



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Clonación y expresión del gen que codifica para  
una metiltransferasa de *Micromonospora*  
*echinospora* para la síntesis de un lantipéptido”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

Yvette Ximena González López

Tutores:

Dr. Sergio Sánchez Esquivel  
M. en C. Dulce María Ramírez Rendón



Ciudad Universitaria Cd. Mx., 2024



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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra

**VOCAL:** Dr. Euclides Avila Chávez

**SECRETARIO:** Dr. Sergio Sánchez Esquivel

**1er SUPLENTE:** Dr. J. Eleazar Martínez Barajas

**2do SUPLENTE:** M. en C. Raquel Ortega Muñoz

**SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:**

Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Laboratorio C106, Ciudad Universitaria, CDMX.

**ASESOR DEL TEMA:**

Dr. Sergio Sánchez Esquivel \_\_\_\_\_

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

M. en C. Dulce María Ramírez Rendón \_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE:**

Yvette Ximena González López \_\_\_\_\_

## **FINANCIAMIENTO Y APOYO**

Este proyecto fue financiado gracias al apoyo del programa “Nuevas Alternativas para el Tratamiento de Enfermedades Infecciosas” (NUATEI) del Instituto de Investigaciones Biomédicas y el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), proyecto IN205922.

Agradezco el apoyo de la M. en C. Dulce María Ramírez Rendón y el Dr. Fernando Guzmán Chávez por la asesoría durante el desarrollo de diferentes técnicas experimentales y a la Dra. Beatriz Ruiz Villafán por el apoyo en la adquisición de reactivos y material de laboratorio

## AGRADECIMIENTOS

Estudiar en la Facultad de Química ha sido el reto más grande de mi vida; tan complejo, difícil y exigente, pero al mismo tiempo ha sido una de las bendiciones más grandes que he tenido. Quiero agradecer principalmente a **Dios** por permitirme vivir esta experiencia, por ser mi apoyo constante y el motivo por el cuál mi familia ha salido adelante. Llegar a este momento de mi vida me conmueve mucho y me regala el deseo de seguir cumpliendo muchos sueños más.

Le agradezco infinitamente a mis tutores, al **Dr. Sergio Sánchez Esquivel** por recibirme en su grupo de trabajo y brindarme el espacio para desarrollar un proyecto de investigación. Pero sobre todo le agradezco su confianza, su apoyo y su amistad. Espero ser tan exitosa como él en algún momento de mi vida. A la **M. en C. Dulce María Ramírez Rendón** por la oportunidad de ser su aprendiz y enseñarme a trabajar en el laboratorio. Su paciencia, su amistad, el conocimiento que me ha compartido y la oportunidad de trabajar con ella me ha motivado a conseguir un segundo título, el de maestría.

A los miembros de mi Jurado revisor, **Francisco Javier Plasencia de la Parra, Euclides Avila Chávez, Eleazar Martínez Barajas y Raquel Ortega Muñoz**. Por sus observaciones, su tiempo y disposición para revisar mi trabajo. Su cooperación y disponibilidad me ha facilitado llegar al proceso final de titulación.

A todos mis profesores, quienes pusieron su esfuerzo, dedicación y paciencia para formarme como química. Gracias por compartirme su amplio conocimiento y por confiar en que algún día me convertiría en QFB.

Le expreso mi profundo agradecimiento a la Facultad de Química y a la UNAM, por recibirme en sus instalaciones y darme la oportunidad de descubrir mi pasión y amor por la ciencia y el conocimiento. Para mí es un honor y una bendición ser egresada de esta universidad. La UNAM se ha convertido en mi segunda casa y me ha regalado la dicha de tener amigos, a quienes admiro y les agradezco su apoyo incondicional. Su cariño me ha dado muchos momentos de alegría en la Facultad, los cuales guardaré hasta el final de mi vida.

A mis compañeros del laboratorio; **Andy, Gladys, Onely, Carlos, Alma, Rodri, Valery, Bere, Susi, Karen, Rosalía, Emiliano y Fer Torres**, quienes se han convertido en mis amigos. Gracias por su apoyo, sus consejos y su compañía durante el desarrollo del proyecto. Me han enseñado más de lo que pueden imaginar.

## DEDICATORIA

A mis padres, **Luis** y **Paula** quienes han hecho hasta lo imposible por darme la oportunidad de crecer y estudiar. Por enseñarme la importancia del trabajo constante y la responsabilidad. Pero más que nada, por confiar en mí y por llenarme todos los días de su apoyo y amor. El esfuerzo, la dedicación y el cariño con que me han criado me convirtió en una profesionalista. Todo lo que soy es gracias a ellos.

A mis hermanas, **Jubilee**, **Elizabeth** y **María** por ser el mejor equipo que pude pedir y apoyarme en absolutamente todo. Por ayudarme con mis tareas, por despertarme en las madrugadas cuando tenía que estudiar, por hacerme reír, pero sobre todo por la lucha tan grande que han hecho durante el tiempo de pandemia, son unas guerreras. No habría podido terminar sin toda su ayuda y cariño. Y a mis pequeños hermanos, **José María** y **Jesús** por cuidarnos desde el cielo.

A mis abuelos, **Silvia e Hilario** por su apoyo constante y por cuidar de mi familia con mucho amor. Por ser un ejemplo de fortaleza y trabajo duro, pero sobre todo por la familia tan grande y fuerte que han formado. Pertenecer a ella y compartir una vida ha sido una bendición para mí, además del motivo de muchos momentos de alegría.

A mis abuelos, **Eva** y **Samuel** por enseñarme a creer, a tener fe y a nunca perder la esperanza. Su sencillez, sus detalles y su generosidad me han enseñado que siempre es posible salir adelante. Gracias abuelito Samuel por enseñarme a sonreír aún en la adversidad, deseo que desde el cielo puedas compartir conmigo la alegría de este triunfo.

A mi compañero de aventuras, **Gabriel** por apoyarme siempre, por estar para mí, por cuidarme y motivarme a cumplir mis sueños. Gracias por hacerme sonreír todos los días. Te quiero.

A todos mis amigos, los que siguen conmigo a pesar de los años, la distancia y las dificultades. Por sus palabras de aliento y por motivarme siempre, por el apoyo, las alegrías y todo el cariño que han compartido conmigo. Me considero muy afortunada de tener a los amigos que tengo. Gracias por ser mi segunda familia.

A toda mi familia, muchas gracias por todo. Yo soy un claro ejemplo de que el amor, el apoyo y la fe de los demás pueden sacar a una persona adelante.

¡Gracias Dios, gracias vida y muchas gracias a ti que lees este trabajo!

# ÍNDICE GENERAL

INDICE DE FIGURAS .....	8
ÍNDICE DE TABLAS .....	10
RESUMEN.....	11
INTRODUCCION.....	12
Resistencia a antibióticos: Un problema de salud a nivel mundial. ....	12
Bacteriocinas.....	15
Lantipéptidos.....	17
Clasificación de los lantipéptidos .....	21
Mecanismo de acción de las bacteriocinas .....	24
Enzimas decoradoras o “tailoring” .....	25
Metiltransferasa .....	27
<i>Micromonospora echinospora</i> .....	29
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	31
HIPOTESIS.....	31
OBJETIVO GENERAL .....	32
OBJETIVOS PARTICULARES.....	32
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL. ....	33
Análisis bioinformático.....	33
AntiSMASH y diseño de oligonucleótidos .....	33
Análisis de propiedades fisicoquímicas.....	34
Alineamiento múltiple de metiltransferasas involucradas en la síntesis de lantipéptidos de clase I. ....	35
Clonación del gen de interés .....	37
Amplificación del gen de la metiltransferasa. ....	37
Purificación del inserto.....	42
Digestión del vector pRSFC.S y del inserto.....	42
Ligación vector-inserto.....	44
Transformación en células competentes de <i>E. coli</i> Top 10. ....	45
PCR de colonia.....	46
Confirmación de la clonación vector-inserto.....	47
Secuenciación del plásmido pRSFC.S-Met.....	49
Expresión del clúster biosintético completo .....	50
Transformación en células competentes de <i>E. coli</i> BL21 .....	51
Inducción de la expresión de genes biosintéticos .....	52

Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	53
Tinción con Azul de Coomassie .....	54
Western Blot .....	56
RESULTADOS .....	57
Análisis bioinformático.....	57
AntiSMASH.....	57
Propiedades fisicoquímicas de la enzima .....	59
Alineamiento múltiple de metiltransferasas asociadas a lantipéptidos de clase I. ....	60
Clonación del gen de interés .....	62
Temperatura de alineamiento óptima para amplificar el gen <i>metiltransferasa</i> . ....	62
Amplificación del gen metiltransferasa .....	63
Digestión del vector pRSFC.S .....	64
PCR de colonia.....	66
Confirmación de la clonación vector- inserto.....	68
Alineamiento de la secuencia teórica y experimental del vector pRSFC.S-Met.....	70
Expresión del clúster biosintético completo .....	77
DISCUSIÓN.....	80
CONCLUSIONES .....	87
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	88
ANEXO .....	94



# INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la nisina. ....	17
Figura 2. Reacciones de modificación postraduccional que conducen a la formación de lantionina (Lan) o metilantionina (MeLan) .....	19
Figura 3. Vía biosintética general para los péptidos sintetizados ribosomalmente y modificados postraduccionalmente (RiPPs).....	20
Figura 4. Reacción enzimática catalizada por LanB.....	22
Figura 5. Cinco clases de lantipéptidos basados en su maquinaria biosintética.....	23
Figura 6. Mecanismos de acción de bacteriocinas en bacterias Gram positivas .....	25
Figura 7. Reacción de la enzima metiltransferasa OlvSA presente en <i>Streptomyces olivaceus</i> NRRL B-3009. ....	28
Figura 8. Condiciones utilizadas en el termociclador para amplificar al gen de interés. 41	
Figura 9. Clústeres de metabolitos secundarios en el genoma de <i>M. echinospora</i> .....	57
Figura 10. Organización de los genes en el clúster biosintético 1.7 asociado a la producción de un lantipéptido de clase I en el genoma de <i>M. echinospora</i> .....	58
Figura 11. Alineamiento múltiple de metiltransferasas asociadas a lantipéptidos de clase I presentes en diferentes especies bacterianas.....	61
Figura 12. Determinación de temperatura de alineamiento óptima para la amplificación de la metiltransferasa de <i>M. echinospora</i> .....	63
Figura 13. Amplificación del gen de la metiltransferasa de <i>M. echinospora</i> .....	64
Figura 14. Digestión del vector pRSFC.S.....	65
Figura 15. PCR de 50 colonias candidatas. ....	66
Figura 16. PCR de 9 colonias candidatas. ....	67
Figura 17. Digestión de pRSFC.S-Met.....	69
Figura 18. Alineamiento de la secuencia teórica del vector pRSFC.S-Met con la secuencia obtenida en la construcción de la colonia 1 utilizando el oligonucleótido ACYCDuetUp1. ....	71
Figura 19. Alineamiento de la secuencia teórica del vector pRSFC.S-Met con la secuencia obtenida en la construcción de la colonia 1 utilizando el oligonucleótido DuetDOWN1.....	72
Figura 20. Alineamiento de la secuencia teórica del vector pRSFC.S-Met con la secuencia obtenida en la construcción de la colonia 2 utilizando el oligonucleótido ACYCDuetUP1. ....	73

Figura 21. Alineamiento de la secuencia teórica del vector pRSFC.S-Met con la secuencia obtenida en la construcción de la colonia 2 utilizando el oligonucleótido DuetDOWN1.....	74
Figura 22. Expresión del LanB y LanC en <i>E. coli</i> BL21. ....	78
Figura 23. Western blot para la detección de LanA y metiltransferasa expresadas en <i>E. coli</i> BL21. ....	78

# INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos sugeridos por la OMS (WHO, 2017) .....	14
Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para la amplificación del gen metiltransferasa ...	34
Tabla 3. Secuencias de aminoácidos correspondientes a metiltransferasas asociadas a lantipéptidos de clase I .....	36
Tabla 4. Componentes de PCR para determinar temperatura de alineamiento óptima.	38
Tabla 5. Condiciones del termociclador para determinar la temperatura de alineamiento. ....	39
Tabla 6. Componentes de PCR para aumentar copias del gen .....	41
Tabla 7. Reacciones de digestión con enzimas de restricción. ....	43
Tabla 8. Ligación del inserto <i>metiltransferasa</i> con el vector pRSFC.S.....	44
Tabla 9. Componentes para PCR de colonia .....	47
Tabla 10. Digestión para identificar la construcción pRSFC.S-Met .....	49
Tabla 11. Oligos empleados para la secuenciación del gen <i>metiltransferasa</i> .....	50
Tabla 12. Preparación de buffer de carga 2x .....	53
Tabla 13. Preparación de buffer de corrida 1X .....	54
Tabla 14. Preparación de soluciones para teñir con Azul de Coomassie .....	55
Tabla 15. Preparación de solución con Azul de Coomassie .....	55
Tabla 16: Secuencia de nucleótidos que codifica para la enzima metiltransferasa .....	58
Tabla 17: Secuencia de aminoácidos de la enzima metiltransferasa .....	59
Tabla 18. Propiedades fisicoquímicas teóricas de la enzima metiltransferasa.....	59
Tabla 19. Porcentaje de identidad y cobertura de metiltransferasas involucradas en la síntesis de lantipéptidos de clase I en relación con la enzima de interés. ....	60

# RESUMEN

Hoy en día existe un alarmante panorama en donde microorganismos patógenos presentan resistencia a los antibióticos conocidos, ocasionando un problema de salud que va incrementando con el paso del tiempo. En este contexto, los lantipéptidos son compuestos con actividad antimicrobiana que se caracterizan por tener lantionina o metilantionina en su estructura. El análisis bioinformático del genoma de la bacteria *Micromonospora echinospora* identificó la presencia de un clúster en la región 7 del cromosoma bacteriano que codifica para un lantipéptido de clase I. El clúster está formado por 4 genes que codifican proteínas diferentes: LanA, LanB, LanC y metiltransferasa. La metiltransferasa es una enzima decoradora con la capacidad de transformar un aminoácido aspartato conservado a un aminoácido isoaspartato. Actualmente no se conoce la influencia de esta modificación postraducciona, sin embargo, podría estar involucrada en la mejora de la actividad del lantipéptido. En nuestro laboratorio, las proteínas LanA, LanB y LanC fueron clonadas y expresadas en *Escherichia coli*; sin embargo, nos interesa determinar el papel que tiene la enzima metiltransferasa en la actividad del lantipéptido. Por lo tanto, este proyecto buscó continuar con la obtención del clúster completo de *M. echinospora* llevando a cabo la clonación y expresión del gen *metiltransferasa* para su posterior análisis en el laboratorio. Para ello, se clonó el gen *metiltransferasa* a partir del DNA genómico de *M. echinospora* en el sitio de clonación múltiple I de la construcción pRSFC.S. La nueva construcción recibió el nombre pRSFC.S-Met. Finalmente, se identificó la expresión de las proteínas de interés utilizando geles desnaturizantes de poliacrilamida al 10% y Western Blot. De esta manera se confirmó que las cuatro proteínas de interés podían ser expresadas en un sistema heterólogo de *E. coli* para su posterior análisis en el laboratorio.

# INTRODUCCION

## Resistencia a antibióticos: Un problema de salud a nivel mundial.

La era moderna de los antibióticos comenzó con el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928, desde entonces los antibióticos han salvado millones de vidas (Ventola, 2015). Desafortunadamente, al mismo tiempo en que aumentaba la producción de antibióticos se favorecía un incremento importante en la aparición de bacterias, hongos y parásitos resistentes a los mismos. Durante los primeros 25 años después de la introducción de los primeros antibióticos, la resistencia de patógenos a los mismos generó un problema, sobre todo para pacientes hospitalizados. Muchos de estos organismos no solo presentaban resistencia a múltiples medicamentos antimicrobianos, sino que tenían la capacidad de permanecer vivos y viables en el entorno hospitalario, afectando a la mayoría de los pacientes vulnerables. Algunos de los síntomas que presentan este tipo de pacientes son inmunosupresión, debilidad y aparición de enfermedades crónicas por infecciones severas (Alanis, 2005). Según los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC), más de dos millones de personas en Estados Unidos enferman cada año con enfermedades resistentes a los antibióticos, lo que provoca un mínimo de 23,000 muertes (Dadgostar, 2019). Por tal razón, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha designado la resistencia antimicrobiana (RAM) como uno de los problemas más importantes que enfrenta la humanidad al constituir una de las mayores amenazas para la salud en este siglo.

Solo en Europa se estima un gasto de más de nueve mil millones de euros al año, mientras que en Estados Unidos se estima un excedente de 20 mil millones de dólares en costos directos de atención médica, sin incluir alrededor de 35 mil millones de dólares en pérdida de productividad anualmente (Dadgostar, 2019).

Algunos CDCs han clasificado una serie de bacterias como amenazas emergentes, graves y preocupantes, muchas de las cuales ya son responsables de imponer una carga clínica y financiera sustancial al sistema de atención médica de los Estados Unidos (Ventola, 2015). Entre las infecciones más temibles en la actualidad están las producidas por Gram negativos drogo multirresistentes, para las cuales no queda casi ninguna opción de tratamiento (Quiñones, 2017).

Se considera que la resistencia antimicrobiana ha ganado fuerza debido al uso desmedido y poco controlado de los antibióticos de amplio espectro, en muchas ocasiones de forma innecesaria (Frieri *et al.*, 2017). Desde 1945, Alexander Fleming predijo que el uso excesivo de antibióticos impulsaría la evolución de la resistencia microbiana a los mismos, incluso estudios epidemiológicos han demostrado una relación directa entre el consumo de antibióticos y la aparición de cepas bacterianas resistentes (Ventola, 2015).

Con la finalidad de favorecer las iniciativas de investigación para el desarrollo de nuevos fármacos y la mejora de los existentes, la OMS ha publicado una lista de patógenos resistentes a los antibióticos en donde se enmarcan 12 familias de bacterias consideradas como peligrosas para la salud humana y sobre las cuales recae la necesidad de promover la investigación y desarrollo de nuevas alternativas de antibióticos (Quiñones, 2017). Las bacterias de máxima prioridad son

*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacteriaceae*, el resto se enlistan en la Tabla 1.

Tabla 1. Lista de patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos sugeridos por la OMS (WHO, 2017)		
PRIORIDAD	GÉNEROS Y/O FAMILIAS	SITUACIÓN
1.CRITICO	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Resistencia al carbapenem
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Resistencia al carbapenem
	<i>Enterobacteriaceae</i>	Resistencia al carbapenem Resistencia a cefalosporinas de 3° generación.
2.ALTO	<i>Enterococcus faecium</i> ( <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter</i> spp., <i>Serratia</i> spp., <i>Proteus</i> spp., <i>Providencia</i> spp, <i>Morganella</i> spp.)	Resistencia a vancomicina
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Resistencia a meticilina Resistente intermedio a vancomicina
	<i>Helicobacter pylori</i>	Resistencia a claritromicina
	<i>Campylobacter</i>	Resistencia a fluoroquinolonas
	<i>Salmonella</i> spp.	Resistencia a fluoroquinolonas
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Resistencia a cefalosporinas de 3° generación. Resistencia a fluoroquinolonas
3.MEDIO	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	No susceptible a penicilinas
	<i>Haemophilus influenzae</i>	Resistente a ampicilina
	<i>Shigella</i> spp.	Resistencia a fluoroquinolonas

Se han hecho esfuerzos por encontrar antibióticos que hagan frente a la problemática de resistencia antimicrobiana, pero con el paso de los años las soluciones encontradas se vuelven ineficientes. Un ejemplo es el caso de *Staphylococcus aureus*, una bacteria conocida por ser causante de un amplio rango de infecciones clínicas severas (Frieri *et al.*, 2017); existe una variante resistente a la meticilina (MRSA) que presenta resistencia a múltiples agentes antimicrobianos y se ha visto implicada en el aumento de infecciones hospitalarias a nivel mundial (Ratti &

Sousa, 2009). En *Pseudomonas aeruginosa* se ha detectado la presencia de enzimas carbapenemasas, destacadas por su capacidad de hidrolizar a prácticamente todos los betalactámicos y diseminarse en diferentes microorganismos (Nicolau & Oliver, 2010). A este mecanismo de resistencia se le asocia una tasa de mortalidad de entre el 40% y el 80% (Quiñones, 2017). En 1972 se introdujo la vancomicina en la práctica clínica para el tratamiento contra la resistencia a meticilina en *S. aureus* y estafilococos coagulasa negativos; sin embargo, se notificaron casos de resistencia a la vancomicina en 1979 y 1983 (Ventola, 2015). Ante este panorama, se vuelve necesaria la investigación y desarrollo de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana potencial, que puedan hacer frente a los patógenos resistentes.

## Bacteriocinas

La naturaleza es una enorme fuente de recursos para el ser humano; entre ellos encontramos una amplia variedad de compuestos con gran potencial para su uso en la medicina moderna, tal cual es el caso de los antibióticos. Dentro de estos compuestos podemos mencionar a los péptidos antimicrobianos (AMPs). Las bacterias pueden producir dos tipos de AMPs: los que son sintetizados de manera ribosomal y los que no son sintetizados ribosomalmente (Chikindas *et al.*, 2018).

Dentro de los péptidos sintetizados ribosomalmente se encuentran las bacteriocinas, que son sustancias biológicamente activas de naturaleza proteica (Chikindas *et al.*, 2018) con potencial actividad antimicrobiana (Riley & Wertz, 2002). Las



bacteriocinas poseen carga neta positiva y son de naturaleza anfipática (Chikindas *et al.*, 2018). La mayoría de sus aplicaciones está dirigida al combate contra microorganismos Gram positivos.

La importancia de las bacteriocinas radica en las múltiples funciones que poseen. Se ha visto que pueden disminuir el “quorum sensing” imposibilitando la formación de biopelículas (Chikindas *et al.*, 2018), poseen actividad antimicrobiana e inhiben el crecimiento de cepas bacterianas similares o estrechamente relacionadas a la cepa productora (Negash & Tsehai, 2020). La nisina fue la primera bacteriocina en obtener una aplicación comercial y en ser aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos de E.E.U.U. (FDA) (Negash & Tsehai, 2020). La nisina es producida por *Lactococcus lactis* a partir de una fermentación en medio lácteo modificado y es muy utilizada en la industria de alimentos como sustancia conservadora (Sánchez-Martín *et al.*, 2019). A partir de su descubrimiento fue posible identificar un gran número de bacteriocinas en un grupo diverso de cepas bacterianas.

La nisina es un péptido pequeño que posee los aminoácidos lantionina y metilantionina en su estructura. Estos aminoácidos se producen mediante modificaciones postraduccionales que primero implican la deshidratación de residuos de serina y treonina para generar residuos de 2,3-didehidroalanina (Dha) y 2,3-didehidrobutirina (Dhb) respectivamente. Finalmente, el grupo tiol presente en residuos de cisteína permite la ciclación con los aminoácidos deshidratados, generando la estructura que se muestra en la Figura 1 (Repka *et al.*, 2017).

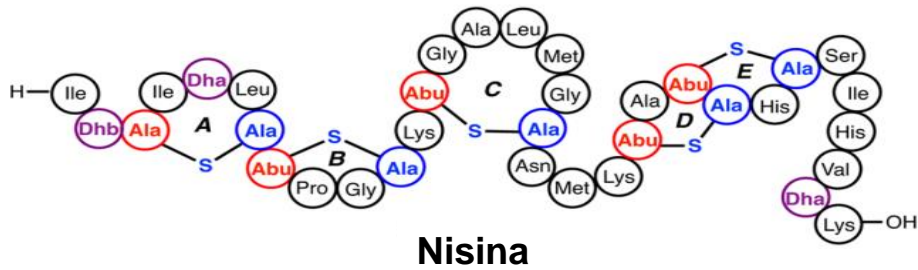


Figura 1. Estructura química de la nisina. Las modificaciones postraduccionales permiten la deshidratación de residuos de serina y treonina, lo que genera 2,3-didehidroalanina (Dha) y 2,3-didehidrobutirina (Dhb) respectivamente. Los átomos que se originan de serina y treonina se muestran en rojo, mientras que los átomos que se originan de cisteína se muestran en azul. Abu: ácido  $\alpha$ -aminobutírico, Ala: Alanina (tomado de Repka *et al.*, 2017)

## Lantipéptidos.

Dentro del grupo de bacteriocinas se encuentran los lantipéptidos. Un lantipéptido es una molécula pequeña de tipo proteico con estabilidad térmica y a un amplio rango de valores de pH, una característica particular es que contiene en su estructura los aminoácidos lantionina y metilantionina, derivados de serina y treonina (Negash & Tsehai, 2020). Estos aminoácidos inusuales en los lantipéptidos contribuyen en la actividad biológica (Nagao *et al.*, 2005) debido a la especificidad al blanco ocasionada por la limitada libertad conformacional (Ongey & Neubauer, 2016), además proporcionan una alta rigidez estructural para sobrevivir a la proteólisis (Xu *et al.*, 2020). Los lantipéptidos que poseen actividad antimicrobiana se les conoce como lantibióticos. Algunos ejemplos de lantipéptidos encontrados son la epidermina (Peschel *et al.*, 1993), subtilina (Parisot *et al.*, 2007) y la nisina mencionada anteriormente (de Arauz *et al.*, 2009).

La disponibilidad de un gran número de genomas ha permitido comprender molecularmente la biosíntesis de los lantipéptidos. Los clústeres de genes biosintéticos se encuentran particularmente en genomas de muchos géneros de Firmicutes, Actinobacterias, Proteobacterias, Bacteroidetes y Cianobacterias (Repka *et al.*, 2017).

Para todos los lantipéptidos, la lantionina y metilantionina son introducidos al péptido mediante modificaciones postraduccionales (Riley & Wertz, 2002) que involucran primero una deshidratación de residuos de serina y treonina para formar residuos de Dha y Dhb, respectivamente. Los anillos tioéter se generan mediante la adición conjugada 1,4 de una cisteína con un deshidroaminoácido, el enolato resultante se puede protonar para producir una lantionina (Lan) o una metilantionina (MeLan) (Repka *et al.*, 2017) (Figura 2).

Los productos formados pueden presentar diferente estereoquímica durante el proceso de síntesis, de manera que en los posibles resultados se involucran 2 diastereoisómeros de Lan y 4 diastereoisómeros de MeLan. Hasta el momento ambos diastereoisómeros de Lan y solo 2 de los 4 estereoisómeros de MeLan se han identificado en lantipéptidos naturales (Repka *et al.*, 2017).

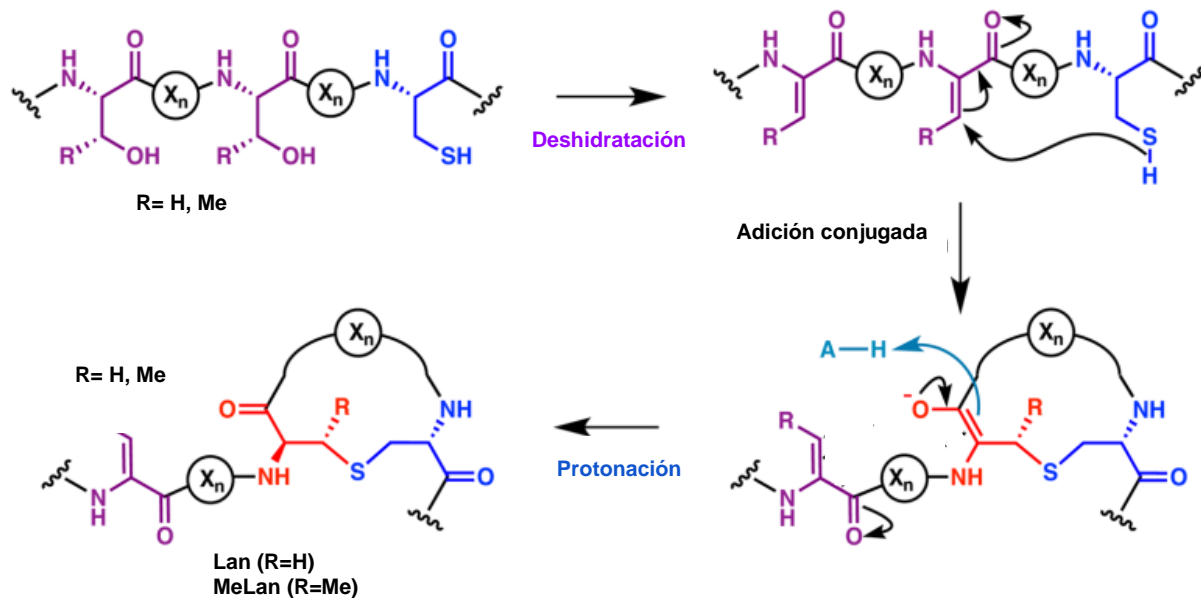


Figura 2. Reacciones de modificación postraduccional que conducen a la formación de lantionina (Lan) o metilantionina (MeLan). Los átomos que se originan a partir de la cisteína se observan de color azul, los átomos en rojo provienen de los residuos de serina o treonina y los átomos en morado indican la deshidratación de los residuos de serina y treonina (tomado de Repka *et al.*, 2017).

Los lantipéptidos forman parte de los péptidos sintetizados ribosomalmente y modificados postraduccionalmente (RiPPs) en donde se codifica para un péptido precursor que posteriormente será modificado de manera postraduccional. LanA es un péptido precursor dividido en dos segmentos; un péptido líder en la región N-terminal seguido del propéptido en la región C-terminal (Lin *et al.*, 2011). En la región C-terminal ocurren las modificaciones postraduccionales por acción de enzimas biosintéticas como LanB y LanC (Nagao *et al.*, 2005). Además, la región C-terminal es considerada el "core" del péptido precursor (Repka *et al.*, 2017) (Figura 3). El péptido líder es un sitio crítico de reconocimiento para las enzimas biosintéticas (Arnison *et al.*, 2013) y no forma parte del producto final (Repka *et al.*, 2017); por tanto, el producto final es más corto que el péptido precursor.

En los lantipéptidos de clase I, LanT es un transportador transmembranal tipo ABC que permite exportar el péptido al exterior de la célula productora, mientras que LanP (serin proteasa tipo subtilisina) es una proteasa que permite remover al péptido líder después de las modificaciones postraduccionales (Knerr & Van Der Donk, 2012). Las proteasas implicadas en la maduración de los lantipéptidos reconocen diferentes sitios de corte, pueden secretarse al medio extracelular, permanecer en el citoplasma o exportarse y unirse a la pared celular. En el caso de la síntesis de nisina, NisP es la proteasa responsable de escindir el péptido líder y se encuentra anclada en la pared celular (Montalbán-López *et al.*, 2018).

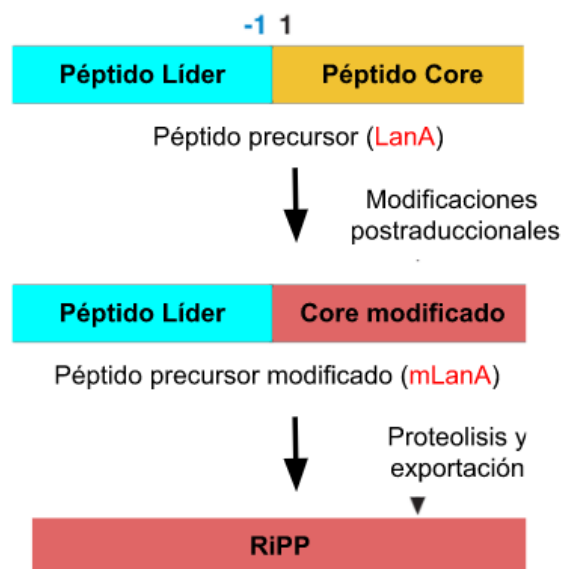


Figura 3. Vía biosintética general para los péptidos sintetizados ribosomalmente y modificados postraduccionalmente (RiPPs). Se indica el esquema general para péptidos precursores. En la región C-terminal del péptido (péptido core) ocurren las modificaciones postraduccionales, posteriormente una proteasa lleva a cabo la ruptura del péptido líder para liberar el péptido activo (traducido de Repka *et al.*, 2017).

Las enzimas involucradas en la síntesis de los lantipéptidos tienen una alta capacidad para introducir lantionina o metilantionina en su estructura. Se ha estudiado la participación de las enzimas NukM y NukT durante la síntesis de nukacina ISK-1 (lantipéptido de clase II producido por *Staphylococcus warneri* ISK-1) y se ha visto que estas enzimas son necesarias para la biosíntesis de nukacina ISK-1 (Nagao *et al.*, 2005). Por otro lado, se determinó que la presencia de las enzimas NisB y NisC eran indispensables durante la síntesis de nisina, ya que su ausencia impide la maduración correcta del lantipéptido (Koponen *et al.*, 2002).

## Clasificación de los lantipéptidos

De acuerdo con sus características estructurales y a su modo de ejercer su actividad bactericida (Riley y Wertz, 2002), los lantipéptidos fueron clasificados por Jung (1991) en Tipo A y Tipo B (Lin *et al.*, 2011). Sin embargo, una clasificación más reciente los clasifica de acuerdo con la maquinaria biosintética involucrada en la formación de lantioninas y metilantioninas (Acedo *et al.*, 2019). Uno de los parámetros que rige la clasificación anterior consiste en el mecanismo de deshidratación de los residuos de serina y treonina, los cuales se ha visto que ocurren de diferentes maneras (Repka *et al.*, 2017).

Siguiendo esta última clasificación existen 5 clases de lantipéptidos:

Los lantipéptidos de clase I son formados por dos enzimas biosintéticas; LanB con actividad de deshidratasa y LanC con actividad de ciclasa (Acedo *et al.*, 2019). Esta clase de lantipéptidos son de particular interés para los fines de este proyecto.

La deshidratasa LanB tiene un dominio de glutamilación que cataliza una reacción de transesterificación entre glutamil-tRNA y el grupo hidroxilo de la cadena lateral de la serina o treonina. Paso seguido se lleva a cabo una  $\beta$ -eliminación en donde se produce el aminoácido deshidratado. El glutamil-tRNA es la fuente de glutamato activado necesario para la actividad de NisB (Acedo *et al.*, 2019; Repka *et al.*, 2017).

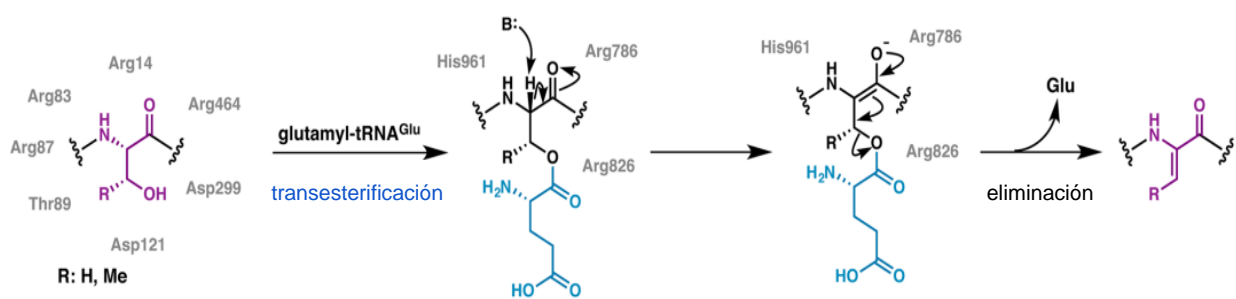


Figura 4. Reacción enzimática catalizada por LanB. LanB cataliza la deshidratación mediante una reacción de transesterificación del glutamato donado por glutamil-tRNA a la cadena lateral de Ser/Thr seguida de una  $\beta$ -eliminación. La activación quimio selectiva por glutamato a través de su  $\alpha$ -carboxilato se ilustra aquí como ha sido demostrado para la goadsporina, un RiPP de tipo no lantipéptido. Los residuos conservados de LanB que fueron predichos como importantes para la transesterificación y la eliminación gracias a estudios de mutagénesis en NisB se muestran en gris. Queda por establecer la participación exacta de estos residuos (traducido de Repka *et al.*, 2017).

La ciclase LanC utiliza como sustrato al precursor deshidratado y es responsable de llevar a cabo la reacción de ciclación. Se ha visto que este tipo de enzimas tienen motivos de unión a zinc; una mutación en los ligandos de zinc elimina la actividad de ciclase (Repka *et al.*, 2017).

Los lantipéptidos de clase II se sintetizan a partir de la enzima LanM; una enzima bifuncional que puede catalizar la actividad de deshidratasa y ciclasa (Lin *et al.*, 2011, Acedo *et al.*, 2019). LanM activa los residuos de serina y treonina a partir de fosforilación con ATP.

Las sintetasas de los lantipéptidos de clase III y IV son referidas como LanKC y LanL respectivamente. Ambas enzimas tienen tres dominios; un dominio liasa N-terminal, una cinasa central y una ciclasa en C-terminal (Takano *et al.*, 2017). La diferencia entre ambas enzimas radica en su dominio ciclasa; LanKC carece de dominios de unión a Zn mientras que LanL tiene estos dominios presentes (Acedo *et al.*, 2019).

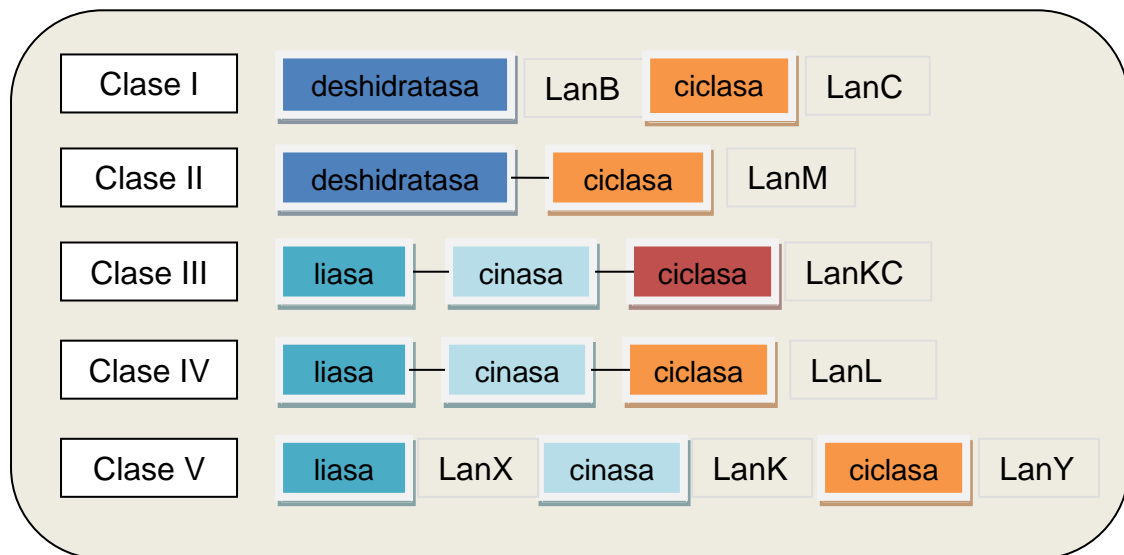


Figura 5. Cinco clases de lantipéptidos basados en su maquinaria biosintética.

Los lantipéptidos de clase V son de reciente descubrimiento, para ellos se ha propuesto un mecanismo que depende de la participación de 3 enzimas; LanK (cinasa que fosforila residuos de Ser/Thr), LanX (liasa que permite la remoción del



grupo fosfato y posterior deshidratación) y LanY (cataliza la ciclación a partir del grupo tiol de una cisteína). Sin embargo, el mecanismo aún sigue en estudio (Xu *et al.*, 2020).

### Mecanismo de acción de las bacteriocinas

Los patrones específicos de los enlaces tioéter otorgan a los lantipéptidos la capacidad de reconocer objetivos moleculares con alta especificidad y selectividad como el lípido II y la fosfatidil etanolamina en la membrana de bacterias (Repka *et al.*, 2017). Se ha descubierto que lantipéptidos como la nisina, subtilina y Pep5 afectan la membrana citoplasmática de bacterias susceptibles y son capaces de formar poros de vida corta en membranas lipídicas (Bierbaum & Sahl, 2009). La nisina es capaz de adherirse a la membrana a través del reconocimiento del lípido II por medio de su región C-terminal, posteriormente oligomeriza y forma poros que contienen 8 moléculas de nisina y 4 moléculas de lípido II (Bierbaum & Sahl, 2009).

Por otro lado, el lípido II tiene como función transportar subunidades de peptidoglicano (presentes en el citoplasma) hacia el exterior de la célula para llevar a cabo la síntesis de pared celular (Negash & Tsehai, 2020). Un ataque a estas moléculas diana impide la síntesis de la pared celular y por consiguiente genera muerte en bacterias susceptibles (Oppedijk *et al.*, 2016; Parisot *et al.*, 2007) (Figura 6).

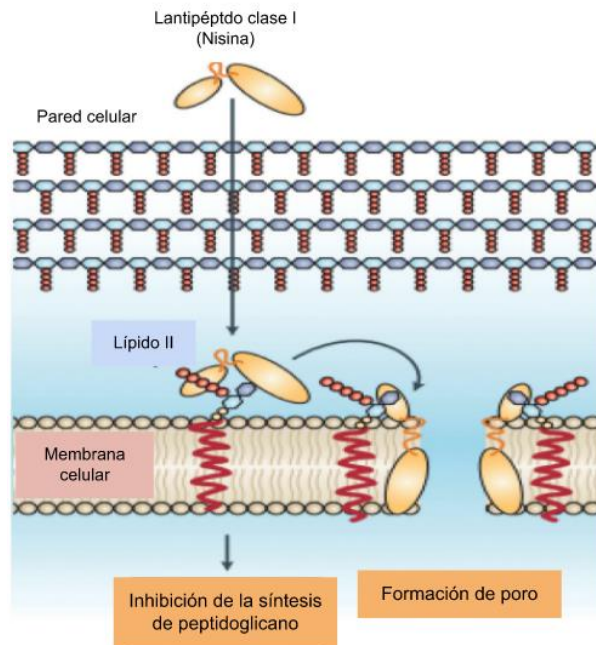


Figura 6. Mecanismos de acción de bacteriocinas en bacterias Gram positivas. En el primer mecanismo se atrapa al lípido II, el cual se ve incapacitado para transportar subunidades de peptidoglicano hacia el exterior de la célula y por lo tanto se interrumpe la síntesis de pared celular. El segundo mecanismo consiste en la formación de poros a partir del reconocimiento del lípido II presente en la membrana (traducido de Negash & Tsehai, 2020).

Gracias a la carga neta positiva de las bacteriocinas, las interacciones de la nisina con la bicapa lipídica de la membrana celular se ven fuertemente favorecidas por interacciones electrostáticas con los grupos fosfato de los fosfolípidos (McAuliffe *et al.*, 2001).

### Enzimas decoradoras o “tailoring”

En el apartado anterior se mencionó la importancia de las enzimas biosintéticas en las reacciones de síntesis de los lantipéptidos; sin embargo, existen otro tipo de

enzimas que pueden generar características estructurales distintas a las generales en el péptido core (Acedo *et al.*, 2019). Se ha visto que algunos lantipéptidos de clase I contienen modificaciones adicionales o “decoradoras” que fueron anexadas por enzimas que no necesariamente se encuentran dentro de clústeres de genes biosintéticos (Repka *et al.*, 2017). Muchas de estas reacciones adaptadoras son llevadas a cabo sin la presencia de un péptido líder o después de que éste último fue removido. En los siguientes párrafos se dará una descripción de algunos ejemplos ya conocidos.

Entre estas modificaciones especiales se encontró la formación de aminovinil cisteína (AviCys) en la región C-terminal de la epidermina, un lantipéptido obtenido de la bacteria *Staphylococcus epidermidis*. Se demostró que EpiD es capaz de llevar a cabo una reacción de descarboxilación oxidativa en una cisteína C-terminal y se piensa que es el principal responsable de llevar a cabo la síntesis de AviCys (Repka *et al.*, 2017).

Uno de los lantipéptidos más potentes identificados hoy en día es la microbisporicina (NAI-107) producida por *Microbispora sp.* 107891, el cuál muestra una potente actividad contra varias bacterias patógenas relevantes (Castiglione *et al.*, 2008). La microbisporicina contiene en su estructura 1 metilantionina y 3 lantioninas, además de modificaciones inusuales en los lantipéptidos; 5-cloro triptófano y 3,4-dihidroxiprolina (Foulston & Bibb, 2010). MibH y MibS son enzimas decoradoras responsables de la halogenación de la microbisporicina; MibH cataliza la halogenación de un residuo de triptófano en MibA y MibS provee de FAD reducido (Repka *et al.*, 2017).

¿Por qué son importantes estas modificaciones adicionales?

Estas modificaciones pueden ser esenciales para la actividad del RiPP, ya sea como un paso obligatorio para formar la molécula final o impartiendo cierta funcionalidad química requerida para la actividad biológica (Funk & Van Der Donk, 2017).

Otras clases químicas de antibióticos que actúan sobre el lípido II, como los glucopéptidos y la ramoplanina, contienen un sustituyente cloro en un anillo aromático (similar al cloro que tiene el anillo aromático de la microbisporicina), de manera que su naturaleza lipofílica puede contribuir en la afinidad con la membrana (Castiglione *et al.*, 2008). También se realizó una superposición de la microbisporicina con la estructura de la nisina unida a un análogo del lípido II y se piensa que el aumento de la potencia antibiótica de la microbisporicina puede estar relacionado con las interacciones directas en el lípido II, ya que el 5-clorotriptofano está justamente al lado del supuesto sitio de unión del ácido acetilmurámico (Funk & Van Der Donk, 2017). Por otro lado, se determinó que un cambio de cloro a bromo en la estructura de la microbisporicina genera un aumento en la potencia antimicrobiana del compuesto (Cruz *et al.*, 2015).

## Metiltransferasa

Como se mencionó anteriormente, las enzimas decoradoras permiten una mejora en la actividad de los lantipéptidos al modificar su estructura. Entre estas enzimas se encuentra la metiltransferasa.

Recientemente, por medio de la minería genómica se ha revelado que la metiltransferasa es la tercera enzima más abundante en clústeres de genes biosintéticos para lantipéptidos de clase I (Acedo *et al.*, 2019), después de LanB y LanC. La metiltransferasa es una enzima independiente del péptido líder, requiere la versión cíclica del péptido precursor y es dependiente de s-adenosil metionina (SAM) (Acedo *et al.*, 2019; Huo *et al.*, 2020).

Se ha observado que la metiltransferasa en *Streptomyces olivaceus* NRRL B-3009 (llamada OlvSA) cataliza el rearrreglo de un residuo aspartato altamente conservado a un  $\beta$ -aminoácido, isoaspartato (Acedo *et al.*, 2019). Sin embargo, un estudio más reciente sugiere que la enzima tiene tolerancia durante la metilación en residuos isoleucina, valina y metionina presentes en la región C-terminal del péptido (Huo *et al.*, 2020).

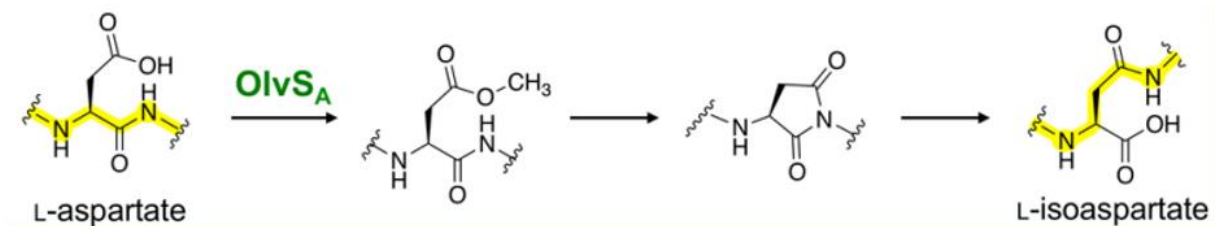


Figura 7. Reacción de la enzima metiltransferasa OlvSA presente en *Streptomyces olivaceus* NRRL B-3009. OlvSA cataliza la modificación de un residuo aspartato a un residuo isoaspartato en el lantipéptido OlvA (tomado de Acedo *et al.*, 2019)

En el año 2021 se reportó un nuevo lantipéptido de clase III con el nombre de andalusicina A. Durante el estudio del lantipéptido se identificó la presencia de una metiltransferasa capaz de dimetilar al compuesto; los efectos biológicos de la dimetilación mostraron un drástico aumento en la actividad antimicrobiana del

lantipéptido en comparación con el lantipéptido sin metilación (Grigoreva *et al.*, 2021).

Para los lantipéptidos de clase I sólo se han determinado las modificaciones postraduccionales que generan este tipo de enzimas; sin embargo, se desconoce el efecto biológico o la importancia que podría tener la metiltransferasa en la actividad de los lantipéptidos de clase I.

### *Micromonospora echinospora*

*Micromonospora echinospora* pertenece al grupo de las actinobacterias, un filo de bacterias gram positivas filamentosas con un alto contenido de guanina y citosina en su genoma. Tienen un estilo de vida micelial, de manera que se reproducen formando esporas asexuales (Barka *et al.*, 2016). Las actinobacterias se caracterizan por tener un metabolismo secundario extenso y producen alrededor de dos tercios de todos los antibióticos de origen natural de uso clínico (Torres *et al.*, 2012).

El género *Micromonospora* se encuentra comúnmente en muestras de suelo (Barka *et al.*, 2016) y se ha visto implicado en la obtención de diversos compuestos activos, entre ellos aminoglucósidos, macrólidos, ansamicinas, actinomicinas y everninomicinas (Wagman, 1980).

De manera particular, *Micromonospora echinospora* se caracteriza por tener esporas con espinas romas de 0.1-0,2  $\mu\text{m}$  de longitud y crecer de manera favorable en ramnosa (Luedemann, 1970). Tiene un genoma de 7.78 Mb con un contenido de GC del 72.5%, en donde se encuentran 6,671 genes (Carro *et al.*, 2018). Es conocida por ser productora de compuestos como gentamicina (útil para el tratamiento contra diversos agentes antibacterianos) (Unwin *et al.*, 2004), caliqueamicina (antibiótico potente contra leucemia) (Song *et al.*, 2015) y nenestatina A. Este último se considera un compuesto con potencial actividad antitumoral debido a que posee benzofluoreno en su estructura, propiedad característica de la familia de las cinamicinas, fluostatinas y lomaivitocinas; los cuales son compuestos con potentes actividades antitumorales (Jiang *et al.*, 2017).

*Micromonospora echinospora* NRRL-2953 (Obregón *et al.*, 1994), fue obtenida del ARS Culture Collection, US Department of Agriculture, Peoria IL, USA. Por medio de análisis bioinformáticos, se determinó que la bacteria tenía en su genoma un clúster que codifica para la síntesis de un lantipéptido de clase I; este clúster contiene genes que codifican para LanA, LanB, LanC y metiltransferasa (Ramírez-Rendón *et al.*, en preparación). Ramírez Rendón llevó a cabo la clonación de los genes *lanA*, *lanB* y *lanC*; sin embargo, nos interesamos en llevar a cabo la clonación del gen *metiltransferasa* y la posterior expresión del grupo completo de genes para determinar si las modificaciones de la enzima metiltransferasa generan un cambio en la actividad del lantipéptido.

# PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La resistencia a antibióticos es un problema de salud a nivel mundial que dificulta el tratamiento de enfermedades y que cobrará millones de vidas en los próximos años. Los lantipéptidos son moléculas con una amplia diversidad de aplicaciones, entre ellas destaca la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano. Algunos de ellos están asociados a enzimas decoradoras que generan modificaciones postraduccionales en los mismos y contribuyen a una mejora en su actividad. Entre estas enzimas destaca la metiltransferasa, la cual está presente en múltiples clústeres biosintéticos para lantipéptidos de clase I y de la que se desconoce el efecto de su modificación postraducciona actualmente. En el laboratorio se llevó a cabo la clonación y expresión de 3 genes involucrados en la síntesis de un lantipéptido de clase I putativo; sin embargo, aún no se ha realizado la clonación y expresión del gen *metiltransferasa* presente en el clúster biosintético.

# HIPOTESIS

Mediante la aplicación de técnicas de biología molecular será posible clonar y expresar el gen de la metiltransferasa de *Micromonospora echinospora*.



## OBJETIVO GENERAL

Llevar a cabo la clonación del gen *metiltransferasa* y optimizar el proceso de expresión del clúster completo del lantipéptido de clase I presente en la bacteria *Micromonospora echinospora*.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar *in silico* los genes involucrados en la biosíntesis del lantipéptido de clase I en *M. echinospora*.
- Clonar el gen que codifica para la enzima metiltransferasa de *M. echinospora* en un vector de expresión apropiado.
- Determinar las condiciones óptimas para llevar a cabo la expresión del clúster completo de genes que permite la síntesis de un lantipéptido de clase I putativo.

# PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

## Análisis bioinformático

### AntiSMASH y diseño de oligonucleótidos

Para diseñar los oligonucleótidos, se utilizó la secuencia de nucleótidos del gen *metiltransferasa* presente en *Micromonospora echinospora* con ayuda del programa antiSMASH versión 6.1.1, en donde se utilizó el número de acceso LT607413.1 de la base de datos del NCBI (National Center of Biotechnology Information). Paso seguido se hizo uso del programa NEBcutter V2.0 para identificar dentro del gen secuencias de corte de enzimas de restricción comerciales y así evitar cortes indeseados. Posteriormente se buscaron enzimas de restricción que no cortaran el gen pero que cortaran el sitio de clonación múltiple I (MCSI) del vector pRSFC.S. Las enzimas que cumplen con las características anteriormente mencionadas fueron *EcoRI* y *HindIII*, las cuales facilitan que la adición del inserto al vector sea en la dirección correcta debido a su capacidad de generar extremos cohesivos.

Como paso siguiente se añadió a los oligonucleótidos los sitios de corte de las enzimas de restricción elegidas para facilitar el proceso de clonación. El oligonucleótido Forward-Met fue diseñado con una secuencia que le permitiera ser digerido por la enzima de restricción *EcoRI* (GAATTC), mientras que el oligonucleótido Reverse-Met contiene la secuencia de reconocimiento para *HindIII* (AAGCTT).

Se añadió una etiqueta de 6 histidinas (His-tag) en la posición N-terminal de la secuencia para identificar la expresión de la proteína mediante Western Blot. El paso anterior se logró agregando una timina al oligo Forward-Met justo antes del codón de inicio, lo cual permite que los nucleótidos del gen se encuentren en el mismo marco de lectura (o en fase) con los nucleótidos que conforman el His-tag del MCS1 dentro del vector pRSFC.S.

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para la amplificación del gen metiltransferasa				
Nombre	Secuencia 5' - 3'	Sitio de corte	Núm. bases	Tm (°C)
Forward-Met	CCG <b>GAATTC</b> TATGGCGCTGCGGACGGC	<i>EcoRI</i> ( <b>GAATTC</b> )	27	75
Reverse-Met	CCC <b>AAGCTT</b> TCAGCGCCAGGACACCG	<i>HindIII</i> ( <b>AAGCTT</b> )	26	74

En color azul se encuentran los sitios de corte de las enzimas de restricción seleccionadas. El nucleótido en color rojo fue anexado para mantener en el mismo marco de lectura al gen con la etiqueta His-tag.

### Análisis de propiedades fisicoquímicas

Con la finalidad de conocer más sobre los parámetros de la enzima de interés, se hizo uso del programa Expasy ProtParam; una herramienta que utiliza diferentes bases de datos para identificar parámetros fisicoquímicos de una enzima a partir de su secuencia de aminoácidos ([Expasy - ProtParam tool](#)). Se analizó la secuencia de aminoácidos correspondiente a la enzima metiltransferasa obtenida de antiSMASH 6.1.1 utilizando el mismo número de acceso descrito anteriormente.

## Alineamiento múltiple de metiltransferasas involucradas en la síntesis de lantipéptidos de clase I.

Con la finalidad de identificar residuos conservados, se llevó a cabo un alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos correspondientes a otras enzimas metiltransferasas. Las secuencias de dichas enzimas se encontraron a partir de la secuencia de la enzima de interés utilizando la herramienta Protein BLAST de NCBI. Entre las opciones se escogieron metiltransferasas asociadas al sistema FxLD para lantipéptidos de clase I.

De manera particular, la secuencia de aminoácidos correspondiente a la metiltransferasa de la bacteria *Streptomyces olivaceus* se obtuvo a partir de la herramienta antiSMASH utilizando el número de acceso NZ\_CP043317.1 de NCBI. Las secuencias de cada enzima y los organismos de donde se obtuvieron se encuentran en la Tabla 3.

Con las secuencias obtenidas se prosiguió a llevar a cabo el alineamiento múltiple utilizando la herramienta Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Tabla 3. Secuencias de aminoácidos correspondientes a metiltransferasas asociadas a lantipéptidos de clase I

<p><i>Micromonospora sagamiensis</i></p>	<p>MRDPMALRTAMVAELSEDTIRSEAVAAAFSVVPRHLFAPGESLDVVYDSNTPLVTKTGPDGT ALSSVSAAHIQAVMLEQAEIEPGMRVLEIGSGGYNAALIAELVGPQGAVTSVDIDPEIVARA RACLQTAGYDRVRVVQADAIEYGVPEQAPYDRIIVTVGAWDIPPAWIAQLSEHGRIVVPLRFA GLSRCVAFDLAGGRLVSHSYCLGGFVPMQAGTYSETLVPVNGEATLRMDGPDGFDVPAALR KAVHAPRIERWSGAADFMPDELELFVVTSSASHVPFLYASQQLVDQGVFSPAETHGTAAVVEG GSFAYRTKRENEGLGGWESGVYAYGPAEAVADRYVGLLRWAADFRRRGAARIEYLPSTAG VPDGWSVPKRHGAVAVSWR</p>
<p><i>Micromonospora pallida</i></p>	<p>MALRTAMVAELSEDTIRSEAVAAAFSVVPRHLFAPGESLDVVYDSNTPLVTKTGPDGTALSS VSAAHIQAVMLEQAEIEPGMRVLEIGSGGYNAALIAELVGPQGAVTSVDIDPEIVARARASL QTAGYDRVRVVQADAIEYGVPEQAPYDRIIVTVGAWDIPPAWIAQLSERGRIVVPLRFAGLSR CVAFDLTAGGRLVSHSYCLGGFVPMQAGTYSETLVPINGEATLRMDGPDGFDVPAALRKAVH APRIERWSGAADFMPDELELFVVTSSASHVPFLYASQQLVDQGVFSPAETHGTAAVVEGGSFA YRTKRENEGLGGWESGVYAYGPAEAVADRYVGLLRWAADFRRRGTARIEYLPSTAGVDPG WYVPKRHGAVAVSWR</p>
<p><i>Micromonospora inyonensis</i></p>	<p>MALRTAMVAELSEDTIRSEAVAAAFSVVPRHLFAPGESLDVVYDSNTPLVTKTGTGDGTALSS VSAAHIQAVMLEQAEIEPGMRVLEIGSGGYNAALIAELVGPQGAVTSVDIDPEIVARARACL QTAGYDRVRVVQADAIEYGVPEQAPYDRIIVTVGAWDIPPAWIAQLSERGRIVVPLRFAGLSR CVAFDLTAGGRLVSHSYCLGGFVPMQAGAYSETLVPINGEATLRVDGPDGFDVPAALRKAVH APRIERWSGAADFMPDELELFVVTSSASHVPFLYASQQLVDQGVFSPAETHGTAAVVEGGSFA YRTKRENEGLGGWESGVYAYGPAEAVADRYVGLLRWAADFRRRGAARIEYLPSTAGVDPG WYVPKRHGAVAVSWR</p>
<p><i>Verrucosipora sp. NA02020</i></p>	<p>MRGSTGSYPGTFQLGSQSVTSAGQQAVQDPAALRAAMVSELCEDTIASEAVAAAFITVPRHV FAPDEPLAVVYDVTALVTKTGPDKALSSVSAAHIQAVMLEQAEIEPGMRVLEIGSGGYNA ALLAELVGDDGAVTSVDIDSDIVARARAYLDEAGYERVRVVQADAIEYGVAEHAPYDRIIVTV GAWDIPPAWIEQLTERGRIVMPLRFAGLSRCVAFERAGAGLVSHSYRLGGFVPMQGEFTTE TLVPINGEATLRIDGPDGFDVPAALRKAMHGRRIERWSGAADFDPDELELFVVTSPAPVQVFL HASQQLVDQGVFTPAVMTGAILIDGGSFAYRTKRENESTDGWESGVYAYGPNAAEIIADRYI ALLRRWATQYRHRGAARIEYIPTTAGDAPPVGVWYTPKRRHGVAVAVTWR</p>
<p><i>Streptomyces aidingensis</i></p>	<p>MTTVRETDDTAASLRAAMVGELEGMGVLQSKAVAKAVATVPRHLFAADQPLESAYAANKALV IKRDGSGNALSSLSATHIQAVMLEQAEIEPGMRVLEIGSGGYNAALLAELVGEAGTVVTADI DAEIVERARACLDAAAGYGRVQVVLADADGGVPEHAPFDRIIVTAGAWDIPPAWLEQMSERGR IVVPLRMRGLTRSFADREDGGLVSASYRLCGFVPMQGSAYTERLVP IADGIALQVDDQRQ EFDTEALAAAVHTPRLEVWSGAADFDPDELEFLATSTPQMAMLHSGKQLVDQGALALSVTR GVPALVVGGSFAYRTKRPNEETGGFESGVFAHGPEAEVAARYVDLLRRWASDHRRRGAARI RYVRMPEGTAEPSAGVVAKRFGAVQISWS</p>
<p><i>Frankia casuarinae</i></p>	<p>MTSVQDSSATDSAATLRAAMVDELRTTGDAIKTGQVAAAVGRVPRHLFAPDEPLEAVYAANK ALVIKRDGNGAALSSLSAAHIQAVMLEQAELEPGMRVLEIGSGGYNAALIQEMVGDGGSVTS VDIDQEI VXRRARACLDAAAGYRNVEVVAADAAGVPEKAPYDRIIVTAGAWDIPPAWQQLTN GGRLVVPLRLRGLTRSI AFDRVDEDDGVLVSRSYRLCGFVPMQIGTFRERLVPITDEVVL RVDDPSQEFDVEGLRDALATPRLERWSGAADFDPDELEFFLVNTLAQVAHLHVDQVQNGR FAPSAARGVPTLVSGGSFAYRTKRPNEKTGGFESGVVAHGPADRAVHEHYVELLRWASDHR RSGAAHIRYVPKAAGTPAPSVGLVPKRHGAVAVRWP</p>
<p><i>Streptomyces olivaceus</i></p>	<p>MSQTPTADQLCNRVDDIILSERDLPSDVEQAMRTVPRDFTFLPGIDLKNAAYTDQAVTIKDNPG QPLPLSCASVPSVAMMLGQLTARPGDNVLEIGAGTGYNAALLAELVGGGRVTTVDIDSDVA LHARTTLNTAGYERVTVIERNGLLGAHEHAPYDRIIATVGVWDIPATWWDQLADGGRLVPL RWRGQTRSVALTRHGNQLVSDGMELCGFVPIIGQNGEKTASLNAADTLRLHYDQDQTNPDA LTHTLQADKPAEVLSAQRIGGEESFDGVWLRATAHDDRVCRLTTEPEAMEQALIRRPATPA RTPALIDDASLAYLTVTREDADPQRFFRLGATAYGPRGEELARDLVAHIDAWGSDRLAVPRL TITPSDTGDAPGHTISKESPESRITLTY</p>

## Clonación del gen de interés

### Amplificación del gen de la metiltransferasa.

Para llevar a cabo la amplificación del gen de la metiltransferasa se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permite generar una gran cantidad de copias de un fragmento específico de DNA a partir de DNA genómico. El proceso se llevó a cabo en 3 etapas: desnaturalización, alineamiento y extensión. En la etapa de desnaturalización, el DNA genómico se somete a una temperatura elevada con la finalidad de romper los puentes de hidrógeno y separar las dos hebras complementarias formando dos hebras sencillas. Posteriormente la temperatura desciende, lo cual favorece el inicio de la etapa de alineamiento en donde se forman y se rompen constantemente los puentes de hidrógeno entre los oligonucleótidos y el DNA. Las uniones complementarias son más estables, por lo tanto, duran mayor tiempo y permiten que los oligonucleótidos se mantengan “alineados” formando una pequeña región de doble cadena. Por último, ocurre la etapa de extensión que inicia cuando la enzima DNA polimerasa lleva a cabo la síntesis del DNA en dirección 5'-3' utilizando los oligonucleótidos como cebadores. Este ciclo se repite varias veces, generando un elevado número de copias del gen de interés (Espinosa, 2007).

Con la finalidad de determinar una temperatura de alineamiento óptima para llevar a cabo la amplificación del gen, se realizó un PCR sometiendo la mezcla de reacción a diferentes temperaturas de alineamiento. El PCR se llevó a cabo utilizando la

enzima Taq platinum polimerasa de la marca Invitrogen y se llevaron a cabo un total de 25 ciclos de reacción.

Se preparó un Máster Mix de 70  $\mu\text{L}$  que posteriormente se dividió en diferentes tubos para PCR. Se obtuvieron un total de 7 tubos con 10  $\mu\text{L}$  de reacción cada uno.

El Máster Mix se preparó utilizando las cantidades y reactivos registrados en la Tabla 4.

Tabla 4. Componentes de PCR para determinar temperatura de alineamiento óptima.	
Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Buffer 10x	7
dNTPs 10 mM	1.4
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	2.1
Forward-Met 10 $\mu\text{M}$	1.4
Reverse-Met 10 $\mu\text{M}$	1.4
DNA genómico <i>M. echinospora</i>	7
Taq platinum polimerasa 5 U/ $\mu\text{L}$	0.28
DMSO 100%	3.5
H <sub>2</sub> O MQ.	45.92
Volumen total	70 $\mu\text{L}$
Preparación de Máster Mix para PCR. Estas cantidades fueron tomadas de acuerdo con las indicaciones del proveedor. Permiten la formación de 7 reacciones de 10 $\mu\text{L}$ cada una.	

Como se indicó en la Tabla 2; los oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen cuentan con un valor elevado de  $T_m$ , lo que aumenta la temperatura de alineamiento y dificulta la hibridación de los oligonucleótidos con el DNA. Para

disminuir la temperatura de alineamiento y facilitar el proceso, se agregó DMSO y se llevó a una concentración final de 5% en cada reacción.

Durante la etapa de desnaturalización y extensión se sometieron las muestras a una misma temperatura dentro del termociclador y solamente se modificó la temperatura de alineamiento en los tubos de reacción. Las condiciones en que se llevaron a cabo las reacciones de PCR fueron indicadas en la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones del termociclador para determinar la temperatura de alineamiento.							
Etapa	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tiempo
Inicial	94°C						2 min
Desnaturalización	94°C						30 s
Alineamiento	58°C	60°C	62°C	64°C	66°C	68°C	30 s
Extensión	72°C						66 s
Hold	4°C						Indefinido
Condiciones en que se llevó a cabo la PCR para determinar la temperatura de alineamiento óptima que amplifica el gen que codifica para la enzima metiltransferasa de <i>Micromonospora echinospora</i> . El tiempo de extensión fue escogido bajo la premisa de que por 1 kb del inserto se debe someter la muestra a 72°C durante 1 min.							

Se utilizó un termociclador de la empresa Applied Biosystems, el cual llevó a cabo un total de 25 ciclos. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa 0.8% con el producto de PCR resultante para confirmar que se llevó a cabo la amplificación del gen. Esta técnica permite separar fragmentos de DNA debido a que la agarosa forma una red que permite el paso de los fragmentos más pequeños y retrasa los fragmentos más grandes. El movimiento de estos fragmentos se logra a



través de una corriente eléctrica hacia el polo positivo ya que la presencia de fosfatos genera en el DNA una carga negativa. Si hay muchos fragmentos de tamaño similar se genera una agrupación de los mismos formando una banda en el gel (Espinosa, 2007).

El gel fue hecho al 0.8% de agarosa en amortiguador TAE 1x (Tris-acetatos 0.04M, EDTA 1 mM pH 8,0), con un volumen total de 30 mL. En el primer pozo del gel se agregó una mezcla con 1  $\mu$ L de marcador de pesos moleculares de la marca NEB (NEW ENGLAND BioLabs), 1  $\mu$ L de buffer de carga 6X de la marca Thermo Scientific y 4  $\mu$ L de TAE 1x. Posteriormente se agregó a cada muestra 1.67  $\mu$ L del buffer de carga mencionado anteriormente y se cargaron en los pozos del gel en orden de numeración ascendente.

El gel se corrió a 90V en una cámara de electroforesis y se observó que el avance del marcador llegara casi al final del gel o a una distancia considerable. El tiempo destinado fue aproximadamente de 50 minutos, paso seguido se desmontó el gel de la cámara y se sumergió en una solución de bromuro de etidio durante 15 minutos, se colocó en una lámpara de rayos UV para revelar y se tomó una fotografía.

Determinada la temperatura de alineamiento y las condiciones óptimas para llevar a cabo la amplificación del gen, se procedió a realizar un Master Mix de 150  $\mu$ L. Esta cantidad se dividió en 3 reacciones de 50  $\mu$ L y se colocaron en tubos para PCR. Se llevaron a cabo un total de 25 ciclos con la misma polimerasa utilizada en el apartado anterior. Las cantidades utilizadas en esta ocasión se encuentran en la Tabla 6.

Tabla 6. Componentes de PCR para aumentar copias del gen	
Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Buffer 10x	15
dNTPs 10 mM	3
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	4.5
Forward-Met 10 $\mu\text{M}$	3
Reverse-Met 10 $\mu\text{M}$	3
DNA genómico <i>M. echinospora</i>	15
Taq platinum polimerasa 5 U/ $\mu\text{L}$	0.6
DMSO 100%	7.5
H <sub>2</sub> O MQ.	98.4
Volumen total	150 $\mu\text{L}$
Preparación de Máster Mix para PCR. Estas cantidades fueron tomadas de acuerdo con las indicaciones del proveedor. Permiten la formación de 3 reacciones de 50 $\mu\text{L}$ cada una.	

Posteriormente se colocaron las muestras en el termociclador y se cumplieron las condiciones que se muestran en la Figura 8.

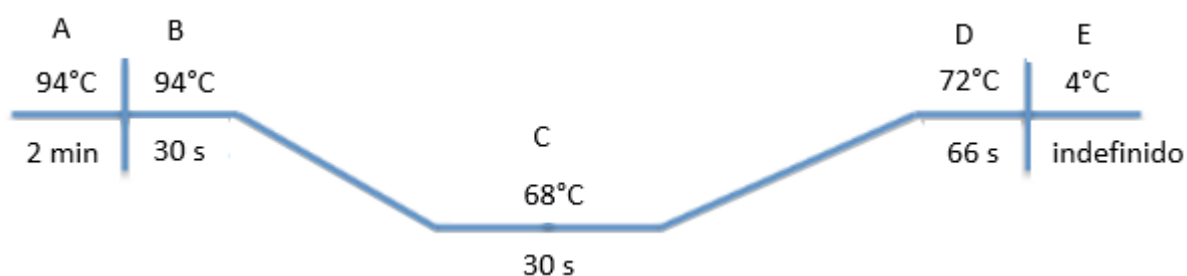


Figura 8. Condiciones utilizadas en el termociclador para amplificar al gen de interés. A-Desnaturalización inicial, B-Desnaturalización; C-Alineamiento; D-Extensión; E-Hold. De acuerdo con los resultados, 68°C fue la temperatura de alineamiento adecuada para amplificar el gen.

Al terminar los 25 ciclos se corrió el producto de PCR dentro de un mismo pozo de gran tamaño. El gel de agarosa utilizado y la mezcla del marcador fueron preparados de igual manera que como se menciona en el apartado anterior. En el primer pozo se colocó la mezcla con el marcador y en el pozo grande se colocaron los 150  $\mu$ L obtenidos de las reacciones de PCR junto con 25  $\mu$ L del buffer de carga 6X de la marca Thermo Scientific. Después de correr el gel a 90V y de revelarlo utilizando bromuro de etidio se cortó la banda de interés.

### Purificación del inserto

La banda correspondiente al gen amplificado se obtuvo en el apartado “Amplificación del gen *metiltransferasa* por PCR”, posteriormente se recortó y se colocó dentro de tubos Eppendorf de 1.5 mL para realizar purificación de banda. Fue posible utilizar esta técnica ya que la banda obtenida en el gel se mostró muy bien definida. La purificación se llevó a cabo utilizando el Kit Wizard® SV Gel de la marca Promega y las concentraciones obtenidas del gen se determinaron con ayuda de un Nanodrop de la marca Thermo Scientific.

### Digestión del vector pRSFC.S y del inserto.

Con el inserto purificado y la construcción pRSFC.S previamente obtenida y purificada en el laboratorio, se prosiguió con dos digestiones utilizando las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* (ambas enzimas de la marca NEB). Las enzimas se colocaron en las reacciones de manera separada; primero se agregó *EcoRI* y después de su incubación e inactivación se agregó *HindIII*. Las reacciones se

prepararon como se muestra en la Tabla 7 y posteriormente se dividieron en 30  $\mu\text{L}$  antes de comenzar la incubación (37°C durante 3 horas para ambas enzimas). Transcurrido el tiempo de incubación, se inactivaron las enzimas sometiendo las muestras a 65°C durante 20 minutos. Los tubos obtenidos se guardaron a 4°C.

Tabla 7. Reacciones de digestión con enzimas de restricción.		
Reactivos	Reacción 1 Inserto ( $\mu\text{L}$ )	Reacción 2 Vector pRSFC.S ( $\mu\text{L}$ )
DNA	24 (2.11 $\mu\text{g}$ )	28 (3.2 $\mu\text{g}$ )
Buffer 2.1 10x	6	6
<i>EcoRI</i> 20 U/ $\mu\text{L}$	2	2
<i>HindIII</i> 20 U/ $\mu\text{L}$	2	2
H <sub>2</sub> O	26	22
Volumen total	60	60

Transcurrido el tiempo de inactivación de *HindIII*, se procedió a purificar el vector y el inserto para eliminar el buffer y las enzimas utilizadas durante la digestión. El vector pRSFC.S se corrió en un gel de agarosa 0.8% para distinguir los plásmidos digeridos de los que no lo estaban. Posteriormente se realizó una purificación de la banda que corresponde al vector digerido y el inserto se purificó como producto de PCR. Para ambas purificaciones se utilizó el Kit Wizard® SV Gel de la marca Promega.

## Ligación vector-inserto

La ligación del vector y del inserto se llevó a cabo en una relación 3:1 (inserto: vector), en donde se utilizó la herramienta NEBioCalculator de NEB para conocer la cantidad de inserto necesaria al momento de realizar una ligación con 35 ng y 100 ng de un vector que cuenta con una longitud de 5.0 kb. Considerando que el inserto tiene una longitud de 1.16 kb, el resultado de la herramienta arrojó que eran necesarios 24.36 ng y 69.60 ng de inserto respectivamente, de manera que se llevaron a cabo los cálculos necesarios para determinar su equivalencia en volumen. En la Tabla 8 se muestran los reactivos y volúmenes finales que se utilizaron al momento de realizar las reacciones. Durante la ligación se utilizó una T4 DNA ligasa y un buffer 10X de la marca NEB.

Tabla 8. Ligación del inserto <i>metiltransferasa</i> con el vector pSRFC.S.			
Reactivos	Reacción 1. Control negativo ( $\mu\text{L}$ )	Reacción 2 35 ng vector ( $\mu\text{L}$ )	Reacción 3 100 ng vector ( $\mu\text{L}$ )
Buffer 10x	2	2	2
pSRFC.S	1.57	1.57	4.48
<i>metiltransferasa</i>	0	0.94	2.68
Ligasa 400 U/ $\mu\text{L}$	1	1	1
H <sub>2</sub> O	15.43	14.49	9.84
Volumen total	20	20	20

Posteriormente se incubaron las reacciones a temperatura ambiente (20°C aproximadamente) durante toda la noche (OVN).

## Transformación en células competentes de *E. coli* Top 10.

Se preparó medio LB sólido y se agregó 25 mL de medio con 25  $\mu$ L de un stock de kanamicina (50 mg/mL) para llegar a una concentración final de 50  $\mu$ g/mL en cada caja Petri. El vector pRSFC.S confiere a la bacteria una resistencia a kanamicina, de manera que el antibiótico en las cajas permite seleccionar solamente colonias de células transformantes con el vector de interés.

Con las cajas listas se procedió a llevar a cabo una transformación bacteriana utilizando alícuotas con células competentes de *E. coli* Top10 previamente descongeladas y colocadas en un contenedor con hielo. Se prosiguió el experimento colocando 10  $\mu$ L de cada una de las reacciones (Ver Tabla 8) en diferentes alícuotas, las cuales se incubaron en hielo durante 30 min. Posteriormente se llevó a cabo la transformación por choque térmico utilizando un termoblock (marca Thermo Scientific) para someter las células a una temperatura de 42°C durante 2 min. Inmediatamente se dejaron reposar 5 min en hielo, se agregó 1 mL de medio LB líquido y se incubaron las células transformantes durante 1h a 37°C y 300 rpm. Transcurrido el tiempo se tomaron 120  $\mu$ L de cada una de las alícuotas, se colocaron dentro de diferentes cajas Petri con kanamicina y se esparcieron las células utilizando perlas de vidrio. Las cajas Petri inoculadas se incubaron OVN a 37°C.

A la mañana siguiente se revisaron las cajas Petri y se escogieron 50 colonias individuales, las cuales fueron picadas y plaqueadas en una nueva caja Petri con medio LB y kanamicina utilizando las mismas condiciones de incubación.

## PCR de colonia

Para determinar las colonias que fueron transformadas con la construcción pRSFC.S-Met se llevó a cabo PCR de colonia. El procedimiento consistió en separar células de las 50 colonias escogidas en grupos de 5 dentro de tubos Eppendorf con 500  $\mu$ L de agua. Se colocaron todos los grupos y el control negativo en un contenedor con agua hirviendo durante 5 min e inmediatamente después en hielo durante 3 min.

Paso seguido se llevó a cabo la formación de un Máster Mix en dónde se mezclaron todos los componentes necesarios para llevar a cabo la reacción (se agregó el DNA al final). Antes de agregar el DNA se dividió el Máster Mix en 12 tubos para PCR (9  $\mu$ L por tubo) y posteriormente se agregó 1  $\mu$ L del extracto obtenido de cada grupo en reacciones separadas, 1  $\mu$ L de agua para el control negativo y 2  $\mu$ L de DNA genómico para el control positivo.

Se llevaron a cabo un total de 25 ciclos de reacción, se siguieron las mismas condiciones para PCR descritas en la Figura 8 y se utilizó la enzima Taq platinum polimerasa de la marca Invitrogen. Los productos de PCR obtenidos se corrieron en un gel de agarosa 0.8% como se especificó anteriormente para identificar las colonias con el vector pRSFC.S-Met.

Debido a que se identificó la presencia del plásmido en todos los grupos, se llevó a cabo un PCR de colonia nuevamente; esta vez de 10 colonias individuales. El procedimiento consistió en preparar grupos que tuvieran células de una sola colonia.

Se realizó un Máster Mix como se indica en la Tabla 9 y se continuó con las mismas indicaciones que se describieron anteriormente.

Tabla 9. Componentes para PCR de colonia	
Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Buffer 10x	12
dNTPs 10 mM	2.4
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	3.6
Forward-Met 10 $\mu\text{M}$	2.4
Reverse-Met 10 $\mu\text{M}$	2.4
DNA presente en pooles	12 (1 $\mu\text{L}$ por reacción)
Taq platinum polimerasa 5 U/ $\mu\text{L}$	0.48
DMSO 100%	6
H <sub>2</sub> O MQ.	78.72
Volumen total	120 $\mu\text{L}$
Preparación de Máster Mix para PCR. Estas cantidades fueron tomadas de acuerdo con las indicaciones del proveedor. Permiten la formación de 12 reacciones de 10 $\mu\text{L}$ cada una.	

### Confirmación de la clonación vector-inserto

Para confirmar que la construcción pRSFC.S-Met fue llevada a cabo con éxito se realizaron digestiones utilizando enzimas de restricción.

Para ello fue necesario llevar a cabo una extracción de plásmido por lisis alcalina (miniprep) de dos colonias candidatas. El procedimiento de extracción consistió en los siguientes pasos (Bimboim *et al.*, 1979):



1. Se picó con la punta de un palillo estéril ambas colonias bacterianas, se inocularon de manera individual en 5 mL de medio LB con kanamicina (50 µg/mL) y se incubaron a 37°C OVN.
2. En microtubos diferentes se agregó 1 mL de los cultivos, se centrifugó 1 min a máxima velocidad a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante.
3. Se resuspendieron las pastillas en 1 mL de solución SET fría y se mezcló con vortex para posteriormente centrifugar y eliminar el sobrenadante.
4. Los pellets formados se resuspendieron en 150 µL de solución SET + 5 µL de RNasa y se agitó en vortex vigorosamente.
5. Se agregaron 350 µL de la solución II, se mezcló por inversión 5-6 veces y se incubó 10 min en hielo.
6. Posteriormente se agregaron 250 µL de la solución III fría y se mezcló por inversión para incubar inmediatamente 10 min en hielo.
7. Se centrifugaron las muestras durante 10 min a máxima velocidad y a temperatura ambiente para recuperar el sobrenadante por decantación en un tubo nuevo y desechar la pastilla.
8. Se agregaron 700 µL de isopropanol al tubo con sobrenadante y se agitó por inversión 6 veces. Inmediatamente después se centrifugó 10 min a máxima velocidad y se eliminó el sobrenadante por decantación.
9. Se agregó a la pastilla 1 mL de etanol 70% y se mezcló por inversión 6 veces.
10. Finalmente se centrifugó a máxima velocidad durante 10 min y se eliminó el sobrenadante por decantación para dejar secando la pastilla a temperatura ambiente y (una vez seca) se disolvió en 50 µL de agua MQ estéril.

Con los plásmidos extraídos fue posible llevar a cabo las digestiones y el posterior análisis de las construcciones. Para realizar la digestión se prepararon 2 reacciones

utilizando las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* de la marca NEB. Se incubaron a 37°C durante 2.5 h y posteriormente se inactivaron las enzimas a 65°C durante 20 min.

Terminado el tiempo de inactivación de las enzimas se prosiguió a realizar una electroforesis en gel de agarosa 0.8% (Tabla 10). En el primer pozo se colocó el marcador de pesos moleculares y los dos pozos posteriores corresponden a la digestión del vector de la colonia 1 y 2 respectivamente. Debido a que se tenía 25 µL de muestra, se agregó a cada tubo 4.17 µL de buffer de carga antes de ser cargados en el gel.

Tabla 10. Digestión para identificar la construcción pRSFC.S-Met		
Reactivos	Colonia 1 (µL)	Colonia 2 (µL)
Buffer 2.1 10x	2	2
pRSFC.S-Met	6.40 (1 µg )	7.52 (1 µg )
<i>EcoRI</i> 20 U/µL	1	1
<i>HindIII</i> 20 U/µL	1	1
H <sub>2</sub> O MQ	14.6	13.48
Volumen total	25	25

### Secuenciación del plásmido pRSFC.S-Met

Ambos vectores contenían el amplicón insertado, de manera que se tomaron 15 µL de cada uno de ellos y se mandaron a secuenciar al Instituto de Fisiología Celular, UNAM utilizando los oligonucleótidos ACYCDuetUp1 y DuetDOWN1 (Tabla 11) que

flanquean el inserto en la región 5' y 3'. De ambos oligonucleótidos se enviaron 50 µL con una concentración 10 µM.

Tabla 11. Oligonucleótidos empleados para la secuenciación del gen <i>metiltransferasa</i>	
Nombre	Secuencia 5' - 3'
ACYCDuetUp1	GGATCTCGACGCTCTCCCT
DuetDOWN1	GATTATGCGGCCGTGTACAA

Al recibir la secuenciación en formato txt, se procedió a convertir el formato en FASTA. El alineamiento se llevó a cabo utilizando la herramienta BLAST de la base de datos NCBI. La secuencia teórica del vector pRSFC.S-Met se obtuvo utilizando el programa Serial Cloner, posteriormente se alineó contra las secuencias obtenidas de manera experimental.

## Expresión del clúster biosintético completo

Como se mencionó en los antecedentes, previamente se había llevado a cabo la clonación de 3 genes involucrados en la biosíntesis del lantipéptido de clase I presente en el genoma de *Micromonospora echinospora*. Los genes *lanA* y *lanB* fueron clonados en el vector pETDuet, denominando a dicha construcción pETDuetAB. Por otro lado, el gen *lanC* se clonó en el MCSII del vector pRSFDuet, obteniendo una construcción que recibió el nombre pRSFC.S. Con la construcción

pRSFC.S-Met obtenida durante este proyecto se procedió a llevar a cabo ensayos para determinar las condiciones para la expresión del grupo completo de genes.

### Transformación en células competentes de *E. coli* BL21

Se preparó medio LB sólido y se agregó a cada caja Petri un volumen final de 25 mL de medio con 7.5  $\mu$ L de un stock de kanamicina (15  $\mu$ g/mL en cada caja) y 3.12  $\mu$ L de un stock de ampicilina (25  $\mu$ g/mL en cada caja). El vector pRSFC.S-Met y pETDuetAB confieren a la bacteria una resistencia a kanamicina y ampicilina, de manera que los antibióticos en las cajas permiten seleccionar solamente colonias de células transformantes con ambos vectores.

Se tomó una alícuota con células competentes de *E. coli* BL21 y se colocó dentro de ella 3  $\mu$ L de las construcciones pETDuetAB y pRSFC.S-Met. Inmediatamente se dejó reposar durante 30 min en hielo y se siguió el mismo protocolo descrito en el apartado "Transformación en células competentes de *E. coli* Top 10". En esta ocasión se utilizaron cajas Petri que contenían medio LB sólido con ampicilina y kanamicina como antibióticos de selección.

Se escogieron 10 de las colonias que crecieron en los medios descritos anteriormente y se sembraron nuevamente en medios idénticos para ser incubadas bajo las mismas condiciones.

## Inducción de la expresión de genes biosintéticos

Se prepararon 60 mL de medio TB estéril y se agregó ampicilina y kanamicina a una concentración final de 25 µg/mL y 15 µg/mL respectivamente. Posteriormente se dividió en tubos de vidrio colocando 5 mL de medio en cada uno. El primer tubo se etiquetó como control negativo (se inoculó con una colonia de *E. coli* BL21 transformada con plásmidos vacíos), mientras que los demás tubos fueron inoculados con una de las colonias que contienen los vectores pRSFC.S-Met y pETDuetAB. Se incubaron toda la noche a 29°C.

Al día siguiente se tomaron 50 µL de cada uno de los preinóculos obtenidos y se suspendieron de manera independiente en 5 mL de medio TB (suspensión con concentración final 1%). Se incubaron las células 2 h a 37°C y posteriormente se supervisó cada cierto tiempo que la densidad óptica de las suspensiones se encontrara en un rango de 0.5 - 0.7 en una longitud de onda de 600 nm.

Una vez obtenida la densidad óptica deseada en cada tubo, se indujo la expresión utilizando IPTG a una concentración final de 1 mM (de un stock de IPTG con una concentración 500 mM, se agregó 10 µL para cada tubo). Posteriormente se incubaron las células durante 4 h a 37°C y transcurrido el tiempo se colocaron los cultivos dentro del refrigerador a 4°C.

## Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Se tomaron 1.5 mL de cada uno de los cultivos y se vertieron dentro de tubos Eppendorf, se centrifugaron y se eliminó el sobrenadante. Paso seguido se suspendieron las células en 300  $\mu$ L de TBS frío, se tomaron 100  $\mu$ L de cada una de las muestras y se colocaron en tubos Eppendorf diferentes. El procedimiento continuó agregando a cada tubo 50  $\mu$ L de buffer de carga 2X (Tabla 12) e hirviendo las muestras a 94°C durante 8 min utilizando un termoblock.

Tabla 12. Preparación de buffer de carga 2x	
Reactivo	Volumen (mL)
Tris HCl 1 M pH 6.8	1.25 mL
SDS 10%	4 mL
Glicerol (100%)	2 mL
Azul de bromofenol	0.4 mg
2 $\beta$ -mercaptoetanol	1.1 mL
Agua	1.65 mL
Volumen final	10 mL

Concluido el tiempo se colocaron las muestras en hielo y finalmente se cargaron en dos geles de poliacrilamida al 10%, utilizando una cámara para electroforesis de proteínas con buffer de corrida 1X (Tabla 13).

Tabla 13. Preparación de buffer de corrida 1X	
Reactivo	Masa (g)
Glicina	14.4
TRIS	3.02
SDS	1
Volumen final	1 L

En el primer pozo se cargaron 4  $\mu$ L del marcador de peso molecular, en el segundo pozo 5  $\mu$ L de un control positivo con Histag, en el tercer pozo 15  $\mu$ L de control negativo (células con plásmidos vacíos) y a partir del cuarto pozo se agregaron 15  $\mu$ L de cada una de las colonias en orden ascendente. Se utilizó una fuente de poder para correr las muestras a 70V de manera inicial y posteriormente se aumentó el voltaje a 110V cuando las muestras pasaron el gel apilador. Al finalizar, uno de los geles se tiñó con Azul de Coomassie, mientras que el otro se utilizó para llevar a cabo la técnica de Western Blot.

### Tinción con Azul de Coomassie

Se colocó uno de los geles de poliacrilamida previamente obtenidos dentro de solución de fijación durante 30 min (Tabla 14). Terminado este tiempo se colocó el gel en solución con Azul de Coomassie y se dejó OVN (Tabla 15).

Tabla 14. Preparación de soluciones para teñir con Azul de Coomassie		
Reactivo	Solución de fijación	Solución de destinción
	Volumen (mL)	Volumen (mL)
Etanol	40	20
Ácido acético	10	10
Agua	50	70
Volumen final	100 mL	100 mL

Tabla 15. Preparación de solución con Azul de Coomassie			
Reactivo	Solución stock I	Reactivo	Solución stock II
Coomassie Brilliant Blue	0.2%	Ácido acético	20%
Etanol	90%		
Para formar la solución con Coomassie es necesario mezclar ambos stocks en partes iguales.			

Al día siguiente se retiró el gel de la solución con Azul de Coomassie y se colocó nuevamente en solución de fijación durante 1 min. Posteriormente se colocó el gel en una solución para decolorar durante 15 min y posteriormente se colocó el gel en agua hirviendo. Se hicieron lavados con agua hasta lograr una decoloración óptima. Como paso final se tomó una fotografía del gel teñido.



## Western Blot

Con el otro gel obtenido durante el SDS- PAGE se llevó a cabo una transferencia de proteínas utilizando una membrana de PVDF con un tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$  (marca Merck Millipore). La membrana fue activada con metanol y luego colocada en buffer de transferencia 1X. El experimento se llevó a cabo utilizando un sistema de electro transferencia en donde se sumergió la membrana y el gel de poliacrilamida en buffer de transferencia 1X durante 10 min aproximadamente. Posteriormente las proteínas se transfirieron durante 1.5 h a 90V, se colocó la membrana en leche desnatada 5% preparada con PBST y se incubó a 4°C durante toda la noche.

Al día siguiente se retiró la membrana de la leche y se incubó durante 1.5 h con anticuerpo primario Anti-His a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se retiró la membrana del anticuerpo primario (Anti-Histag de ratón, marca ThermoFisher Scientific con dilución 1:5000) y se hicieron 3 lavados de 15 min utilizando PBST. Al terminar los lavados se llevó a cabo una incubación de la membrana con un anticuerpo secundario anti-IgGs de ratón conjugado a peroxidasa durante 1.5 h y nuevamente se llevaron a cabo 3 lavados de la membrana utilizando PBST. Para finalizar se utilizó un sustrato de inmunodetección que, al reaccionar con la peroxidasa, permite identificar un cambio de color en las proteínas con Histag.

# RESULTADOS

## Análisis bioinformático

### AntiSMASH

El programa antiSMASH versión 6.1.1 mostró la existencia de diferentes clústeres biosintéticos que permiten la síntesis de metabolitos secundarios en el genoma de *Micromonospora echinospora*. El de particular interés es un clúster que codifica para un lantipéptido de clase I en la región 7 del cromosoma bacteriano.

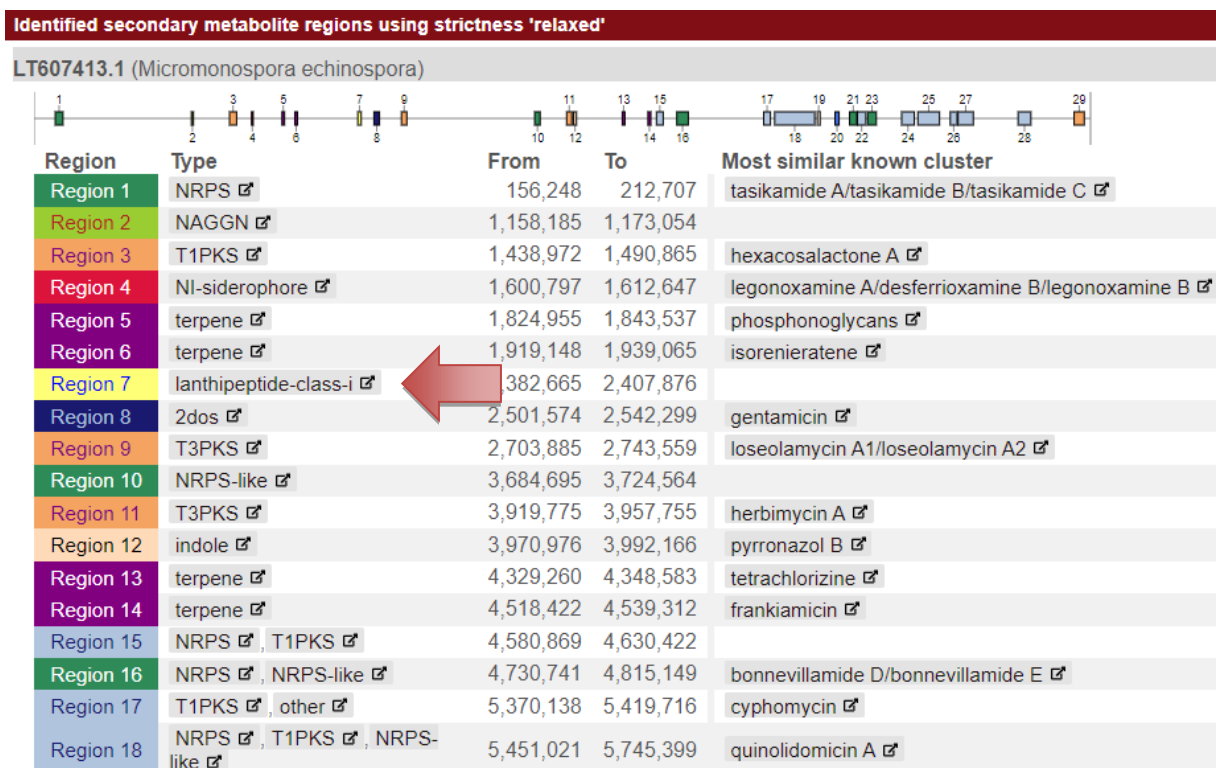


Figura 9. Clústeres de metabolitos secundarios en el genoma de *M. echinospora*. La región 7 contiene un clúster biosintético que codifica para un lantipéptido de clase I. Tomado de antiSMASH versión 6.1.1 (<https://antismash.secondarymetabolites.org/>).

Un acercamiento en la región 7 del cromosoma bacteriano permite identificar los genes involucrados en la biosíntesis del lantipéptido (Figura 10): *lanA*, *lanB*, *lanC* y *metiltransferasa*.

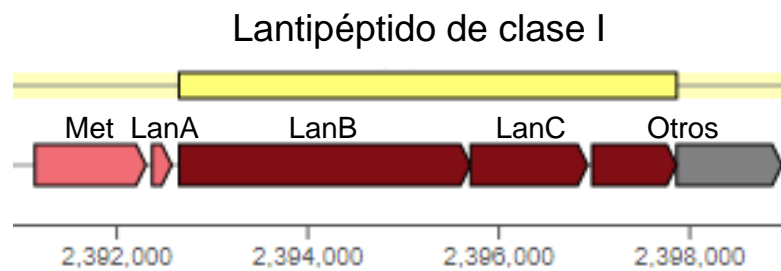


Figura 10. Organización de los genes en el clúster biosintético 1.7 asociado a la producción de un lantipéptido de clase I identificado en el genoma de *M. echinospora*. “Met” hace referencia al gen que codifica la enzima metiltransferasa. Tomado de antiSMASH versión 6.1.1 (<https://antismash.secondarymetabolites.org/>).

La identificación del gen en antiSMASH nos permitió obtener su secuencia de nucleótidos, la cual está formada de 1164 pb (Tabla 16) y la secuencia de aminoácidos correspondiente a la enzima (Ver tabla 17).

**Tabla 16: Secuencia de nucleótidos que codifica para la enzima metiltransferasa**

```

ATGGCGCTGCGGACGGCGATGGTGGCGGAGCTGAGCGCGGACACGATCAGGTCGGAGGCCGG
TGGCTGCCGCGTTCTCGGTTCGTGCCACGTCACCTGTTTCGCCCCAGGGGAGTCCCTGGATGT
GGTGTACGACTCGAACACCCCGTTGGTGACGAAGACCGGTTTCGGACGGTACGGCGCTCAGT
TCGGTGTTCGGCGGCGCACATCCAGGCGGTGATGCTGGAGCAGGCCGAGATCGAGCCGGGGA
TGCGGGTTCTGGAGATCGGTTTCGGGTGGGTACAACCGCGGCGCTGATCGCGGAGCTGGTTGG
CCCGCAGGGTGCGGTGACGTTCGGTGGACATCGACCCGGAGATCGTCGCTCGGGCCCCGCGCC
TGCTTGCAGACCGCCGGCTACGACCCGGGTGCGGGTCGTGCAGGCCGACGCCGAATACGGTG
TACCGGAGCAGGCACCGTACGACCCGGATCATCGTTCACGGTTCGGAGCGTGGGACATCCCACC
GGCTTGGATCGCCCAACTGTCCGAACACGGCCGGATCGTGGTGGCACTGCGGTTTCGCCGGC
CTGTCCCGCTGCGTTCGCTTCGACCTGGCCGAAGGGCGCCTCGTCAGTCACAGCTACTGCC
TCGGCGGGTTCGTGCCGATGCAGGGCGCGGGCACGTA TCCGAGACGCTGGTGCCGATCAA
CGGCGAGGCGACGCTGCGTATGGACGGGCCGGACCCGGGCTTCGACGTGCCGGCCCTACGT
AAGGCGGTCCACGCACCGAGGATCGAGCGGTGGTCCGGGGCGGCGTTCGACATGCCCGACG
AGCTGGAGTTGTTTCGTGGTGACCAGCGGTCCACGTGCCCTTCCTGTACGCGAGCCAGCA
GTTGGTGGACCAGGGCGTGTTCAGCCCGGCGGTGATCTACGGCACGGCTGCCGTGGTTCGAG
GGCGGCAGTTTCGCTACCGGACGAAACGCGAGAACGAGGGCCTCGGCGGATGGGAGAGCG
GTGTCTACGCCTACGGCCCGCAGGCCGAGGCGGTTCGTGACAGGTATGTTCGGGCTGTTGCG
CCGCTGGGCGGCCGACTTCCGCCGTTCGCGGGGCCGCGCGGATCGAGTACCTGCCACCAGC
GCAGGCGTGCCGGACGGCTGGTACGTGCCGAAGCGCCACGGCGCCGTCGCGGTGTCTTGGC
GCTGA

```

**Tabla 17: Secuencia de aminoácidos de la enzima metiltransferasa**

MALRTAMVAELSADTIRSEAVAAAFSVVPRHLFAPGESLDVVYDSNTPLVTKTGSDGTALS  
 SVSAAHIQAVMLEQAEIEPGMRVLEIGSGGYNAALIAELVGPQGAVTSVDIDPEIVARARA  
 CLQTAGYDRVRVVQADAEGVPEQAPYDRIIVTVGAWDIPPAWIAQLSEHGRIVVPLRFAG  
 LSRCVAFDLAEGRLVSHSYCLGGFVPMQGAGTYSETLVPINGEATLRMDGPDGFDVPALR  
 KAVHAPRIERWSGAAFDMPDELELFVVTSASHVPFLYASQQLVDQGVFSPAVIYGTAAVVE  
 GGSFAYRTKRENEGLGGWESGVYAYGPQAEAVADRYVGLLRWAADFRRRGAARIEYLP  
 TSWR

### Propiedades fisicoquímicas de la enzima

La determinación de los parámetros fisicoquímicos de la enzima se obtuvieron a partir del programa ExPASy (Tabla 18) como se indica en la metodología.

Tabla 18. Propiedades fisicoquímicas teóricas de la enzima metiltransferasa	
Parámetro	Valor
Número de aminoácidos	387
Peso molecular:	41390.9 Da
pI teórico	5.12
Índice alifático	90.78%

Alineamiento múltiple de metiltransferasas asociadas a lantipéptidos de clase I.

Tabla 19. Porcentaje de identidad y cobertura de metiltransferasas involucradas en la síntesis de lantipéptidos de clase I en relación con la enzima de interés.			
Organismo	Identidad	Cobertura	Número de aminoácidos
<i>Micromonospora sagamiensis</i>	98.19%	100%	391
<i>Micromonospora pallida</i>	98.19%	100%	387
<i>Micromonospora inyonensis</i>	97.16%	100%	387
<i>Verrucosispora sp. NA02020</i>	80.41%	99%	419
<i>Streptomyces aidingensis</i>	62.89%	99%	401
<i>Frankia casuarinae</i>	62.76%	99%	408
<i>Streptomyces olivaceus</i>	34.84%	93%	398

S_olivaceus	-----MSQPTADQLCNRLVDDILS--ERDLPSDVEQAMRTV	35
Verrucosipora_sp	MRGSTGSYPGTFQLGSQSVTSAGQQAVQDPAALRAAMVSELCE--DTIASAVAAAFSLTV	58
M_inyonensis	-----MALRTAMVAELSE--DTIRSEAVAAAFSVV	28
M_echinospora	-----MALRTAMVAELSA--DTIRSEAVAAAFSVV	28
M_sagamiensis	-----MRDPMALRTAMVAELSE--DTIRSEAVAAAFSVV	32
M_pallida	-----MALRTAMVAELSE--DTIRSEAVAAAFSVV	28
S_aidingensis	-----MTTVR--ETDDTAASLRAAMVGELEGMGV-LQSKAVAKAVATV	40
F_casuarinae	-----MTSVQDSSATDSSAATLRAAMVDELRTTGDAIKTGQVAAAVGRV	43
	* : * : :	
S_olivaceus	PRDTFLPGIDLKNAYTDQAVTIKDNPGQPLPLSCASVPSVWAMMLGQLTARPGDVLLEIG	95
Verrucosipora_sp	PRHVFAPDEPLAVVYDVTALVTKTGPDKALSSVSAHIQAVMLEQAEIEPGMIVLEIG	118
M_inyonensis	PRHLFAPGESLDVVYDNTPLVTKTGDGTALSSVSAHIQAVMLEQAEIEPGMIVLEIG	88
M_echinospora	PRHLFAPGESLDVVYDNTPLVTKTGSDDGTALSSVSAHIQAVMLEQAEIEPGMIVLEIG	88
M_sagamiensis	PRHLFAPGESLDVVYDNTPLVTKTGPDTALSSVSAHIQAVMLEQAEIEPGMIVLEIG	92
M_pallida	PRHLFAPGESLDVVYDNTPLVTKTGPDTALSSVSAHIQAVMLEQAEIEPGMIVLEIG	88
S_aidingensis	PRHLFAADQPLESAYAAKALVKIKRDGSGNALSSLSATHIQAVMLEQAEIEPGMIVLEIG	100
F_casuarinae	PRHLFAPDEPLEAVYAANKALVKIKRDGNGAALSSLSAAHIQAVMLEQAEIEPGMIVLEIG	103
	** . * . * . * * : : . . * * . * : * : * * * * * * * * * * * * * *	
S_olivaceus	AGTGYNAALAEELVGG-GRVTTDIDSDVALHARTTLNAGYERVTVIERNGLLGAHEHA	154
Verrucosipora_sp	SGGYNAALAEELVGGDDGAVTSDIDSDIVARARAYLDIAGYERVRVWQADAEYGVPAHA	177
M_inyonensis	SGGYNAALAEELVGPQGAVTSDIDIIVARARACLOIAGYDRVRVWQADAEYGVPEQA	147
M_echinospora	SGGYNAALAEELVGPQGAVTSDIDIIVARARACLOIAGYDRVRVWQADAEYGVPEQA	147
M_sagamiensis	SGGYNAALAEELVGPQGAVTSDIDIIVARARACLOIAGYDRVRVWQADAEYGVPEQA	151
M_pallida	SGGYNAALAEELVGPQGAVTSDIDIIVARARASLOIAGYDRVRVWQADAEYGVPEQA	147
S_aidingensis	SGGYNAALAEELVGEAGTVVTDIDDIIVARARACLOIAGYERVRVWQADAEYGVPEQA	159
F_casuarinae	SGGYNAALAEELVGEAGTVVTDIDDIIVARARACLOIAGYERVRVWQADAEYGVPEQA	162
	: *	
S_olivaceus	PYDRIIATVGVNDIPATWMDQLADGGRLVPLRIRGQTRSVALTRH---GNLVSIGME	210
Verrucosipora_sp	PYDRIIVTVGAWDIPAWIEQLTERGRIVPLRIFAGLSRCVAFERA---GAGLVSISYR	233
M_inyonensis	PYDRIIVTVGAWDIPAWIAQLSERGRIVPLRIFAGLSRCVAFDLT---GGILVLSISYC	203
M_echinospora	PYDRIIVTVGAWDIPAWIAQLSEHGRIVPLRIFAGLSRCVAFDLA---EGILVLSISYC	203
M_sagamiensis	PYDRIIVTVGAWDIPAWIAQLSEHGRIVPLRIFAGLSRCVAFDLA---GGILVLSISYC	207
M_pallida	PYDRIIVTVGAWDIPAWIAQLSERGRIVPLRIFAGLSRCVAFDLA---GGILVLSISYC	203
S_aidingensis	PYDRIIVTAGAWDIPAWLEQMSERGRIVPLRIRGLTRISFAFDRE---DGLVLSISYR	215
F_casuarinae	PYDRIIVTAGAWDIPAWQEQLTNGGRLVPLRIRGLTRISIAFDREDDGDVILVLSISYR	222
	* *	
S_olivaceus	LGGFVIMQGGEGTFTETLVPINGEATLRIDGDPDGFDPALRKAVHAPR---IERWSGAAFD	269
Verrucosipora_sp	LGGFVIMQGGEGTFTETLVPINGEATLRIDGDPDGFDPALRKAVHAPR---IERWSGAAFD	291
M_inyonensis	LGGFVIMQGGAGYSETLVPINGEATLRVDGDPDGFDPALRKAVHAPR---IERWSGAAFD	261
M_echinospora	LGGFVIMQGGAGYSETLVPINGEATLRMDGDPDGFDPALRKAVHAPR---IERWSGAAFD	261
M_sagamiensis	LGGFVIMQGGAGYSETLVPINGEATLRMDGDPDGFDPALRKAVHAPR---IERWSGAAFD	265
M_pallida	LGGFVIMQGGAGYSETLVPINGEATLRMDGDPDGFDPALRKAVHAPR---IERWSGAAFD	261
S_aidingensis	LGGFVIMQGGAGYTERLVPIDGIALQVDDQRFQFDEALAAAVHTPR---LEVWSGAAFD	273
F_casuarinae	LGGFVIMQGGIGTFRERLVPITDEWVLRVDDPSQFDFVEGLRDLALATPR---LERWSGAAFD	280
	* *	
S_olivaceus	GEESFDGWLRATAHDDRVCRLTTPPEAMEQALIRRPATPARTPALIDDAASLAYLTVTR	329
Verrucosipora_sp	LPDELEL-FV--VTSAPQVFFLHASQQLVDQ-GVFPAVMYGTAILIDGGSFAYRTKR--	345
M_inyonensis	MPDELEL-FV--VTSASHVPFLYASQQLVDQ-GVFSPAIVYGTAAWVEGGSFAYRTKR--	315
M_echinospora	MPDELEL-FV--VTSASHVPFLYASQQLVDQ-GVFSPAIVYGTAAWVEGGSFAYRTKR--	315
M_sagamiensis	MPDELEL-FV--VTSASHVPFLYASQQLVDQ-GVFSPAIVYGTAAWVEGGSFAYRTKR--	319
M_pallida	MPDELEL-FV--VTSASHVPFLYASQQLVDQ-GVFSPAIVYGTAAWVEGGSFAYRTKR--	315
S_aidingensis	LPDELEL-FL--ATSTPQAMHLHGSKQLVDQ-GALALSVTRGVPALVWGGSFAYRTKR--	327
F_casuarinae	LPDELEF-FL--VTNLAQVAHLHVDETQVQN-GRFAPSAAARGVPTLVSGGSFAYRTKR--	334
	: : : : : : : : * : : : : : : : : : : : : : : : * * * * *	
S_olivaceus	DADPQRPFRLGATAYGPRGEEELARDLVAHIDAWGSDRLA--VPRLLITPSTGDAPGHT-	386
Verrucosipora_sp	ENESTDGWESGVYAYGPNAAEIIADRYIALRRWATQYRHRGAARIEYIPTAGDAPPYGW	405
M_inyonensis	GNEGLGGWESGVYAYGQAEAVADRYVGLRRRWAADFRRRGAARIEYLPTSAG--VPDGW	373
M_echinospora	ENEGLGGWESGVYAYGQAEAVADRYVGLRRRWAADFRRRGAARIEYLPTSAG--VPDGW	373
M_sagamiensis	ENEGLGGWESGVYAYGQAEAVADRYVGLRRRWAADFRRRGAARIEYLPTSAG--VPDGW	377
M_pallida	ENEGLGGWESGVYAYGQAEAVADRYVGLRRRWAADFRRRGTARIEYLPTSAG--VPDGW	373
S_aidingensis	PNEETGGFESGVFAHGPEAEVAARVYDLLRRWASDHRRRGAARIRYVRMPEGTAEPSAG	387
F_casuarinae	PNEKTGGFESGVFAHGPDADRVAEHYVELLRRWASDHRRRGAARIRYVYKAAAGTAPSVG	394
	: : * . * : * * : : * * : : * : : : : : * * * * *	
S_olivaceus	-ISKPESRITLTY-	398
Verrucosipora_sp	YTPKRHGVAVAVWR	419
M_inyonensis	YVPKRHGVAVAVSWR	387
M_echinospora	YVPKRHGVAVAVSWR	387
M_sagamiensis	SVPKRHGVAVAVSWR	391
M_pallida	YVPKRHGVAVAVSWR	387
S_aidingensis	VWAKRFQAVQISWS	401
F_casuarinae	LVPKRHGVAVAVRWP	408
	* . : : : :	

Figura 11. Alineamiento múltiple de metiltransferasas asociadas a lantipéptidos de clase I presentes en diferentes especies bacterianas. El asterisco indica que los aminoácidos están perfectamente alineados en esa posición, cuando sólo hay

coincidencias se observa uno o dos puntos. Encerrado en rojo se encuentran secuencias de aminoácidos altamente conservados. Obtenido de Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

En la Tabla 19 se observa que todas las enzimas alineadas con la enzima de interés presentan una cobertura de más del 90%. En cuanto a la identidad, se observa mayor variación en los resultados encontrados, siendo el mayor de 98.19% y el menor de 34.84%. A pesar de la variación en los resultados de identidad, todas las secuencias cuentan con aminoácidos conservados, lo cual los sugiere de gran importancia (Figura 11).

## Clonación del gen de interés

Temperatura de alineamiento óptima para amplificar el gen *metiltransferasa*.

Como se mencionó en la metodología, se llevó a cabo la amplificación del gen *metiltransferasa* a partir de DNA genómico. En la Figura 12 se observa un análisis en gel de agarosa 0.8% con productos de PCR a diferentes temperaturas de alineamiento. Se observa la aparición de bandas en la región de 1000 a 1500 pb indicando la amplificación de una secuencia de DNA. De acuerdo con lo encontrado en antiSMASH, el gen *metiltransferasa* de *M. echinospora* tiene una longitud de 1164 nucleótidos, de manera que este resultado nos permite sugerir que la amplificación realizada es del gen de interés.

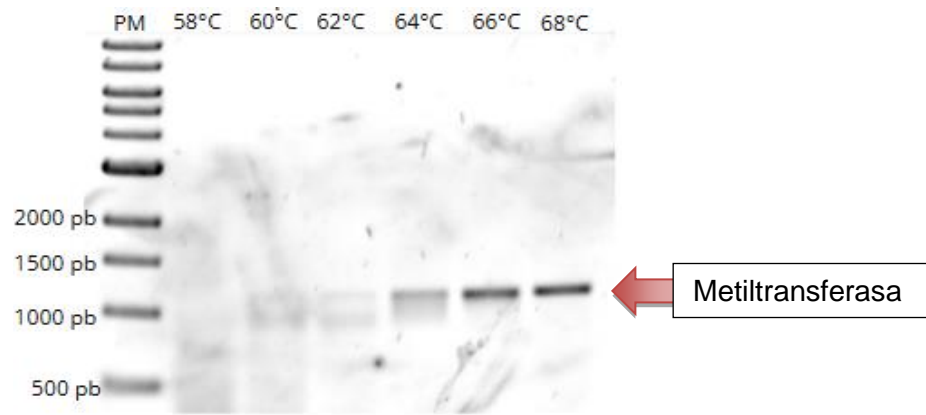


Figura 12. Determinación de temperatura de alineamiento óptima para la amplificación de la metiltransferasa de *M. echinospora*. El análisis se llevó a cabo en gel de agarosa 0.8%. Carril 1: marcador de peso molecular, a partir del carril 2 se muestran productos de PCR a diferentes temperaturas de alineamiento con diferencia de 2°C. El análisis comenzó con 58°C y terminó con 68°C.

Es importante mencionar que después de llevar a cabo el gradiente de temperaturas de alineamiento se observó una banda más definida y con mayor intensidad a los 68°C, de manera que la temperatura de alineamiento óptima para amplificar el gen *metiltransferasa* es 68°C.

### Amplificación del gen metiltransferasa

Posteriormente se realizó PCR y se analizó el producto de la reacción en gel de agarosa 0.8% para determinar si se llevó a cabo la amplificación de manera exitosa. En esta ocasión se utilizó una sola temperatura de alineamiento de 68°C.





Figura 13. Amplificación del gen de la metiltransferasa de *M. echinospora*. Análisis realizado en gel de agarosa 0.8%. Carril 1: marcador de peso molecular; Carril 2: producto de PCR obtenido a partir de una temperatura de alineamiento de 68°C.

En la Figura 13 se observa la aparición de una banda en la región que corresponde de 1000 a 1500 pb, siendo así que se llevó a cabo la amplificación del gen de interés nuevamente. Esta banda fue purificada para obtener el inserto aislado y posteriormente se digirió el mismo con enzimas de restricción.

### Digestión del vector pRSFC.S

Para iniciar la clonación fue necesario digerir el vector pRSFC.S, tal y como se indicó en el apartado “Digestión del vector pRSFD.S y del inserto” de la metodología. Posterior a la digestión, se llevó a cabo un análisis en gel de agarosa 0.8%.

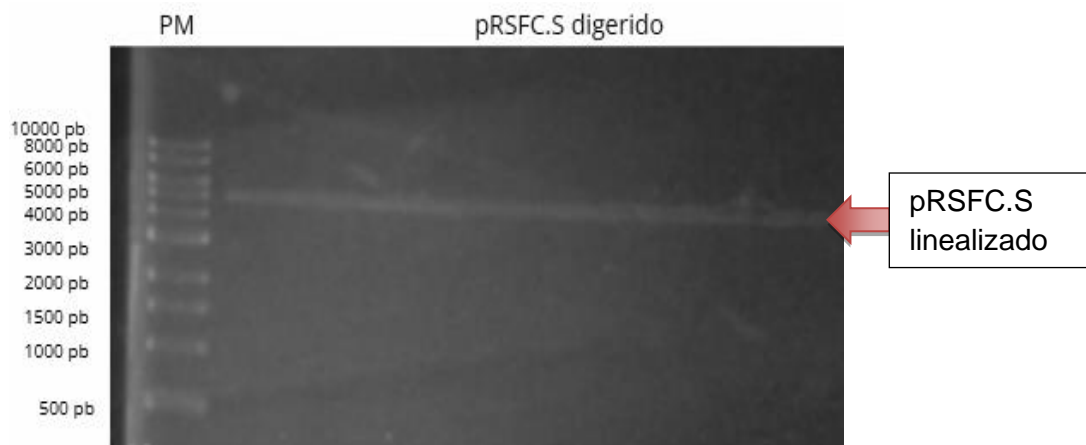


Figura 14. Digestión del vector pRSFC.S. Análisis realizado en gel de agarosa 0.8%. Carril 1: marcador de peso molecular; Carril 2: producto obtenido de la digestión del vector pRSFC.S con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*.

Recordemos que la construcción pRSFC.S está formada por el vector pRSFDuet y el inserto *lanC* en el MCSI del vector, de manera que cuenta con una longitud total de 5000 pb.

Cuando la digestión no se lleva a cabo o el vector se cierra, aparece una conformación circularizada del mismo que permite la formación de “esferas”. Esta conformación le confiere al vector la propiedad de correr en el gel de manera independiente a su longitud, lo cual favorece la aparición de múltiples bandas en el gel. El fenómeno anterior no ocurre cuando el vector se encuentra linealizado, permitiendo así la formación de una sola banda correspondiente a la longitud de la construcción. En la Figura 14 se observa la formación de una banda justo en la región de 5000 pb de acuerdo con el marcador, lo cual sugiere que el vector se digirió de manera exitosa, además de que la eficiencia de la digestión fue buena.

## PCR de colonia

Llevada a cabo la ligación y la posterior transformación en células competentes de *E. coli*, se procedió a identificar las colonias candidatas con la construcción pRSFC.S-Met.

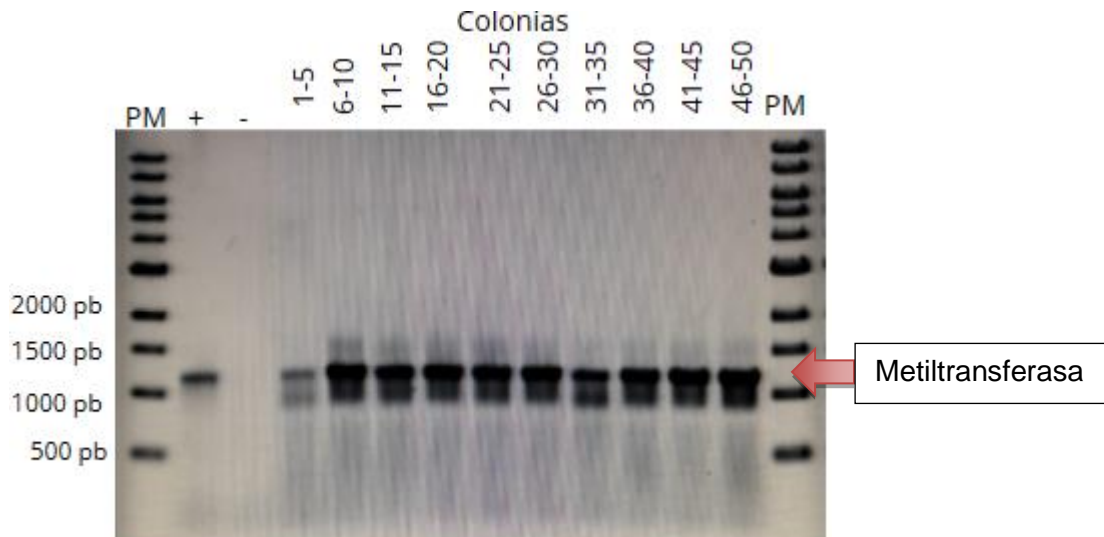


Figura 15. PCR de 50 colonias candidatas. El análisis se llevó a cabo utilizando gel de agarosa 0.8%. Carril 1 y 14: marcador de peso molecular; Carril 2: control positivo con DNA genómico; Carril 3: control negativo con agua en lugar de DNA; del carril 4 al carril 13 se colocó el producto de PCR obtenido del DNA presente en el extracto de colonias candidatas. Los grupos se hicieron de 5 colonias.

Se realizaron grupos con 5 colonias candidatas como se menciona en el apartado “PCR de colonia” de la metodología. Las muestras se sometieron a calor para ocasionar la lisis celular y exponer la construcción pRSFC.S-Met. Al llevar a cabo las reacciones de PCR, se utilizaron los diferentes extractos celulares presentes de los grupos y los oligonucleótidos descritos en la Tabla 2. Estos oligonucleótidos pueden amplificar el gen *metiltransferasa* solamente si reconocen su secuencia. De esta forma, si la construcción pRSFC.S-Met se encuentra dentro de las células se

observará la formación de bandas. Al analizar los resultados en la Figura 15 se puede observar claramente que el extracto celular de todos los grupos permite la formación de una banda entre 1000 y 1500 pb de acuerdo con el marcador. Recordando que el gen *metiltransferasa* tiene un tamaño de 1164 pb podemos sugerir que al menos una de las colonias presentes en cada grupo fue transformada con el vector pRSFC.S-Met.

Para poder dilucidar cuál de las colonias tiene la construcción de interés, se llevó a cabo un PCR de colonia de la misma manera que en el procedimiento anterior, pero utilizando extractos celulares de 9 colonias de manera individual. En la Figura 16 se observa el resultado obtenido después de correr los diferentes productos de PCR. Como se mencionó en la Figura 15, podemos sugerir que las nueve colonias fueron transformadas con la construcción pRSFC.S-Met y se puede extraer plásmido de cualquiera de ellas para secuenciar la construcción.

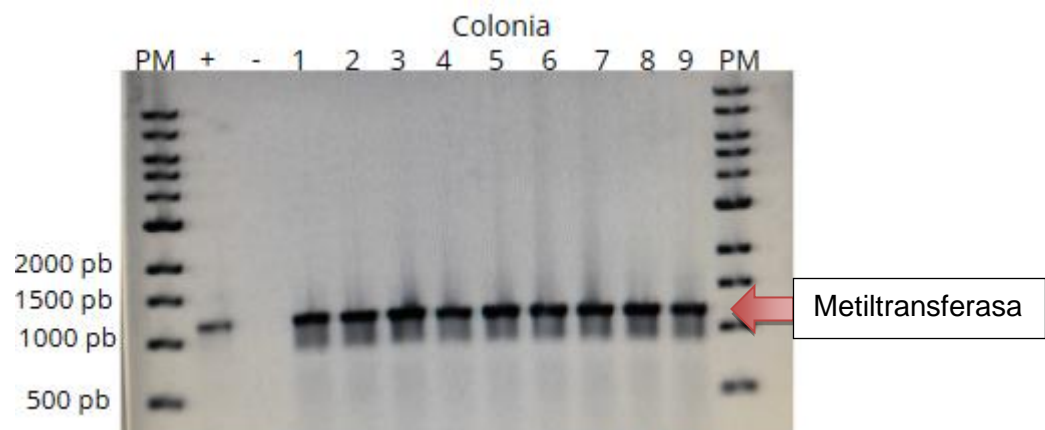


Figura 16. PCR de 9 colonias candidatas. El análisis se llevó a cabo utilizando un gel de agarosa 0.8%. Carril 1 y 13: marcador de peso molecular; Carril 2: control positivo con DNA genómico; Carril 3: control negativo con agua en lugar de DNA; del carril 4 al carril 12 se colocó el producto de PCR obtenido a partir del extracto celular individual de 9 colonias candidatas.

Cabe mencionar que tanto en la Figura 15 como en la Figura 16 se obtuvieron buenos resultados para el control positivo y el control negativo. En el control positivo se agregó DNA genómico de *Micromonospora echinospora*, el cual contiene la secuencia del gen que codifica la enzima metiltransferasa, de manera que se esperaba obligatoriamente la aparición de una banda utilizando los mismos oligonucleótidos de la Tabla 2. Por otro lado, el control negativo no tenía ninguna muestra con DNA, en su lugar solamente se agregó agua; de manera que no se esperaba la amplificación del gen. El resultado de lo anterior se ve reflejado en la ausencia de bandas.

Para ambos experimentos se observó la presencia de una banda en el control positivo y ausencia de esta en el control negativo. Esto indica que los resultados son confiables y que la metodología se llevó a cabo de manera correcta.

### Confirmación de la clonación vector- inserto

Para confirmar que la construcción de interés se llevó a cabo con éxito, se analizaron los plásmidos presentes en la colonia 1 y 2 mediante una digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*. Los cortes de ambas enzimas flanquean al gen de interés dentro del vector pRSFC.S-Met, de manera que la construcción se dividiría en dos fragmentos después de llevar a cabo la digestión (Figura 17).

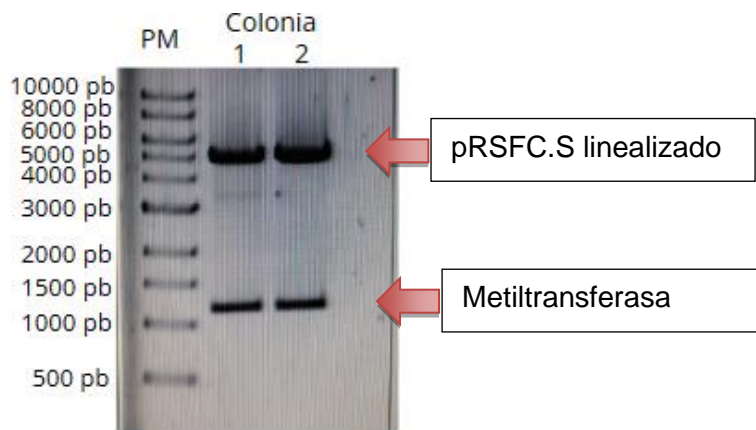


Figura 17. Digestión de pRSFC.S-Met. El análisis se llevó a cabo utilizando un gel de agarosa 0.8%. Carril 1: marcador de peso molecular; Carril 2: digestión del plásmido extraído de la colonia 1; Carril 3: digestión del plásmido extraído de la colonia 2. Ambos plásmidos fueron digeridos con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*.

Al observar la Figura 17 se puede apreciar la aparición de dos bandas en el gel para ambas colonias, estas bandas corresponden a los fragmentos generados de la construcción pSRFC.S-Met; las bandas que aparecen en la región de 5000 pb corresponden a la construcción pRSFC.S linealizada, mientras que las bandas más pequeñas corresponden al inserto metiltransferasa, el cual cuenta con una longitud de 1164 pb.

Ante estos resultados podemos estar seguros de que la construcción pRSFC.S-Met se ensambló con éxito. Sin embargo, hace falta analizar la secuencia para estar seguros de que es correcta y de que no existen mutaciones.

## Alineamiento de la secuencia teórica y experimental del vector pRSFC.S-Met

Los resultados de la secuenciación de Sanger para las construcciones de la colonia 1 y 2 fueron enviados por parte del Instituto de Fisiología Celular, estos resultados fueron transformados a formato FASTA para llevar a cabo el alineamiento como se menciona en el apartado “Secuenciación del plásmido pRSFC.S-Met” de la metodología. Los oligonucleótidos ACYCDuetUP1 y DuetDOWN1 flanquean el gen, de manera que es posible analizar su secuencia desde ambos extremos.

La parte “Query” corresponde a la secuencia teórica de la construcción pRSFC.S-Met, mientras que “Subject” hace referencia a la secuencia obtenida de la colonia 1 y 2 respectivamente.





Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1899 bits(1028)	0.0	1037/1041(99%)	3/1041(0%)	Plus/Minus
Query 267	TGACG-AAGA-CCGGTTCGGACGGTACGGCGCTCAGTTCGGTGTCCGGC-GGCCACATCC			323
Sbjct 1043	TGACGAAAGACCCGGTTCGGACGGTACGGCGCTCAGTTCGGTGTCCGGCAGGCACANCC			984
Query 324	AGGCGGTGATGCTGGAGCAGGCCGAGATCGAGCCGGGATCGGGTTCGGAGATCGGTT			383
Sbjct 983	AGGCGGTGATGCTGGAGCAGGCCGAGATCGAGCCGGGATCGGGTTCGGAGATCGGTT			924
Query 384	CGGGTGGGTACAACGCGCGCTGATCGCGAGCTGGTTGGCCCGCAGGGTGCAGGTGACGT			443
Sbjct 923	CGGGTGGGTACAACGCGCGCTGATCGCGAGCTGGTTGGCCCGCAGGGTGCAGGTGACGT			864
Query 444	CGGTGGACATCGACCCGGAGATCGTCGCTCGGGCCCGCGCTGCTTGCAGACCCGCGCT			503
Sbjct 863	CGGTGGACATCGACCCGGAGATCGTCGCTCGGGCCCGCGCTGCTTGCAGACCCGCGCT			804
Query 504	ACGACCCGGTGCAGGCGGAGCGCCGAATACGGTGTACCGGAGCAGGCACCGT			563
Sbjct 803	ACGACCCGGTGCAGGCGGAGCGCCGAATACGGTGTACCGGAGCAGGCACCGT			744
Query 564	ACGACCCGGATCATCGTCACGGTTCGGAGCGTGGGACATCCCACCGGCTTGGATCGCCAAAC			623
Sbjct 743	ACGACCCGGATCATCGTCACGGTTCGGAGCGTGGGACATCCCACCGGCTTGGATCGCCAAAC			684
Query 624	TGTCGGAACACGGCCGGATCGTGGTGCCTGCGGTTCCGGCCCTGTCCCGCTGCGTCCG			683
Sbjct 683	TGTCGGAACACGGCCGGATCGTGGTGCCTGCGGTTCCGGCCCTGTCCCGCTGCGTCCG			624
Query 684	CCTTCGACCTGGCCGAAGGGCGCCTCGTCAGTCACAGCTACTGCCTCGGCGGGTTCGTGC			743
Sbjct 623	CCTTCGACCTGGCCGAAGGGCGCCTCGTCAGTCACAGCTACTGCCTCGGCGGGTTCGTGC			564
Query 744	CGATGCAGGGCGCGGGCACGTAATCCGAGACGCTGGTGCCGATCAACGGCGAGGCAGCGC			803
Sbjct 563	CGATGCAGGGCGCGGGCACGTAATCCGAGACGCTGGTGCCGATCAACGGCGAGGCAGCGC			504
Query 804	TGCGTATGGACGGGCGGACCCGGGCTTCGACGTGCCGGCCCTACGTAAGGCGGTCCACG			863
Sbjct 503	TGCGTATGGACGGGCGGACCCGGGCTTCGACGTGCCGGCCCTACGTAAGGCGGTCCACG			444
Query 864	CACCGAGGATCGAGCGGTGGTCCGGGGCGGCGTTCGACATGCCCGACGAGCTGGAGTTGT			923
Sbjct 443	CACCGAGGATCGAGCGGTGGTCCGGGGCGGCGTTCGACATGCCCGACGAGCTGGAGTTGT			384
Query 924	TCGTGGTGACGAGCGGTCACCGTGCCTTCCTGTACGCGAGCCAGCAGTTGGTGGACC			983
Sbjct 383	TCGTGGTGACGAGCGGTCACCGTGCCTTCCTGTACGCGAGCCAGCAGTTGGTGGACC			324
Query 984	AGGGCGTGTTCAGCCCGGCGGTGATCTACGGCACGGCTGCCGTGGTTCGAGGGCGGAGTT			1043
Sbjct 323	AGGGCGTGTTCAGCCCGGCGGTGATCTACGGCACGGCTGCCGTGGTTCGAGGGCGGAGTT			264
Query 1044	TCGCCACCGGACGAAACGCGAGAACGAGGGCCTCGGCGGATGGGAGAGCGGTGTCTACG			1103
Sbjct 263	TCGCCACCGGACGAAACGCGAGAACGAGGGCCTCGGCGGATGGGAGAGCGGTGTCTACG			204
Query 1104	CTACGGCCCGCAGGCCGAGGCGGTGCTGACAGGTATGTCGGGCTGTTGCGCCGCTGGG			1163
Sbjct 203	CTACGGCCCGCAGGCCGAGGCGGTGCTGACAGGTATGTCGGGCTGTTGCGCCGCTGGG			144
Query 1164	CGGCCGACTTCGCGCTCGCGGGCCGCGCGGATCGAGTACCTGCCACACAGCGCAGGCC			1223
Sbjct 143	CGGCCGACTTCGCGCTCGCGGGCCGCGCGGATCGAGTACCTGCCACACAGCGCAGGCC			84
Query 1224	TGCCGGACGGCTGGTACGTGCCGAAGCGCCACGGCGCGTCCGGTGTCTGGCGCTGAA			1283
Sbjct 83	TGCCGGACGGCTGGTACGTGCCGAAGCGCCACGGCGCGTCCGGTGTCTGGCGCTGAA			24
Query 1284	AGCTTGCGGCCGCATAATGCT	1304		
Sbjct 23	AGCTTGCGGCCGCATAATGCT	3		

Figura 19. Alineamiento de la secuencia teórica del vector pRSFC.S-Met con la secuencia obtenida en la construcción de la colonia 1 utilizando el oligonucleótido DuetDOWN1. Query: pRSFC.S-Met teórica; Subjet: pRSFC.S-Met de la colonia 1. Los rectángulos azules muestran que los nucleótidos intercambiados en la Figura 18 son errores de la secuenciación y que no hay mutación en el gen.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1857 bits(1005)	0.0	1016/1022(99%)	1/1022(0%)	Plus/Plus
Query 1	GGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTC	CCCTGTAGAAATAATTTTGGTTAACTTTAATAAG	60	
Sbjct 14	GGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTC	CCCTGTAGAAATAATTTTGGTTAACTTTAATAAG	73	
Query 61	GAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCACCATCATCACCACAGCCAGGATCCGAATTCTAT	120		
Sbjct 74	GAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCACCATCATCACCACAGCCAGGATCCGAATTCTAT	120		
Query 121	GGCGCTGCGGACGGCGATGGTGGCGGAGCTGAGCGCGGACACGATCAGGTCGGAGGCGGT	180		
Sbjct 134	GGCGCTGCGGACGGCGATGGTGGCGGAGCTGAGCGCGGACACGATCAGGTCGGAGGCGGT	193		
Query 181	GGCTGCCGCGTTCTCGGTCTGCCACGTACCTGTTCCGCCAGGGGAGTCCCTGGATGT	240		
Sbjct 194	GGCTGCCGCGTTCTCGGTCTGCCACGTACCTGTTCCGCCAGGGGAGTCCCTGGATGT	253		
Query 241	GGTGTACGACTCGAACACCCCGTTGGTGACGAAGACCGGTTCCGGACGGTACGGCGCTCAG	300		
Sbjct 254	GGTGTACGACTCGAACACCCCGTTGGTGACGAAGACCGGTTCCGGACGGTACGGCGCTCAG	313		
Query 301	TTCGGTGTGCGGCGCGCACATCCAGGCGGTGATGCTGGAGCAGGCCGAGATCGAGCCGGG	360		
Sbjct 314	TTCGGTGTGCGGCGCGCACATCCAGGCGGTGATGCTGGAGCAGGCCGAGATCGAGCCGGG	373		
Query 361	GATGCGGGTTCTGGAGATCGGTTCCGGTGGGTACAACGCGGCGCTGATCGCGGAGCTGGT	420		
Sbjct 374	GATGCGGGTTCTGGAGATCGGTTCCGGTGGGTACAACGCGGCGCTGATCGCGGAGCTGGT	433		
Query 421	TGCCCCGACGGGTGCGGTGACGTCGGTGGACATCGACCCGAGATCGTCGTCGGGCCCG	480		
Sbjct 434	CGCCCCGACGGGTGCGGTGACGTCGGTGGACATCGACCCGAGATCGTCGTCGGGCCCG	493		
Query 481	CGCCTGCTTGACAGCCGCGGCTACGACCGGGTGCGGGTCGTGCAGGCCGACGCCGAATA	540		
Sbjct 494	CGCCTGCTTGACAGCCGCGGCTACGACCGGGTGCGGGTCGTGCAGGCCGACGCCGAATA	553		
Query 541	CGGTGTACCGGAGCAGGCACCGTACGACCGGATCATCGTCACGGTCGGAGCGTGGGACAT	600		
Sbjct 554	CGGTGTACCGGAGCAGGCACCGTACGACCGGATCATCGTCACGGTCGGAGCGTGGGACAT	613		
Query 601	CCCACCGGCTTGGATCGCCAACTGTCCGAACACGGCCGGATCGTGGTGCCACTGCGGTT	660		
Sbjct 614	CCCACCGGCTTGGATCGCCAACTGTCCGAACACGGCCGGATCGTGGTGCCACTGCGGTT	673		
Query 661	CGCCGGCCTGTCCCGCTGCGTCGCCTTCGACCTGGCCGAAGGGCGCCTCGTCAGTCACAG	720		
Sbjct 674	CGCCGGCCTGTCCCGCTGCGTCGCCTTCGACCTGGCCGAAGGGCGCCTCGTCAGTCACAG	733		
Query 721	CTACTGCCTCGGCGGGTTCGTGCCGATGCAGGGCGCGGGCACGTACTCCGAGACGCTGGT	780		
Sbjct 734	CTACTGCCTCGGCGGGTTCGTGCCGATGCAGGGCGCGGGCACGTACTCCGAGACGCTGGT	793		
Query 781	GCCGATCAACGGCGAGGCGACGCTGCGTATGGACGGGCGGACCCGGGCTTCGACGTGCC	840		
Sbjct 794	GCCGATCAACGGCGAGGCGACGCTGCGTATGGACGGGCGGACCCGGGCTTCGACGTGCC	853		
Query 841	GGCCCTACGTAAGGCGGTCCACGCACCGAGGATCGAGCGGTGGTCCGGGGCGGCGTTTCCA	900		
Sbjct 854	GGCCCTACGTAAGGCGGTCCACGCACCGAGGATCGAGCGGTGGTCCGGGGCGGCGTTTCCA	913		
Query 901	CATGCCCCGACGAGCTGGAGTTGTTCTGGTGGTACCAGCGCGTCCCACGTGCCCTTCTCTGTA	960		
Sbjct 914	CATGCCCCGACGAGCTGGAGTTGTTCTGGTGGTACCAGCGCGTCCCACGTGCCCTTCTCTGTA	973		
Query 961	CGCGAGCCAGCAGTTGGTGGACAGGGCGTGTTCAGCCCGCGGTGATCTACGGC-ACGG	1019		
Sbjct 974	CGCGAGCCAGCAGTTGGTGGACAGGGCGTGTTCAGCCCGGNGTGACCTACGGCCACGG	1033		
Query 1020	CT	1021		
Sbjct 1034	CT	1035		

Histag



Inicio del gen



Figura 20. Alineamiento de la secuencia teórica del vector pRSFC.S-Met con la secuencia obtenida en la construcción de la colonia 2 utilizando el oligonucleótido ACYCDuetUP1. Query: pRSFC.S-Met teórica; Subjet: pRSFC.S-Met de la colonia 2. Los rectángulos indican posibles mutaciones en la secuencia experimental.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1775 bits(961)	0.0	1010/1032(98%)	13/1032(1%)	Plus/Minus
Query 290	ACGGCGCTCA-GTTCGGT-GTCGGCGG-CG-CACAT-CCA-GGCGGTGA-TGCTGGAGCA	342		
Sbjct 1032	ACGCCGNTCAGGTTTCGGTNTTGGGCGGCGCCACATCCAGGGCGGTGATTGCTGGAGCA	973		
Query 343	GGCCGAGATCGAGCC-GGGGATGCGG-G-TTCTGG-AGATCGGTTCCGGTGGGTACAACG	398		
Sbjct 972	GGCCGAGATCGAGCCGGGGATGCGGAGTTTNTGGAAGATCGTTTCGGGTGGGTACAACG	913		
Query 399	CGGCGCTGATCGCGGAGCTGG-TGGCCCGCAGGGTGCGGTGACGTCCGGTGGACATCGAC	457		
Sbjct 912	CGGCGCTGATCGCGGAGCTGGGTCGGCCCGCAGGGTGCGGTGACGTCCGGTGGACATCGAC	853		
Query 458	CC-GGAGATCGTCGCTCGGGCCCGCCCTGCTTGCAGACCGCCGGCTACGACCGGGTGCG	516		
Sbjct 852	CCCGGAGATCGTCGCTCGGGCCCGCCCTGCTTGCAGACCGCCGGCTACGACCGGGTGCG	793		
Query 517	GGTCGTGCAGGCCGACGCCAATACGGTGTACCGGAGCAGGCACCGTACGACCGGATCAT	576		
Sbjct 792	GGTCGTGCAGGCCGACGCCAATACGGTGTACCGGAGCAGGCACCGTACGACCGGATCAT	733		
Query 577	CGTCACGGTCGGAGCGTGGGACATCCACCAGCTTGGATCGCCAACTGTCCGAACACGG	636		
Sbjct 732	CGTCACGGTCGGAGCGTGGGACGTCCACCAGCTTGGATCGCCAACTGTCCGAACACGG	673		
Query 637	CCGGATCGTGGTGCCACTGCGGTTCCGGCCGTGCCGCTGCGTCCGCTTCCGACCTGGC	696		
Sbjct 672	CCGGATCGTGGTGCCACTGCGGTTCCGGCCGTGCCGCTGCGTCCGCTTCCGACCTGGC	613		
Query 697	CGAAGGGCGCCTCGTCAGTCACAGCTACTGCCTCGGCGGTTTCGTGCCGATGCAGGGCGC	756		
Sbjct 612	CGAAGGGCGCCTCGTCAGTCACAGCTACTGCCTCGGCGGTTTCGTGCCGATGCAGGGCGC	553		
Query 757	GGGCACGTACTCCGAGACGCTGGTGCAGTCAACGGCGAGGGCAGCGTCCGATGGACGG	816		
Sbjct 552	GGGCACGTACTCCGAGACGCTGGTGCAGTCAACGGCGAGGGCAGCGTCCGATGGACGG	493		
Query 817	GCCGGACCCGGGTTTCGACGTGCCGGCCCTACGTAAGGCGGTCCACGCACCGAGGATCGA	876		
Sbjct 492	GCCGGACCCGGGTTTCGACGTGCCGGCCCTACGTAAGGCGGTCCACGCACCGAGGATCGA	433		
Query 877	GCGGTGGTCCGGGGCGGCTTCGACATGCCCGACGAGCTGGAGTTGTTTCGTGGTGACCAG	936		
Sbjct 432	GCGGTGGTCCGGGGCGGCTTCGACATGCCCGACGAGCTGGAGTTGTTTCGTGGTGACCAG	373		
Query 937	CGCGTCCCACGTGCCCTTCTGTACGCGAGCCAGCAGTTGGTGGACCAGGGCGTGTTCAG	996		
Sbjct 372	CGCGTCCCACGTGCCCTTCTGTACGCGAGCCAGCAGTTGGTGGACCAGGGCGTGTTCAG	313		
Query 997	CCCGGCGGTGATCTACGGCACGGCTGCCGTGGTTCGAGGGCGGAGTTTCGCTACCGGAC	1056		
Sbjct 312	CCCGGCGGTGACCTACGGCACGGCTGCCGTGGTTCGAGGGCGGAGTTTCGCTACCGGAC	253		
Query 1057	GAAACGCGAGAACGAGGGCCTCGGCGGATGGGAGAGCGGTGTCTACGCCACGGCCCGCA	1116		
Sbjct 252	GAAACGCGAGAACGAGGGCCTCGGCGGATGGGAGAGCGGTGTCTACGCCACGGCCCGCA	193		
Query 1117	GGCCGAGGGCGTCCGTGACAGGTATGTCGGGCTGTTGCGCCGCTGGGCGGCGGACTTCCG	1176		
Sbjct 192	GGCCGAGGGCGTCCGTGACAGGTATGTCGGGCTGTTGCGCCGCTGGGCGGCGGACTTCCG	133		
Query 1177	CCGTCGCGGGGCCGCGCGGATCGAGTACCTGCCACACGCGCAGGCGTCCGGACGGCTG	1236		
Sbjct 132	CCGTCGCGGGGCCGCGCGGATCGAGTACCTGCCACACGCGCAGGCGTCCGGACGGCTG	73		
Query 1237	GTACGTGCCGAAGCGCCACGGCGCCGTCCGGTGTCTGGCGCTGAAAGCTTCCGGCCCGC	1296		
Sbjct 72	GTACGTGCCGAAGCGCCACGGCGCCGTCCGGTGTCTGGCGCTGAAAGCTTCCGGCCCGC	13		
Query 1297	ATAATGCTTAAG 1308			
Sbjct 12	ATAATGCTTAAG 1			

Figura 21. Alineamiento de la secuencia teórica del vector pRSFC.S-Met con la secuencia obtenida en la construcción de la colonia 2 utilizando el oligonucleótido DuetDOWN1. Query: pRSFC.S-Met teórica; Subjet: pRSFC.S-Met de la colonia 2.

Los rectángulos azules muestran nucleótidos intercambiados por errores de la secuenciación, mientras que los rectángulos rojos confirman mutaciones en el gen.

En la secuenciación de la colonia 1 utilizando el oligonucleótido ACYCDuetUP1 (Ver Figura 18), se obtuvo una identidad de 99% con 0% de huecos (2/1028) al realizar el alineamiento. Este resultado muestra que la secuencia teórica y experimental hacen referencia al mismo gen. En el nucleótido 1005 y 952 de la secuencia teórica (Query) se observa que no hay alineamiento con la secuencia experimental de la colonia 1 (marcadas con recuadros azules); sin embargo, estos nucleótidos se encuentran en la última parte de la secuenciación. Es importante mencionar que el oligonucleótido ACYCDuetUP1 permite analizar la región 5' del gen, de manera que es menos confiable el resultado cuando la secuenciación se acerca a la región 3'. Este fenómeno ocurre frecuentemente debido a que la polimerasa pierde especificidad unos momentos antes de concluir el análisis.

Considerando que la falta de alineamiento es resultado de una lectura errónea de la polimerasa y no de una mutación en la secuencia experimental, se llevó a cabo el análisis de la secuenciación obtenida utilizando el oligonucleótido DuetDOWN1 como cebador, el cual permite obtener un mejor resultado de la región 3' del gen (Ver Figura 19). El resultado del alineamiento muestra una identidad de 99% y 0% de huecos (3/1041) lo cual es consistente con el resultado obtenido de la secuenciación con ACYCDuetUP1. En cuanto a las modificaciones en la secuencia, los nucleótidos 1005 y 952 previamente descritos como posibles mutaciones del gen, se encuentran correctamente alineados en esta secuenciación (indicados en recuadros azules). Por otro lado, los nucleótidos mal alineados al inicio de esta secuenciación se encuentran correctamente alineados en el análisis de la región 5'

del gen. Ante estos resultados podemos decir que la colonia 1 fue transformada con la construcción pRSFC.S-Met y que el gen clonado no presenta ninguna mutación.

El mismo análisis se llevó a cabo para la construcción de la colonia 2; sin embargo, se encontraron más inconsistencias en sus alineamientos. Es decir, en el alineamiento de la secuenciación obtenida utilizando el oligonucleótido ACYCDuetUP1 (Ver Figura 20) se observa que los nucleótidos correspondientes a la secuencia teórica de pRSFC.S-Met; 421, 599, 1001, 1002, 1007 y 1015, no se alinean con la secuencia experimental (marcados con recuadros). Considerando nuevamente que estas lecturas pueden ser un error de la polimerasa y no mutaciones dentro de la secuencia, se estudió la secuenciación obtenida con el oligonucleótido DuetDOWN1 (Ver Figura 21) y se observó que 3 de estos nucleótidos se encuentran alineados correctamente (marcados con recuadros azules). Los nucleótidos 421, 599 y 1007 de la secuencia teórica (marcado con un recuadro rojo) no se alinean en ninguna de las dos secuenciaciones obtenidas, de manera que es posible confirmar la aparición de mutaciones; dos por intercambio de una citosina por timina en las posiciones 421 y 1007, y un cambio de guanina por adenina en la posición 599.

Todos los nucleótidos no alineados al principio del alineamiento utilizando la secuenciación con el oligonucleótido DuetDOWN1 de la construcción en la colonia 2 (Ver Figura 21), se encuentran correctamente alineados en la secuenciación con el oligo ACYCDuetUP1, de manera que 3 nucleótidos fueron mutados en el gen de interés. La mutación del nucleótido 421 genera un cambio del codón GTT por GTC; sin embargo, esta mutación es silenciosa debido a que ambos codones codifican para una valina, lo cual no afecta en la secuencia de la proteína.

Para las otras dos mutaciones no se tuvo la misma suerte; el nucleótido en la posición 1007 genera un cambio en el codón ATC (que codifica para isoleucina) por un ACC (que codifican para treonina), mientras que en la posición 599 se lleva a cabo un cambio del codón CAT (que codifica para histidina) por un CGT (que codifica para arginina), de manera que ambas mutaciones generan un cambio en la secuencia primaria de la proteína.

## Expresión del clúster biosintético completo

Para lograr la expresión del grupo completo de genes se llevó a cabo la transformación de una cepa de *E. coli* BL21 star con el plásmido pETDuetAB y la nueva construcción pRSFC.S-Met de la colonia 1. Se escogieron 7 de las colonias candidatas y se indujo su expresión con IPTG 1 mM. El producto de esa expresión se corrió en dos geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) para tener dos geles duplicados. Los resultados obtenidos después de teñir uno de ellos con azul de Coomassie se muestran en la Figura 22 y se sugiere que las enzimas biosintéticas LanB y LanC se están expresando, siendo la colonia 5 la mejor en llevar a cabo la expresión.

Con el otro gel obtenido fue posible continuar con la técnica Western Blot (Ver Figura 23). Los resultados obtenidos sugieren que LanA y la metiltransferasa se están expresando, nuevamente la colonia 5 parece ser la mejor en llevar a cabo la expresión.

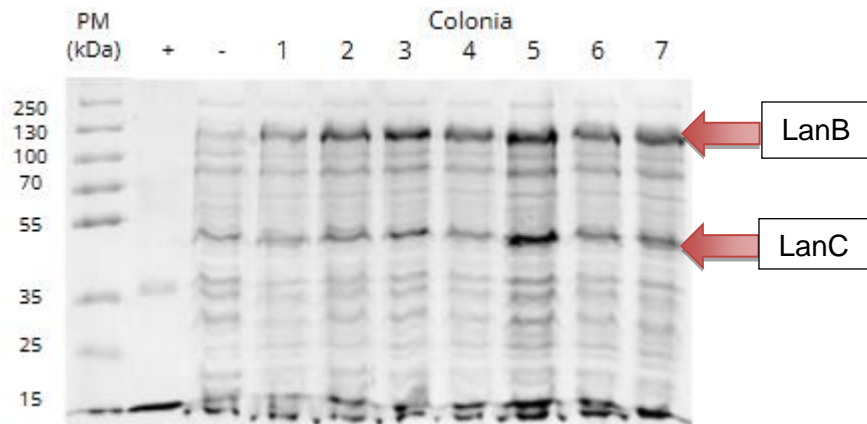


Figura 22. Expresión del LanB y LanC en *E. coli* BL21. El análisis se llevó a cabo en un gel de poliacrilamida 10% en condiciones desnaturizantes teñido con azul de Coomassie. Carril 1: marcador de peso molecular “thermo protein ladder”; Carril 2: control positivo con la proteína alfa cristalina de *Mycobacterium tuberculosis* acoplada a un histag; Carril 3: control negativo de *E. coli* BL21 star con plásmidos vacíos; del carril 4 al 10 se agregó el extracto de 7 colonias candidatas con los plásmidos pETDuetAB y pRSFC.S-Met inducidas con IPTG 1 mM.

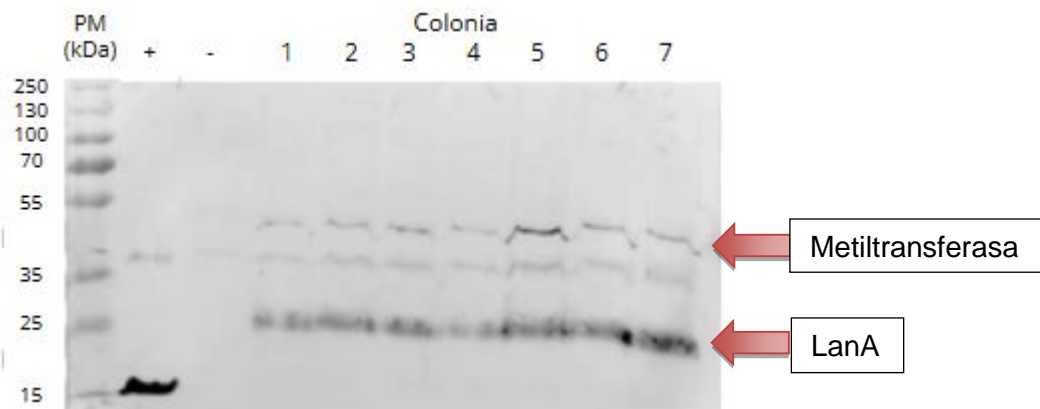


Figura 23. Western blot para la detección de LanA y metiltransferasa expresadas en *E. coli* BL21. Carril 1: marcador de peso molecular “thermo protein ladder”; Carril 2: control positivo con la proteína alfa cristalina de *Mycobacterium tuberculosis* acoplada a un histag; Carril 3: control negativo de *E. coli* BL21 star con plásmidos vacíos; del carril 4 al 10 se agregó el extracto de 7 colonias candidatas con los plásmidos pETDuetAB y pRSFC.S-Met inducidas con IPTG 1 mM.

La aparición de una banda en el control positivo (correspondiente al Histag) nos permite estar seguros de que los anticuerpos reconocen la etiqueta de interés y que la metodología utilizada nos brinda resultados confiables.



# DISCUSIÓN

El análisis del genoma de *Micromonospora echinospora* permitió identificar la presencia de un grupo de genes biosintéticos que permiten la síntesis de un lantipéptido de clase I en la región 7 del genoma bacteriano. Sin embargo, no es el único clúster que llamó la atención durante el análisis; dentro del genoma se encontraron clústeres que permiten sintetizar diferentes metabolitos secundarios; como policétidos, terpenos, RiPPs y péptidos no ribosomales (NRPs). Uno de particular interés fue la gentamicina (región 8), el cual había sido aislado previamente de *Micromonospora echinospora* y es un antibiótico aminoglucósido con potente actividad contra bacterias Gram-negativas (Appel & Neu, 1978). Actualmente se encuentra en el mercado en diferentes presentaciones farmacéuticas y es administrado en seres humanos para combatir diversas infecciones. Estos resultados me permiten sugerir que *Micromonospora echinospora* es un productor de compuestos con potencial utilidad en la medicina moderna, siendo así, que el lantipéptido de interés en este trabajo es prometedor para el descubrimiento de un nuevo compuesto con actividad bactericida.

A partir de los resultados obtenidos de AntiSMASH fue posible analizar la secuencia de aminoácidos que darían lugar a la enzima metiltransferasa. Al utilizar la herramienta ExPasy se determinaron algunas propiedades fisicoquímicas teóricas de la enzima; entre ellas un índice alifático de 90.78%. El índice se obtiene a partir de las cadenas laterales de aminoácidos alifáticos presentes en la secuencia (Ikai, 1980). El alto índice obtenido nos permite sugerir que la enzima metiltransferasa es altamente termoestable (Barreto *et al.*, 2012; Ikai, 1980). Por otro lado, se obtuvo un punto isoeléctrico teórico de 5.12, lo cual indica que la enzima tiene carácter ácido.

Cuando la enzima se encuentra a un pH arriba de 5.12 obtiene una carga neta negativa; si el pH es menor a 5.12 presenta una carga positiva.

Paso seguido, se llevó a cabo un alineamiento múltiple con la secuencia de aminoácidos de diferentes enzimas metiltransferasas involucradas en la síntesis de lantipéptidos de clase I. La secuencia de aminoácidos de las enzimas fue comparada con la secuencia de aminoácidos de la metiltransferasa presente en *M. echinospora*, así se determinó que las secuencias pertenecientes al género *Micromonospora* presentan una identidad mayor del 95%, es decir, las secuencias de aminoácidos son prácticamente las mismas a la secuencia de *M. echinospora*. Por otro lado, la metiltransferasa de *Streptomyces olivaceus* tiene una identidad de 34.84%, lo que la convierte en la enzima con la identidad más baja en comparación con las demás. Sin embargo, se sabe que dos secuencias son homólogas cuando su identidad está por encima del 30% en toda su longitud (Pearson, 2013; Schwarzenbacher *et al.*, 2004), de manera que los alineamientos llevados a cabo nos indican que existe homología entre la metiltransferasa de nuestro interés con respecto a las demás enzimas. Esto sugiere que vienen de un ancestro en común y que posiblemente realizan una misma función. De ser así, dicha actividad podría coincidir con la actividad encontrada en la metiltransferasa de *S. olivaceus*, la cual modifica un residuo aspartato a isoaspartato (Acedo *et al.*, 2019).

En la Figura 11 se observa el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las enzimas previamente descritas. En recuadros rojos se encuentran encerrados los residuos de particular interés, los cuales se muestran altamente conservados. Actualmente no se conocen los aminoácidos responsables de la actividad de este tipo de enzimas, sin embargo, estos residuos podrían estar involucrados en la

misma. Posteriores análisis como la mutagénesis de estos residuos podrían elucidar la importancia de estos aminoácidos en la actividad catalítica de la enzima metiltransferasa.

En cuanto a la amplificación del gen de interés; los oligonucleótidos están diseñados con una determinada cantidad de GC en su estructura, a partir de esta propiedad es que se les asocia una temperatura de fusión ( $T_m$ ). La importancia de la  $T_m$  radica en la estrecha relación con la temperatura de alineamiento, la cual es indispensable para llevar a cabo una PCR exitosa. Se ha utilizado el DMSO en reacciones de PCR como un agente desnaturizante que reduce las estructuras secundarias del DNA y favorece la amplificación de regiones con una alta cantidad de GC (Espinosa, 2007). Como se muestra en la Tabla 2, los oligonucleótidos cuentan con un valor elevado de  $T_m$  debido al alto contenido de GC en su secuencia, lo cual podría dificultar la amplificación del gen. Para evitar este problema se agregó DMSO a las reacciones y los resultados mostraron que el gen de interés fue amplificado con éxito bajo estas condiciones.

Continuando con el proceso de clonación, las enzimas de restricción utilizadas para llevar a cabo la digestión del vector y del inserto fueron *EcoRI* y *HindIII*, las cuáles son enzimas con la capacidad de formar cortes cohesivos; estos cortes generan cadenas simples de DNA en los extremos de los fragmentos, los cuales tienen complementariedad y pueden asociarse entre sí mediante apareamiento de bases (Echenique *et al.*, 2004). Se utilizaron dos enzimas de restricción diferentes para cortar el vector, de manera que el producto digerido tiene en sus extremos diferentes secuencias de DNA. La falta de complementariedad de los extremos imposibilita el proceso de circularización del vector y facilita la adición del inserto en la dirección

correcta (González & Bueno, 2013). Prueba de esto es que el gen anexo a la construcción pRSFC.S se colocó en la dirección deseada de acuerdo con los resultados de la secuenciación.

Para la expresión de las proteínas, se llevó a cabo la transformación de una cepa de expresión con los vectores pRSFC.S-Met y pETDuetAB, de manera que se esperaba que las colonias transformantes con ambos vectores expresen LanA, LanB, LanC y metiltransferasa. Para identificar las proteínas de interés en los extractos de las colonias candidatas se realizó la técnica SDS-PAGE (electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida), la cual permite separar proteínas utilizando un campo eléctrico. Una característica de este tipo de electroforesis es la participación de un detergente como SDS, el cuál desnaturaliza las proteínas y las enmascara completamente de una carga negativa. Esta propiedad favorece la separación de las proteínas únicamente en función de su masa molecular (Maldonado & Jorin-Novo, 2001).

El gel de poliacrilamida mostrado en la Figura 22 fue teñido utilizando azul de Coomassie, el cuál es un colorante que permite teñir proteínas de manera inespecífica. Utilizando el programa Expasy (<https://web.expasy.org/protparam/>) se pudo determinar la masa molecular de LanA, LanB y LanC, las cuales corresponden a 7.33 kDa, 109.8 kDa y 42.9 kDa, respectivamente. LanB y LanC se identificaron en el gel teñido con azul de Coomassie debido a que, a diferencia del control negativo, se observa un aumento en el tamaño de las bandas que se encuentran cerca de los 55 kDa y 130 kDa (ambas señaladas con flechas rojas). Es importante destacar que se observa un aumento notorio en el tamaño de las bandas correspondientes al extracto de la colonia 5, lo cual sugiere que esta colonia lleva a cabo una mejor

expresión de ambas enzimas. El control positivo no se puede considerar en este experimento; sin embargo, es de utilidad para el Western Blot.

En la Figura 23 se observa el resultado de una membrana obtenida a partir de la técnica de Western Blot, en la cual se transfirieron las proteínas de interés previamente separadas con un gel desnaturizante. Esta técnica permite la inmunodetección de proteínas específicas en homogeneizados celulares (Taylor & Posch, 2014). La metiltransferasa y el péptido LanA fueron expresados con una etiqueta de histidinas (His Tag) acoplada en la región N-terminal de su estructura proteica. Esta etiqueta puede ser identificada mediante un ensayo colorimétrico en donde la etiqueta es reconocida por un anticuerpo primario Anti-His, el cuál posteriormente es reconocido por un anticuerpo secundario que tiene acoplada una enzima peroxidasa. Esta enzima cataliza una reacción con su sustrato permitiendo la formación de luz y la observación de bandas a simple vista; de manera que, si ambas proteínas se expresan, podrán ser identificadas utilizando el método anterior. En la Figura 23 se observa la formación de bandas en todas las colonias candidatas, lo cual sugiere la presencia de proteínas acopladas a la etiqueta His tag; una de estas bandas se observa entre la región de los 35 y 55 kDa, la cual sugiere la presencia de la enzima metiltransferasa (posee una masa molecular de 41.39 kDa). Una segunda banda se observa ligeramente sobre la región de 35 kDa; sin embargo, se descartó que pudiera tratarse de la enzima metiltransferasa debido a que es una banda que se observa en el control positivo y ligeramente en el control negativo, lo cual nos permite inferir que se trata de una proteína ajena a las de interés debido a que ninguno de los controles contiene los plásmidos que permiten la síntesis de las proteínas en estudio. Estas bandas pueden ser el resultado de una inespecificidad ocasionada por una mala realización del bloqueo durante el método,

el cual evita el reconocimiento inespecífico de proteínas al restringir los espacios de la membrana que no fueron ocupados (Kurien & Scofield, 2006).

En cuanto a la expresión de LanA, se esperaría encontrar una banda por debajo de los 15 kDa; sin embargo, no ocurre esto y se observa una banda cerca de los 25 kDa. Podríamos considerar que no es LanA y que el anticuerpo reconoció otra proteína de manera inespecífica; pero para nuestra sorpresa, esta banda no se observa en el control negativo, lo cual nos permite deducir que es una proteína sintetizada solamente en colonias transformantes con ambos plásmidos.

En el año 2020 se publicó un estudio en donde se llevaron a cabo pruebas de confiabilidad de diferentes marcadores de peso molecular con estándares de proteínas preteñidas. Se dieron cuenta que estos estándares mostraron pesos moleculares más altos de lo esperado. Muchos marcadores de peso molecular con proteínas preteñidas utilizan tintes que “tiñen” las proteínas uniéndose covalentemente sus grupos vinilo a aminos, alcohol y sulfhidrilo. Este tipo de tintes podría disminuir la electromovilidad de las proteínas, mostrando diferentes distancias de resolución durante la electroforesis en comparación con las proteínas no teñidas; de manera que un cambio en la electromovilidad de las proteínas puede cambiar la resolución de una banda que se utiliza como parte de un estándar (Neris *et al.*, 2020). En nuestro experimento utilizamos un marcador de pesos moleculares con proteínas estándar preteñidas de la marca Thermo Scientific “PageRuler Plus” de 10 a 250 kDa. Siendo así que posiblemente el marcador de pesos moleculares no corrió de manera adecuada y es por eso que apreciamos al péptido LanA de un tamaño más grande al real.

Con estos resultados se puede sugerir que la enzima metiltransferasa y el péptido LanA se están expresando dentro de la cepa. Es importante mencionar que también en la colonia 5 se observa una mayor expresión de los péptidos de interés, lo que nos permite aseverar que la colonia 5 es la más adecuada para continuar con análisis posteriores de la expresión del grupo de genes.

# CONCLUSIONES

*Micromonospora echinospora* es una bacteria con capacidad potencial para la producción de lantipéptidos que posee un clúster de genes biosintéticos en la región 7 de su cromosoma bacteriano que codifica para este tipo de antibióticos. A partir de su DNA genómico se logró la construcción pRSFC.S-Met utilizando técnicas de biología molecular, en donde se clonó el gen que codifica una enzima metiltransferasa sin mutación alguna.

Por otro lado, las técnicas de Biología Molecular también permitieron detectar la expresión de las proteínas de interés (LanA, LanB, LanC y metiltransferasa), sintetizadas a partir de un sistema heterólogo en donde *E. coli* BL21 star funciona como hospedero y productor de las proteínas de interés.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acedo, J. Z., Bothwell, I. R., An, L., Truth, 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.
- Appel, G. B., & Neu, H. C. (1978). Gentamicin in 1978. *Annals of Internal Medicine*, *89*(4), 528-538.
- 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. T., Rebuffat, S., Ross, R. P., Sahl, H., Schmidt, E. W., Selsted, M. E., Severinov, K., Shen, B., Sivonen, K., Smith, L., Stein, T., Süssmuth, R. D., Tagg, J. R., Tang, G., 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.
- Alanis, A. J. (2005). Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era?. *Archives of Medical Research*, *36*(6), 697-705.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Meier-Kolthoff, J. P., Klenk, H. P., Clément, C., Ouhdouch, Y., & van Wezel, G. P. (2015). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, *80*(1), 1-43.
- Barreto, L. V., Barreto, G. E., Morales, L., Acevedo, O. E., & González Santos, J. (2012). Proteína LIC10494 de *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni:

- modelo estructural y regiones funcionales asociadas. *Universitas Scientiarum*, 17(1), 16-27.
- Bierbaum, G., & Sahl, H. G. (2009). Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10(1), 2-18.
- Bimboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513–1523.
- Carro, L., Nouioui, I., Sangal, V., Meier-Kolthoff, J. P., Trujillo, M. E., Montero-Calasanz, M. D. C., Sahin, N., Smith, D. L., Kim, K. E., Peluso, P., Deshpande, S., Woyke, T., Shapiro, N., Kyrpides, N. C., Klenk, H. P., Göker, M., & Goodfellow, M. (2018). Genome-based classification of micromonosporae with a focus on their biotechnological and ecological potential. *Scientific Reports*, 8(1), 525.
- 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.
- 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.
- Cruz, J. C., Iorio, M., Monciardini, P., Simone, M., Brunati, C., Gaspari, E., Maffioli, S. I., Wellington, E., Sosio, M., & Donadio, S. (2015). Brominated Variant of the Lantibiotic NAI-107 with Enhanced Antibacterial Potency. *Journal of Natural Products*, 78(11), 2642-2647.
- Dadgostar, P. (2019). Antimicrobial resistance: Implications and costs. *Infection and Drug Resistance*, 12, 3903–3910
- 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.
- Echenique, V., Rubinstein, C., Mroginski, L., Levitus, G., & Hopp, E. (2004). Biotecnología y mejoramiento vegetal II. *Ediciones INTA*. Argentina

- Espinosa, A. L. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. En: L. E. Eguiarte, V. Souza y X. Aguirre (ed.) *Ecología Molecular*. INE, CONABIO y UNAM, 517-540.
- 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*, 107(30), 13461-13466.
- Frieri, M., Kumar, K., & Boutin, A. (2017). Antibiotic resistance. *Journal of Infection and Public Health*, 10(4), 369-378.
- Funk, M. A., & Van Der Donk, W. A. (2017). Ribosomal natural products, tailored to fit. *Accounts of Chemical Research*, 50(7), 1577-1586.
- González Cuevas J, & Bueno Topete M (2013). Enzimas de restricción. Salazar Montes A, & Sandoval Rodríguez A, & Armendáriz Borunda J (Eds.), *Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. McGrawHill.  
<https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1473&sectionid=102743841>
- Grigoreva, A., Andreeva, J., Bikmetov, D., Rusanova, A., Serebryakova, M., Garcia, A. H., Slonova, D., Nair, S. K., Lippens, G., Severinov, K., & Dubiley, S. (2021). Identification and characterization of andalusicin: N-terminally dimethylated class III lantibiotic from *Bacillus thuringiensis* sv. *andalousiensis*. *iScience*, 24(5), 102480.
- Huo, L., Zhao, X., Acedo, J. Z., Estrada, P., Nair, S. K., & van der Donk, W. A. (2020). Characterization of a dehydratase and methyltransferase in the biosynthesis of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides in *Lachnospiraceae*. *ChemBioChem*, 21(1-2), 190-199.
- Ikai, A. (1980). Thermostability and aliphatic index of globular proteins. *The Journal of Biochemistry*, 88(6), 1895-1898.
- Jiang, X., Zhang, Q., Zhu, Y., Nie, F., Wu, Z., Yang, C., Zhang, L., Tian, X., & Zhang, C. (2017). Isolation, structure elucidation and biosynthesis of benzo [b] fluorene nenestatin A from deep-sea derived *Micromonospora echinospora* SCSIO 04089. *Tetrahedron*, 73(26), 3585-3590.
- Jung, G. (1991). Lantibiotics: ribosomally synthesized biologically active polypeptides containing sulfide bridges and a, b didehydroamino acids. *Angewandte Chemie International Edition*. 30, 1051-1068.

- Knerr, P. J., & Van Der Donk, W. A. (2012). Discovery, biosynthesis, and engineering of lantipeptides. *Annual Review of Biochemistry*, 81, 479-505.
- Koponen, O., Tolonen, M., Qiao, M., Wahlström, G., Helin, J., & Saris, P. E. (2002). NisB is required for the dehydration and NisC for the lanthionine formation in the post-translational modification of nisin. *Microbiology*, 148(11), 3561-3568.
- Kurien, B. T., & Scofield, R. H. (2006). Western blotting. *Methods*, 38(4), 283-293.
- Lin, Y., Teng, K., Huan, L., & Zhong, J. (2011). Dissection of the bridging pattern of bovicin HJ50, a lantibiotic containing a characteristic disulfide bridge. *Microbiological Research*, 166(3), 146-154.
- Luedemann, G. (1970). *Micromonospora* taxonomy. *Advances in Applied Microbiology*, 11, 101-133.
- Maldonado-Alconada, A. M., & Jorriñ-Novoa, J. V. (2001). Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida. Análisis de proteínas de hojas de *Arabidopsis thaliana*. Dep. Bioquim. y Biol. Mol. Campus Univ. Rabanales, 1-16.
- McAuliffe, O., Ross, R. P., & Hill, C. (2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(3), 285-308.
- Montalbán-López, M., Deng, J., Van Heel, A. J., & Kuipers, O. P. (2018). Specificity and application of the lantibiotic protease NisP. *Frontiers in Microbiology*, 9, 160.
- Nagao, J. I., Harada, Y., Shioya, K., Aso, Y., Zendo, T., Nakayama, J., & Sonomoto, K. (2005). Lanthionine introduction into nukacin ISK-1 prepeptide by co-expression with modification enzyme NukM in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 336(2), 507-513.
- Negash, A. W., & Tsehai, B. A. (2020). Current applications of bacteriocin. *International Journal of Microbiology*, 2020, 1–7.
- Neris, R. L. S., Kaur, A., & Gomes, A. V. (2020). Incorrect molecular weights due to inaccurate prestained protein molecular weight markers that are used for gel electrophoresis and western blotting. *BioRxiv*, 2020-04
- Nicolau, C. J., & Oliver, A. (2010). Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28, 19-28.
- Obregón, A. M., González, R., Escalante, L. and Sánchez, S. (1994). Physiological studies on gentamicin: Phosphate repression of antibiotic formation. *The Journal of Antibiotics*, 47: 1442-1446, 1994

- Ongey, E. L., & Neubauer, P. (2016). Lanthipeptides: chemical synthesis versus in vivo biosynthesis as tools for pharmaceutical production. *Microbial Cell Factories*, 15, 1-16
- Oppedijk, S. F., Martin, N. I., & Breukink, E. (2016). Hit 'em where it hurts: The growing and structurally diverse family of peptides that target lipid-II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1858(5), 947–957.
- Parisot, J., Carey, S., Breukink, E., Chan, W. C., Narbad, A., & Bonev, B. (2007). Molecular mechanism of target recognition by subtilin, a class I lanthionine antibiotic. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(2), 612-618.
- Pearson, W. R. (2013). An introduction to sequence similarity (“homology”) searching. *Current Protocols in Bioinformatics*, 42(1), 3-1.
- Peschel, A., Augustin, J., Kupke, T., Stevanovic, S., & Götz, F. (1993). Regulation of epidermin biosynthetic genes by EpiQ. *Molecular Microbiology*, 9(1), 31-39.
- Quiñones, P. D. (2017). Resistencia antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque "Una salud". *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 69(3), 1-17.
- Ratti, R., & Sousa, C. (2009). *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) e infecções nosocomiais. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 30(2), 137-143.
- 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.
- Riley, M. A., & Wertz, J. E. (2002). Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annual Reviews in Microbiology*, 56(1), 117-137.
- Sánchez-Martín, M. A., Salgado-Calvo, M. T., San-Miguel-Hernández, Á., Pachón-Julián, J., Rodríguez-Barbero, E., Pastor-Martín, M. R., & Cabrero-Lobato, P. (2019). Nisina (N 234), aditivo utilizado como conservante en alimentos. *Gaceta Médica de Bilbao*, 116(4), 166-173.
- Schwarzenbacher, R., Godzik, A., Grzechnik, S. K., & Jaroszewski, L. (2004). The importance of alignment accuracy for molecular replacement. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 60(7), 1229-1236.
- Song, H., Xu, R., & Guo, Z. (2015). Identification and characterization of a methionine  $\gamma$ -lyase in the calicheamicin biosynthetic cluster of *Micromonospora echinospora*. *Chembiochem*, 16(1), 100-109.

- Takano, H., Matsui, Y., Nomura, J., Fujimoto, M., Katsumata, N., Koyama, T., Mizuno, I., Amano, S., Shiratori-Takano, H., Komatsu, M., Ikeda, H., & Ueda, K. (2017). High production of a class III lanthipeptide AmfS in *Streptomyces griseus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 81(1), 153–164.
- Taylor, S. C., & Posch, A. (2014). The design of a quantitative western blot experiment. *BioMed Research International*, 2014, 1-8.
- Torres-Beltrán, M., Cardoso-Martínez, F., Millán-Aguiñaga, N., Becerril-Espinosa, A., & Soria-Mercado, I. E. (2012). Evaluation of the Gulf of California as a potential source of bioactive marine actinobacteria. *Ciencias Marinas*, 38(4), 609-624.
- Unwin, J., Standage, S., Alexander, D., Hosted Jr, T., Horan, A. C., & Wellington, E. M. (2004). Gene cluster in *Micromonospora echinospora* ATCC15835 for the biosynthesis of the gentamicin C complex. *The Journal of Antibiotics*, 57(7), 436-445.
- Ventola, C.L., (2015). The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. *Pharmacy and Therapeutics*. 40(4), 277- 283.
- Wagman, G. H. (1980). Antibiotics from *Micromonospora*. *Annual Reviews in Microbiology*, 34(1), 537-558.
- World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. 2017. [http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short\\_Summary\\_25Feb-ET\\_NM\\_WHO.pdf](http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf)
- Xu, M., Zhang, F., Cheng, Z., Bashiri, G., Wang, J., Hong, J., Wang, Y., Xu, L., Chen, X., Huang, S. X., Lin, S., Deng, Z., & Tao, M. (2020). Functional Genome Mining Reveals a Class V Lanthipeptide Containing a d-Amino Acid Introduced by an F<sub>420</sub> H<sub>2</sub>-Dependent Reductase. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 59(41), 18029–18035.

## ANEXO

Preparación de medio LB		
Reactivo	Sólido	Líquido
	Masa (g)	Masa (g)
Triptona de caseína	3	3
Extracto de levadura	1.5	1.5
NaCl	3	3
Agar	4.5	-
Volumen final	300 mL	300 mL

Soluciones para realizar la técnica miniprep		
Solución SET	Solución II	Solución III
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sacarosa 8%</li> <li>• Tris-HCl 0.05 M</li> <li>• EDTA 0.05 M, pH 8.0</li> </ul> (Almacenar a 4°C)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SDS 2%</li> <li>• NaOH 0.4 N</li> </ul> (preparar al momento y mezclar en partes iguales).	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acetato de sodio anhídrido 3 M pH 4.8</li> </ul> (Almacenar a 4°C)

Preparación de medio TB	
Reactivo	Masa (g)
Triptona de caseína	8.010
Extracto de levadura	16
Glicerol (100%)	3.34
Volumen final	600 mL

Componentes para preparar un gel de poliacrilamida 10%		
Reactivos	Gel separador	Gel apilador
	Volumen	Volumen
Tris HCl 1.5 M pH 8.8	2.6 mL	-
Tris HCl 1 M pH 6.8	-	600 µL
SDS 10%	100 µL	50 µL
Acrilamida 40%	2.5 mL	500 µL
Agua MQ	4.69 mL	3.8 mL
APS 10%	100 µL	50 µL
TEMED	10 µL	5 µL
Volumen final	10 mL	5 mL

Componentes de buffer de transferencia 1X	
Reactivos	Cantidad
Tris base	6.05 g
Glicina	28.97 g
Metanol	400 mL
Agua	c.b.p. 2 L
Volumen final	2 L
Colocar en botella ámbar y refrigerar a 4°C	



Preparación de PBST	
Reactivos	Cantidad
Solución de fosfatos 10X	20 mL
Tween 20	200 $\mu$ L
Agua	180 mL
Volumen final	200