7(5): e36624. DOI: 10.1371/journal.pone.0036624.
  54. Froger, A., Hall, J. E. 2007. Transformation of Plasmid DNA Into *E. coli* Using the Heat Shock Method. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (6): 253. DOI: 10.3791/253.
  55. Garcia-Fulgueiras, V., Zapata, Y., Papa-Ezdra, R., Ávila, P., Caiata, L., Seija, V., Rojas Rodriguez, A. E., Magallanes, C., Márquez Villalba, C., Vignoli, R. 2020. First Characterization of *K. pneumoniae* ST11 Clinical Isolates Harboring BlaKPC-3 in Latin America. *Revista Argentina de Microbiologia*, 52(3): 211-216. DOI: 10.1016/j.ram.2019.10.003.
  56. Gardiner, D. M., Waring, P., Howlett, B. J. 2005. The Epipolythiodioxopiperazine (ETP) Class of Fungal Toxins: Distribution, Mode of Action, Functions and Biosynthesis. *Microbiology*, 151(4): 1021-1032. DOI: 10.1099/mic.0.27847-0.
  57. Garenne, D., Haines, M. C., Romantseva, E. F., Freemont, P., Strychalski, E. A., Noireaux, V. 2021. Cell-free Gene Expression. *Nature Reviews Methods Primers*, 1(1): 1-18. DOI: 10.1038/s43586-021-00046-x.
  58. Garg, N., Salazar-Ocampo, L. M., van Der Donk, W. A. 2013. *In Vitro* Activity of the Nisin Dehydratase NisB. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(18): 7258-7263. DOI: 10.1073/pnas.1222488110.

59. Garza-González, E., Morfín-Otero, R., Mendoza-Olazarán, S., Bocanegra-Ibarias, P., Flores-Treviño, S., Rodríguez-Noriega, E., Ponce-de-León, A., Sánchez-Francia, D., Franco-Cendejas, R., Arroyo-Escalante, S., Velázquez-Acosta, C., Rojas-Larios, F., Quintanilla, L. J., Maldonado-Anicacio, J. Y., Martínez-Miranda, R., Ostos-Cantú, H. L., Gómez-Choel, A., Jaime-Sánchez, J. L., Avilés-Benítez, L. K., Feliciano-Guzmán, J. M., Peña-López, C. D., Couoh-May, C. A., Molina-Jaimes, A., Vázquez-Narvaez, E. G., Rincón-Zuno, J., Rivera-Garay, R., Galindo-Espinoza, A., Martínez-Ramírez, A., Mora J. P., Corte-Rojas, R. E., López-Ovilla, I., Monroy-Colin, V. A., Barajas-Magallón, J. M., Morales-De-la-Peña, C. T., Aguirre-Burciaga, E., Coronado-Ramírez, M., Rosales-García, A. A., Ayala-Tarín, M. D., Sida-Rodríguez, S., Pérez-Vega, B. A., Navarro-Rodríguez, A., Juárez-Velázquez, G. E., Cetina-Umaña, C. M., Mena-Ramírez, J. P., Canizales-Oviedo, J., Moreno-Méndez, M. I., Romero-Romero, D., Arévalo-Mejía, A., Cobos-Canul, D. I., Aguilar-Orozco, G., Silva-Sánchez, J., Camacho-Ortiz, A. 2019. A Snapshot of Antimicrobial Resistance in Mexico. Results from 47 Centers from 20 States During a Six-Month Period. *PLoS One*, 14(3): e0209865. DOI: 10.1371/journal.pone.0209865.
60. Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Wilkins, M. R., Appel, R. D., Bairoch, A. 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *The Proteomics Protocols Handbook*, 571-607. DOI: 10.1385/1-59259-890-0:571.
61. Gomes, K. M., Duarte, R. S., de Freire Bastos, M. D. C. 2017. Lantibiotics Produced by Actinobacteria and Their Potential Applications (a Review). *Microbiology*, 163(2): 109-121. DOI: 10.1099/mic.0.000397.
62. Gomez-Escribano, J. P., Song, L., Bibb, M. J., Challis, G. L. 2012. Posttranslational  $\beta$ -Methylation and Macrolactamidation in the Biosynthesis of the Bottromycin Complex of Ribosomal Peptide Antibiotics. *Chemical Science*, 3(12): 3522-3525. DOI: 10.1039/C2SC21183A.
63. Guzmán-Chávez, F., Arce, A., Adhikari, A., Vadhin, S., Pedroza-Garcia, J. A., Gandini, C., Haseloff, J. 2022. Constructing Cell-Free Expression Systems for Low-Cost Access. *ACS Synthetic Biology*, 11(3): 1114-1128. DOI: 10.1021/acssynbio.1c00342.
64. Guzmán-Trampe, S., Ceapa, C. D., Manzo-Ruiz, M., Sánchez, S. 2017. Synthetic Biology Era: Improving Antibiotic's World. *Biochemical Pharmacology*, 134: 99-113. DOI: 10.1016/j.bcp.2017.01.015.
65. Hamada, T., Sugawara, T., Matsunaga, S., Fusetani, N. 1994. Polytheonamides, Unprecedented Highly Cytotoxic Polypeptides, From the Marine Sponge Theonella Swinhoei: 1. Isolation and Component Amino Acids. *Tetrahedron letters*, 35(5): 719-720. DOI: 10.1016/S0040-4039(00)75799-6.
66. Hancock, R. E. 1997. Peptide Antibiotics. *The Lancet*, 349(9049): 418-422. DOI: 10.1016/S0140-6736(97)80051-7.
67. Hasper, H. E., de Kruijff, B., and Breukink, E. 2004. Assembly and Stability of Nisin-Lipid II Pores. *Biochemistry*, 43: 11567-11575. DOI: 10.1021/bi049476b.
68. Hassan, M., Kjos, M., Nes, I. F., Diep, D. B., Lotfipour, F. 2012. Natural Antimicrobial Peptides from Bacteria: Characteristics and Potential Applications to Fight Against Antibiotic Resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 113(4): 723-736. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05338.x.
69. Hazarika, S. N., Thakur, D. 2020. Actinobacteria. *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*, 1:443-476. DOI: 10.1016/B978-0-12-823414-3.00021-6.

70. He, F. 2011. Laemmli-sds-page. *Bio-protocol*, 101: e80-e80. DOI: 10.21769/BioProtoc.80.
71. Hegemann, J. D., Süssmuth, R. D. 2020. Matters of Class: Coming of Age of Class III and IV Lanthipeptides. *RSC Chemical Biology*, 1(3): 110-127. DOI: 10.1039/D0CB00073F.
72. Hofer, U. 2019. The Cost of Antimicrobial Resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 12: 3903-3910. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0125-x>.
73. Hudson, G. A., Mitchell, D. A. 2018. RiPP Antibiotics: Biosynthesis and Engineering Potential. *Current Opinion in Microbiology*, 45: 61-69. DOI: 10.1016/j.mib.2018.02.010.
74. Hug, J. J., Bader, C. D., Remškar, M., Cirnski, K., Müller, R. 2018. Concepts and Methods to Access Novel Antibiotics from Actinomycetes. *Antibiotics*, 7(2):44. DOI: 10.3390/antibiotics7020044.
75. Iftime, D., Jasyk, M., Kulik, A., Imhoff, J. F., Stegmann, E., Wohlleben, W., Süssmuth, R. D., Weber, T. 2015. Streptocollin, a Type IV Lanthipeptide Produced by *Streptomyces collinus* Tü 365. *ChemBioChem*, 16(18): 2615-2623. DOI: 10.1002/cbic.201500377.
76. International Severe Acute Respiratory and Emerging Infections Consortium (ISARIC). 2020. <https://isaric.tghn.org/>
77. Jung, G., Sahl, H. G. 1991. *Nisin and Novel Lantibiotics*. Springer Science Business Media, pp. 490.
78. Kapi, A. 2014. The Evolving Threat of Antimicrobial Resistance: Options for Action. *Indian Journal of Medical Research*, 139.1: 182. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44812>.
79. Karbalaee-Heidari, H. R., Budisa, N. 2020. Combating Antimicrobial Resistance with New-to-Nature Lanthipeptides Created by Genetic Code Expansion. *Frontiers in Microbiology*, 11: 590522. DOI: 10.3389/fmicb.2020.590522.
80. Kariyawasam, R. M., Julien, D. A., Jelinski, D. C., Larose, S. L., Rennert-May, E., Conly, J. M., Dingle, T., C., Chen, J. Z., Tyrrell, G. J., Ronksley, P. E., Barkema, H. W. 2022. Antimicrobial Resistance (AMR) in COVID-19 Patients: A Systematic Review and Meta-analysis (November 2019–June 2021). *Antimicrobial Resistance Infection Control*, 11(1): 45. DOI: 10.1186/s13756-022-01085-z.
81. Kaweewan, I., Hemmi, H., Komaki, H., Harada, S., Kodani, S. 2018. Isolation and Structure Determination of a New Lasso Peptide Specialicin Based on Genome Mining. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 26(23-24): 6050-6055. DOI: 10.1016/j.bmc.2018.11.007.
82. Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., Sternberg, M. J. 2015. The Phyre2 Web Portal for Protein Modeling, Prediction and Analysis. *Nature Protocols*, 10(6): 845-858. DOI: 10.1038/nprot.2015.053.
83. Knerr, P. J., van der Donk, W. A. 2012. Discovery, Biosynthesis, and Engineering of Lantipeptides. *Annual Review of Biochemistry*, 81: 479-505. DOI: 10.1146/annurev-biochem-060110-113521.
84. Knight, G. M., Glover, R. E., McQuaid, C. F., Oлару, I. D., Gallandat, K., Leclerc, Q. J., Fuller, N. M., Willcocks, S. J., Hasan, R., van Kleef, E., Chandler CI. 2021. Antimicrobial Resistance and COVID-19: Intersections and Implications. *Elife*, 10: e64139. DOI: 10.7554/eLife.64139.



85. Kodani, S., Hudson, M. E., Durrant, M. C., Buttner, M. J., Nodwell, J. R., Willey, J. M. 2004. The SapB Morphogen is a Lantibiotic-like Peptide Derived from the Product of the Developmental Gene *ramS* in *Streptomyces coelicolor*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(31): 11448-11453. DOI: 0.1073/pnas.0404220101.
86. Kodani, S., Lodato, M. A., Durrant, M. C., Picart, F., Willey, J. M. 2005. SapT, a Lanthionine-containing Peptide Involved in Aerial Hyphae Formation in the streptomycetes. *Molecular Microbiology*, 58(5): 1368-1380. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04921.x
87. Kodani, S., Sato, K., Hemmi, H., Ohnishi-Kameyama, M. 2014. Isolation and Structural Determination of a New Hydrophobic Peptide Venepptide from *Streptomyces venezuelae*. *The Journal of Antibiotics*, 67(12): 839-842. DOI: 10.1038/ja.2014.81.
88. Koo, H. B., Seo, J., 2019. Antimicrobial Peptides Under Clinical Investigation. *Peptide Science*, 111(5): e24122. DOI: 10.1002/pep2.24122.
89. Kruger, N. J. 2009. The Bradford Method for Protein Quantitation. *The protein Protocols Handbook*, 17-24. DOI: 10.1007/978-1-59745-198-7.
90. Kumar, P., Kizhakkedathu, J. N., Straus, S. K. 2018. Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility *In Vivo*. *Biomolecules*, 8(1): 4-28. DOI: 10.3390/biom8010004.
91. Kupke, T., Stevanović, S., Sahl, H. G., Götz, F. 1992. Purification and Characterization of EpiD, a Flavoprotein Involved in the Biosynthesis of the Lantibiotic Epidermin. *Journal of Bacteriology*, 174(16): 5354-5361. DOI: 10.1128/jb.174.16.5354-5361.
92. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259): 680-685. DOI: 10.1038/227680a0.
93. Lagedroste, M., Reiners, J., Knospe, C. V., Smits, S. H., Schmitt, L. 2020. A Structural View on the Maturation of Lanthipeptides. *Frontiers in Microbiology*, 11: 1183-1194. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01183.
94. Langford, B. J., So, M., Raybardhan, S., Leung, V., Soucy, J. R., Westwood, D., Daneman, N., MacFadden, D. R. 2021. Antibiotic Prescribing in Patients with COVID-19: Rapid Review and Meta-analysis. *Clinical Microbiology and Infection*, 27(4): 520-531. DOI: 10.1016/j.cmi.2020.12.018.
95. Lee, N., Kim, W., Hwang, S., Lee, Y., Cho, S., Palsson, B., Cho, B. K. 2020. Thirty Complete *Streptomyces* genome Sequences for Mining Novel Secondary Metabolite Biosynthetic Gene Clusters. *Scientific Data*, 7(1): 1-9. DOI: 10.6084/m9.figshare.c.4823394.
96. Lei, J., Sun, L., Huang, S., Zhu, C., Li, P., He, J., Mackey, V., Coy, D. H., He, Q. 2019. The Antimicrobial Peptides and Their Potential Clinical Applications. *American Journal of Translational Research*, 11(7): 3919. PMID: 31396309.
97. Li, B., Cooper, L. E., van der Donk, W. A. 2009. *In Vitro* Studies of Lantibiotic Biosynthesis. *Methods in Enzymology*, 458: 533-558. DOI: 10.1016/S0076-6879(09)04821-6.
98. Li, B., Yu, J. P. J., Brunzelle, J. S., Moll, G. N., van Der Donk, W. A., Nair, S. K. 2006. Structure and Mechanism of the Lantibiotic Cyclase Involved in Nisin Biosynthesis. *Science*, 311(5766): 1464-1467. DOI: 10.1126/science.1121422.

99. Li, C., Alam, K., Zhao, Y., Hao, J., Yang, Q., Zhang, Y., Li, R., Li, A. 2021. Mining and Biosynthesis of Bioactive Lanthipeptides from Microorganisms. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9: 692466. DOI: 10.3389/fbioe.2021.692466.
100. Li, Y., Rebuffat, S. 2020. The Manifold Roles of Microbial Ribosomal Peptide-based Natural Products in Physiology and Ecology. *Journal of Biological Chemistry*, 295(1): 34-54. DOI:10.1074/jbc.REV119.006545.
101. Liu, H., Carvalhais, L. C., Crawford, M., Singh, E., Dennis, P. G., Pieterse, C. M., Schenk, P. M. 2017. Inner Plant Values: Diversity, Colonization and Benefits from Endophytic Bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 8: 2552-2569. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02552.
102. Liu, R., Zhang, Y., Zhai, G., Fu, S., Xia, Y., Hu, B., Cai, X., Zhang Y., Li, Y., Deng Z., Liu, T. 2020. A Cell-Free Platform Based on Nisin Biosynthesis for Discovering Novel Lanthipeptides and Guiding their Overproduction *In Vivo*. *Advanced Science*, 7(17): 2001616. DOI: 10.1002/advs.202001616.
103. López-Jácome, L. E., Fernández-Rodríguez, D., Franco-Cendejas, R., Camacho-Ortiz, A., Morfin-Otero, M. D. R., Rodríguez-Noriega, E., Ponce-de-León, A., Ortiz-Brizuela, E., Rojas-Larios, F., Velázquez-Acosta, M. D. C., Mena-Ramírez, J. P., Rodríguez-Zulueta, P., Bolado-Martínez, E., Quintanilla-Cazares, L. J., Avilés-Benítez, L. K., Consuelo-Munoz, S., Choy-Chang, E. V., Feliciano-Guzmán, J. M., Couoh-May, C. A., López-Gutiérrez, E., Molina-Jaimes, A., Rincón-Zuno, J., Gil-Veloz, M., Alcaraz-Espejel, M., Corte-Rojas, R.E., Gómez-Espinosa J, Monroy-Colin VA, Morales-de-la-Peña CT, Aguirre-Burciaga E, López-Moreno, L. I., Martínez-Villarreal, R. T., Cetina-Umaña, C. M., Galindo-Méndez, M., Soto-Nieto, G. I., Cobos-Canul, D. I., Moreno-Méndez, M. I., Tello-Gómez, E., Romero-Romero, D., Quintana-Ponce, S., Peralta-Catalán, R., Valadez-Quiroz, A., Molina-Chavarría, A., Padilla-Ibarra, C., Barroso-Herrera-Y-Cairo, I. E., Duarte-Miranda, L.S., López-López, D. M., Escalante-Armenta, S. P., Osorio-Guzmán, M. J., López-García, M., Garza-Ramos, U., Delgado-Enciso, I., Garza-González, E. Increment Antimicrobial Resistance During the COVID-19 Pandemic: Results from the Invifar Network. *Microbial Drug Resistance*, 28(3): 338-345. DOI: 10.1089/mdr.2021.0231.
104. Madeira, F., Park, Y. M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P., Tivey, A. R. N., Potter, S. C., Finn, R. D., Lopez, R. 2019. The EMBL-EBI Search and Sequence Analysis Tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research*, 47(W1): W636-W641. DOI: 10.1093/nar/gkz268.
105. Maes, M., Messens, E. 1992. Phenol as Grinding Material in RNA Preparations. *Nucleic Acids Research*, 20(16): 4374. DOI: 10.1093/nar/20.16.4374.
106. Magana, M., Pushpanathan, M., Santos, A. L., Leanse, L., Fernandez, M., Ioannidis, A., Giulianotti, M. A., Apidianakis, Y., Bradfute, S., Ferguson, A. L., Cherkasov, A., Seleem, M. N., Pinilla, C., de la Fuente-Nunez, C., Lazaridis, T., Dai, T., Houghten, R. A., Hancock, R. E. W., Tegos, G. P. 2020. The Value of Antimicrobial Peptides in the Age of Resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, 9: e216-e230. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30327-3.
107. Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L., Björn, C. 2016. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6: 194. DOI: 10.3389/fcimb.2016.00194.
108. Mancilla-Rojano, J., Ochoa, S. A., Reyes-Grajeda, J. P., Flores, V., Medina-Contreras, O., Espinosa-Mazariego, K., Parra-Ortega, I., Rosa-Zamboni, D. De L.,

- Castellanos-Cruz, M. del C., Arellano-Galindo, J., Cevallos, M. A., Hernández-Castro, R., Xicohtencatl-Cortes, J., Cruz-Córdova, A. 2020. Molecular Epidemiology of *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* Complex Isolated from Children at the Hospital Infantil de México Federico Gómez. *Frontiers in Microbiology*, 11: 576673. DOI: 10.3389/fmicb.2020.576673.
109. Märki, F., Hänni, E., Fredenhagen, A., van Oostrum, J. 1991. Mode of Action of the Lanthionine-containing Peptide Antibiotics Duramycin, Duramycin B and C, and Cinnamycin as Indirect Inhibitors of Phospholipase A2. *Biochemical Pharmacology*, 42(10): 2027-2035. DOI: 10.1016/0006-2952(91)90604-4.
110. Martínez-Klimova, E., Rodríguez-Peña, K., Sánchez, S. 2017. Endophytes as Sources of Antibiotics. *Biochemical Pharmacology*, 134: 1-17. DOI: 10.1016/j.bcp.2016.10.010.
111. McIntosh, J. A., Donia, M. S., Schmidt, E. W. 2009. Ribosomal Peptide Natural Products: Bridging the Ribosomal and Nonribosomal Worlds. *Natural Product Reports*, 26(4): 537-59. DOI: 10.1039/b714132g.
112. Medema, M. H., Blin, K., Cimermancic, P., De Jager, V., Zakrzewski, P., Fischbach, M. A., Weber, T., Takano E., Breitling, R. 2011. antiSMASH: Rapid Identification, Annotation and Analysis of Secondary Metabolite Biosynthesis Gene Clusters in Bacterial and Fungal Genome Sequences. *Nucleic Acids Research*, 39(suppl\_2): W339-W346. DOI: 10.1093/nar/gkr466.
113. Meindl, K., Schmiederer, T., Schneider, K., Reicke, A., Butz, D., Keller, S., Gühring, H., Vértesy, L., Wink, J., Hoffmann, H., Brönstrup, M., Sheldrick, G. M., Süßmuth, R. D. 2010. Labyrinthopeptins: A New Class of Carbacyclic Lantibiotics. *Angewandte Chemie International Edition*, 49(6): 1151-1154. DOI: 10.1002/anie.200905773.
114. Melby, J. O., Nard, N. J., Mitchell, D. A. 2011. Thiazole/Oxazole-modified Microcins: Complex Natural Products from Ribosomal Templates. *Current Opinion in Chemical Biology*, 15(3): 369-378. DOI: 10.1016/j.cbpa.2011.02.027.
115. Meyer, C., Bierbaum, G., Heidrich, C., Reis, M., Süling, J., Iglesias-Wind, M. I., Kempter, C., Molitor, E., Sahl, H. G. 1995. Nucleotide Sequence of the Lantibiotic Pep5 Biosynthetic Gene Cluster and Functional Analysis of PepP and PepC: Evidence for a Role of PepC in Thioether Formation. *European Journal of Biochemistry*, 232(2): 478-489. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1995.tb20834.x.
116. Mistry, J., Chuguransky, S., Williams, L., Qureshi, M., Salazar, G. A., Sonnhammer, E. L. L., Tosatto, S. C. E., Paladin, L., Raj, S., Richardson, L. J., Finn, R. D., Bateman, A. 2021. Pfam: The Protein Families Database in 2021. *Nucleic Acids Research*, 49(D1): D412-D419. DOI: 10.1093/nar/gkaa913.
117. Mo, T., Liu, W. Q., Ji, W., Zhao, J., Chen, T., Ding, W., Zhang, Q., 2017. Biosynthetic Insights Into Linaridin Natural Products from Genome Mining and Precursor Peptide Mutagenesis. *ACS Chemical Biology*, 12(6): 1484-1488. DOI: 10.1021/acscchembio.7b00262.
118. Mohanty A. K., Wiener M. C. 2004. Membrane Protein Expression and Production: Effects of Polyhistidine Tag Length and Position. *Protein Expression Purification*, 33: 311-325. DOI: 10.1016/j.pep.2003.10.010.
119. Morfín-Otero, R., Alcántar-Curiel, M. D., Rocha, M. J., Alpuche-Aranda, C. M., Santos-Preciado, J. I., Gayosso-Vázquez, C., Araiza-Navarro, J. R., Flores-Vaca,

- M., Esparza-Ahumada, S., González-Díaz, E., Pérez-Gómez, H. R., Rodríguez-Noriega, E. 2019. *Acinetobacter baumannii* Infections in a Tertiary Care Hospital in Mexico Over the Past 13 years. *Chemotherapy*, 59(1): 57–65. DOI: 10.1159/000351098.
120. Morris, R. P., Leeds, J. A., Naegeli, H. U., Oberer, L., Memmert, K., Weber, E., LaMarche, M. J., Parker, C. N., Burrer, N., Esterow, S., Hein, A. E., Schmitt, E. K., Krastel, P. 2009. Ribosomally Synthesized Thiopeptide Antibiotics Targeting Elongation Factor Tu. *Journal of the American Chemical Society*, 131(16): 5946-5955. DOI: 10.1021/ja900488a.
121. Ökesli, A., Cooper, L. E., Fogle, E. J., van der Donk, W. A. 2011. Nine Post-Translational Modifications During the Biosynthesis of Cinnamycin. *Journal of the American Chemical Society*, 133: 13753-13760. DOI: 10.1021/ja205783f.
122. Ongey, E. L., Giessmann, R. T., Fons, M., Rappsilber, J., Adrian, L., Neubauer, P. 2018. Heterologous Biosynthesis, Modifications and Structural Characterization of Ruminococcin-A, a Lanthipeptide from the Gut Bacterium *Ruminococcus gnavus* E1, in *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 9: 1688-1709. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01688.
123. Ongey, E. L., Neubauer, P. 2016. Lanthipeptides: Chemical Synthesis Versus *In Vivo* Biosynthesis as Tools for Pharmaceutical Production. *Microbial Cell Factories*, 15(1): 1-16. DOI: 10.1186/s12934-016-0502-y.
124. Ongey, E. L., Yassi, H., Pflugmacher, S., Neubauer, P. 2017. Pharmacological and Pharmacokinetic Properties of Lanthipeptides Undergoing Clinical Studies. *Biotechnology letters*, 39(4): 473-482. DOI: 10.1007/s10529-016-2279-9.
125. Ortega, M. A., Hao, Y., Walker, M. C., Donadio, S., Sosio, M., Nair, S. K., van Der Donk, W. A. 2016. Structure and tRNA specificity of MibB, a lantibiotic dehydratase from Actinobacteria involved in NAI-107 biosynthesis. *Cell chemical biology*, 23(3): 370-380. DOI: 10.1016/j.chembiol.2015.11.017.
126. Ortega, M. A., Hao, Y., Zhang, Q., Walker, M. C., van der Donk, W. A., Nair, S. K. 2015. Structure and mechanism of the tRNA-dependent lantibiotic dehydratase NisB. *Nature*, 517(7535): 509-512. DOI: 10.1038/nature13888.
127. Ortega, M. A., van Der Donk, W. A., 2016. New Insights Into the Biosynthetic Logic of Ribosomally Synthesized and Post-translationally Modified Peptide Natural Products. *Cell Chemical Biology*, 23(1): 31-44. DOI: 10.1016/j.chembiol.2015.11.012.
128. Peschel, A., Schnell, N., Hille, M., Entian, K. D., Götz, F. 1997. Secretion of the Lantibiotics Epidermin and Gallidermin: Sequence Analysis of the Genes *gdmT* and *gdmH*, their Influence on Epidermin Production and their Regulation by EpiQ. *Molecular and General Genetics MGG*, 254(3): 312-318. DOI: 10.1007/s004380050421.
129. Primo, M. G. B., Guilarde, A. O., Martelli, C. M. T., de Abreu Batista, L. J., Turchi, M. D. 2012. Healthcare-associated *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infection: Length of Stay, Attributable Mortality, and Additional Direct Costs. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16(6): 503-509. DOI: 10.1016/j.bjid.2012.10.001.
130. Priyadharsini, P., Dhanasekaran, D. 2015. Diversity of Soil Allelopathic Actinobacteria in Tiruchirappalli District, Tamilnadu, India. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 14(1): 54-60. DOI: 10.1016/j.jssas.2013.07.001.

131. Prochnow, H., Rox, K., Birudukota, N. S., Weichert, L., Hotop, S. K., Klahn, P., Mohr, K., Franz, S., Banda, D. H., Blockus, S., Schreiber, J., Haid, S., Oeyen, M., Martinez, J. P., Süßmuth, R. D., Wink, J., Meyerhans, A., Goffinet, C., Messerle, M., Schulz, T. F., Kröger, A., Schols, D., Pietschmann, T., Broenstrup, M. 2020. Labyrinthopeptins Exert Broad-spectrum Antiviral Activity Through Lipid-binding-Mediated Virolysis. *Journal of Virology*, 94(2): e01471-19. DOI: 10.1128/JVI.01471-19.
132. Rahman, I. R., Acedo, J. Z., Liu, X. R., Zhu, L., Arrington, J., Gross, M. L., van Der Donk, W. A. 2020. Substrate Recognition by the Class II Lanthipeptide Synthetase HalM2. *ACS Chemical Biology*, 15(6): 1473-1486. DOI: 10.1021/acscchembio.0c00127.
133. Rawson, T. M., Moore, L. S. P., Zhu, N., Ranganathan, N., Skolimowska, K., Gilchrist, M., Satta, G., Cooke, G., Holmes, A. 2020. Bacterial and Fungal Co-infection in Individuals With Coronavirus: A rapid Review to Support COVID-19 Antimicrobial Prescribing. *Clinical Infectious Diseases*, 71(9): 2459-2468. DOI: 10.1093/cid/ciaa530.
134. Ren, H., Shi, C., Bothwell, I. R., van Der Donk, W. A., Zhao, H. 2020. Discovery and Characterization of a Class IV Lanthipeptide with a Nonoverlapping Ring Pattern. *ACS Chemical Biology*, 15(6): 1642-1649. DOI: 10.1021/acscchembio.0c00267.
135. Repka, L. M., Chekan, J. R., Nair, S. K., van Der Donk, W. A., 2017. Mechanistic Understanding of Lanthipeptide Biosynthetic Enzymes. *Chemical Reviews*, 117(8): 5457-5520. DOI: 10.1021/acs.chemrev.6b00591.
136. Rodríguez-Peña K. 2020. *Búsqueda de Metabolitos Secundarios de Interés Farmacológico en Microorganismos Endófitos de Amphipterygium adstringens* (Tesis de doctorado, en proceso de publicación). Universidad Nacional Autónoma de México.
137. Sahl, H. G., Bierbaum, G. 1998. Lantibiotics: Biosynthesis and Biological Activities of Uniquely Modified Peptides from Gram-positive Bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 52(1): 41-79. DOI: 10.1146/annurev.micro.52.1.41.
138. Sambeth, G. M., Süßmuth, R. D. 2011. Synthetic Studies Toward Labionin, a New  $\alpha$ ,  $\alpha$ -disubstituted Amino Acid from Type III Lantibiotic Labyrinthopeptin A2. *Journal of Peptide Science*, 17(8): 581-584. DOI: 10.1002/psc.1378.
139. Scheffler, R. J., Colmer, S., Tynan, H., Demain, A. L., Gullo, V. P. 2013. Antimicrobials, Drug Discovery, and Genome Mining. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(3): 969-978. DOI: 10.1007/s00253-012-4609-8.
140. Schnell, N., Engelke, G., Augustin, J., Rosenstein, R., Ungermann, V., Götz, F., Entian, K. D. 1992. Analysis of Genes Involved in the Biosynthesis of Lantibiotic Epidermin. *European Journal of Biochemistry*, 204(1): 57-68. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1992.tb16605.x.
141. Sherwood, E. J., Hesketh, A. R., Bibb, M. J. 2013. Cloning and Analysis of the Planosporicin Lantibiotic Biosynthetic Gene Cluster of *Planomonospora alba*. *Journal of Bacteriology*, 195(10): 2309-2321. DOI: 10.1128/JB.02291-12.
142. Shin, J. M., Gwak, J. W., Kamarajan, P., Fenno, J. C., Rickard, A. H., Kapila, Y. L. 2016. Biomedical Applications of Nisin. *Journal of Applied Microbiology*, 120(6), 1449-1465. DOI: 10.1111/jam.13033.

143. Sieswerda, E., de Boer M. G. J., Bonten, M. M. J., Boersma, W. G., Jonkers, R. E., Aleva, R. M., Kullberg, B. J., Schouten, J. A., van de Garde, E. M. W., Verheij, T. J., van der Eerden, M. M., Prins, J. M., Wiersinga, W. J. Recommendations for Antibacterial Therapy in Adults with COVID-19 - an Evidence Based Guideline. *Clinical Microbiology and Infection*, 27(1): 61-66. DOI: 10.1016/j.cmi.2020.09.041.
144. Siezen, R. J., Kuipers, O. P., de Vos, W. M. 1996. Comparison of Lantibiotic Gene Clusters and Encoded Proteins. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69(2): 171-184. DOI: 10.1007/BF00399422.
145. Singh, M., Kumar, A., Singh, R., Pandey, K. D. 2017. Endophytic Bacteria: A New Source of Bioactive Compounds. *3 Biotech*, 7(5): 315. DOI: 10.1007/s13205-017-0942-z.
146. Singh, R., Dubey, A. K., 2015. Endophytic Actinomycetes as Emerging Source for Therapeutic Compounds. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*, 5(2): 106-116. DOI: 10.35652/IGJPS.2015.11.
147. Sivonen, K., Leikoski, N., Fewer, D. P., Jokela, J. 2010. Cyanobactins-ribosomal Cyclic Peptides Produced by Cyanobacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(5): 1213-1225. DOI: 10.1007/s00253-010-2482-x.
148. Stone, J. K., Bacon, C. W., White, J. F. 2000. *An Overview of Endophytic Microbes: Endophytism Defined*. Microbial Endophytes, pp. 29-33.
149. Tabata, T., Pettitt, M., Puerta-Guardo, H., Michlmayr, D., Wang, C., Fang-Hoover, J., Pereira, L. 2016. Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells, Suggesting Two Routes for Vertical Transmission. *Cell Host & Microbe*, 20(2): 155-166. DOI: 10.1016/j.chom.2016.07.002.
150. Tang, X., Nakata, Y., Li, H. O., Zhang, M., Gao, H., Fujita, A., Sakatsume, O., Ohta, T., Yokoyama, K., 1994. The Optimization of Preparations of Competent Cells for Transformation of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 22(14): 2857-2858. DOI: 10.1093/nar/22.14.2857.
151. Tegel, H., Ottosson, J., Hober, S. 2011. Enhancing the Protein Production Levels in *Escherichia coli* With a Strong Promoter. *The FEBS Journal*, 278(5): 729-739. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07991.x
152. Tocchetti, A., Iorio, M., Hamid, Z., Armirotti, A., Reggiani, A., Donadio, S. 2021. Understanding the Mechanism of Action of NAI-112, a Lanthipeptide with Potent Antinociceptive Activity. *Molecules*, 26(22): 6764. DOI: 10.3390/molecules26226764.
153. Tolia, N. H., Joshua-Tor, L. 2006. Strategies for Protein Coexpression in *Escherichia coli*. *Nature Methods*, 3(1): 55-64. DOI: 10.1038/nmeth0106-55.
154. van Duin, D., Paterson, D. L. 2016. Multidrug-resistant Bacteria in the Community: Trends and Lessons Learned. *Infectious Disease Clinics*, 30(2): 377-390. DOI: 10.1016/j.idc.2016.02.004.
155. van Heel, A. J., de Jong, A., Montalban-Lopez, M., Kok, J., Kuipers, O. P. 2013. BAGEL3: Automated Identification of Genes Encoding Bacteriocins and (non) Bactericidal Posttranslationally Modified Peptides. *Nucleic Acids Research*, 41(W1): W448-W453. DOI: 10.1093/nar/gkt391.
156. van Heel, A. J., de Jong, A., Song, C., Viel, J. H., Kok, J., Kuipers, O. P. 2018. BAGEL4: A User-friendly Web Server to Thoroughly Mine RiPPs and Bacteriocins. *Nucleic Acids Research*, 46(W1): W278-W281. DOI: 10.1093/nar/gky383.

157. van Kraaij, C., Breukink, E., Rollema, H. S., Bongers, R. S., Kusters, H. A., de Kruijff, B., Kuipers, O. P. 2000. Engineering a Disulfide Bond and Free Thiols in the Lantibiotic Nisin Z. *European Journal of Biochemistry*, 267(3): 901-909. DOI: 10.1046/j.1432-1327.2000.01075.x.
158. van Staden A. D. P., van Zyl W. F., Trindade M., Dicks L. M. T., Smith C. 2021. Therapeutic Application of Lantibiotics and Other Lanthipeptides: Old and New Findings. *Applied Environmental Microbiology*, 87(14):e0018621. DOI: 10.1128/AEM.00186-21.
159. Walker, M. C., Eslami, S. M., Hetrick, K. J., Ackenhusen, S. E., Mitchell, D. A., van Der Donk, W. A. 2020. Precursor Peptide-targeted Mining of More than One Hundred Thousand Genomes Expands the Lanthipeptide Natural Product Family. *BMC Genomics*, 21(1): 1-17. DOI: 10.1186/s12864-020-06785-7.
160. Wang, H., van Der Donk, W. A. 2012. Biosynthesis of the Class III Lantipeptide Catenulipeptin. *ACS Chemical Biology*, 7(9): 1529-1535. DOI: 10.1021/cb3002446.
161. Weber, T., Blin, K., Duddela, S., Krug, D., Kim, H. U., Bruccoleri R., Lee, S. Y., Fischbach, M. A., Müller, R., Wohlleben, W., Breitling, R., Takano, E., Medema, M. H. 2015. antiSMASH 3.0-A Comprehensive Resource for the Genome Mining of Biosynthetic Gene Clusters. *Nucleic Acids Research*, 43(W1): W237-W243. DOI: 10.1093/nar/gkv437.
162. Wimley, W. C., Hristova, K. 2019. The Mechanism of Membrane Permeabilization by Peptides: Still an Enigma. *Australian Journal of Chemistry*, 73(3): 96-103. DOI: 10.1071/CH19449.
163. Xie, L., Miller, L. M., Chatterjee, C., Averin, O., Kelleher, N. L., van der Donk, W. A. 2004. Lacticin 481: *In Vitro* Reconstitution of Lantibiotic Synthetase Activity. *Science*, 303: 679–681. DOI: 10.1126/science.1092600.
164. Yang, X., Lennard, K. R., He, C., Walker, M. C., Ball, A. T., Doigneaux, C., Tavassoli, A., Van Der Donk, W. A. 2018. A lanthipeptide Library Used to Identify a Protein-Protein Interaction Inhibitor. *Nature chemical biology*, 14(4): 375-380. DOI: 10.1038/s41589-018-0008-5.
165. Yu, G., Baeder, D. Y., Regoes, R. R., Rolff, J. 2018. Predicting Drug Resistance Evolution: Insights from Antimicrobial Peptides and Antibiotics. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1874): 20172687. DOI: 10.1098/rspb.2017.2687.
166. Yu, H., Zhang, L., Li, L., Zheng, C., Guo, L., Li, W., Sun, P., Qin, L., 2010. Recent Developments and Future Prospects of Antimicrobial Metabolites Produced by Endophytes. *Microbiological Research*, 165(6): 437-449. DOI: 10.1016/j.micres.2009.11.009.
167. Zasloff, M., 2019. Antimicrobial Peptides of Multicellular Organisms: My Perspective. *Antimicrobial Peptides*, 1117: 3-6. DOI: 10.1007/978-981-13-3588-4\_1.
168. Zeitlin, P. L., Boyle, M. P., Guggino, W. B., Molina, L. 2004. A Phase I Trial of Intranasal Moli1901 for Cystic Fibrosis. *Chest*, 125(1): 143-149. DOI: 10.1378/chest.125.1.143.
169. Zhang, Q., Doroghazi, J. R., Zhao, X., Walker, M. C., van der Donk, W. A. 2015. Expanded Natural Product Diversity Revealed by Analysis of Lanthipeptide-

- like Gene Clusters in Actinobacteria. *Applied and environmental microbiology*, 81(13): 4339-4350. DOI: 10.1128/AEM.00635-15.
170. Zhang, Q., Yu, Y., Vélasquez, J. E., van der Donk, W. A. 2012. Evolution of Lanthipeptide Synthetases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(45): 18361-18366. DOI: 10.1073/pnas.1210393109.
171. Zhang, Y., Li, K., Yang, G., McBride, J. L., Bruner, S. D., Ding, Y. 2018. A Distributive Peptide Cyclase Processes Multiple Microviridin Core Peptides within a Single Polypeptide Substrate. *Nature Communications*, 9(1): 1780-1790. DOI: 10.1038/s41467-018-04154-3.
172. Zhong, Z., He, B., Li, J., Li, Y. X. 2020. Challenges and Advances in Genome Mining of Ribosomally Synthesized and Post-translationally Modified Peptides (RiPPs). *Synthetic and Systems Biotechnology*, 5(3): 155-172. DOI: 10.1016/j.synbio.2020.06.002.
173. Ziemert, N., Alanjary, M., Weber, T. 2016. The Evolution of Genome Mining in Microbes—a Review. *Natural Product Reports*, 33(8): 988-1005. DOI: 10.1039/c6np00025h.