



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Clonación y expresión del gen *lanA* que codifica para el péptido precursor de un lantipéptido bacteriano.

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

SUSANA ELENA BARRERA GUTIÉRREZ

TUTORA

DRA. BEATRIZ RUIZ VILLAFÁN

ASESOR

DR. SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL



Ciudad Universitaria, CDMX

AÑO 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: Profesora: BEATRIZ RUIZ VILLAFÁN
VOCAL: Profesora: TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA
SECRETARIO: Profesor: HUGO ANTONIO HERNÁNDEZ PÉREZ
1er. SUPLENTE: Profesor: MANUEL GUTIÉRREZ AGUILAR
2° SUPLENTE: Profesor: JOSÉ ANTONIO PEDROZA GARCÍA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de Microbiología Industrial (C-106) del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM; a cargo del Dr. Sergio Sánchez Esquivel.

ASESOR DEL TEMA:

BEATRIZ RUIZ VILLAFÁN

SUPERVISOR TÉCNICO:

SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL

SUSTENTANTE:

SUSANA ELENA BARRERA GUTIÉRREZ

AGRADECIMIENTOS

A CONAHCYT, por la beca de Ayudante de Investigador Nivel III o Emérito del SNI y al financiamiento PAPIIT, DGAPA IN205922.

Al apoyo económico recibido del Programa Institucional del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Nuevas Alternativas para el tratamiento de Enfermedades Infecciosas (NUATEI)”.

Índice

1	Introducción	10
2	Antecedentes	11
2.1	Resistencia a antibióticos	11
2.2	Productos naturales.	13
2.2.1	Metabolitos secundarios	13
2.3	Actinobacterias	15
2.4	<i>Streptomyces</i> spp.	17
2.5	Minería genómica	18
2.6	Péptidos sintetizados ribosomalmente y modificados postraduccionalmente (RiPPs)	20
2.7	Lantipéptidos	21
2.7.1	Clasificación	22
2.7.2	Aplicaciones	24
2.7.3	Lantibióticos	26
2.8	<i>Streptomyces thermocarboxydus</i> K155	28
3	Objetivos generales	29
4	Objetivos particulares	29
5	Procedimiento experimental	30
5.1	Cepas y plásmidos	31
5.2	Análisis bioinformático	32
5.3	Síntesis del gen <i>lanA</i>	32
5.4	Expresión del gen <i>lanA</i> en <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	34
5.5	Subclonación de <i>lanA</i> en pRSFDuet-1	35
5.5.1	Obtención del inserto (<i>lanA</i>)	36
5.5.2	Obtención del vector pRSFDuet-1	37
5.5.3	Ligación <i>lanA</i> y pRSFDuet-1.....	38
5.5.4	Análisis de restricción para confirmar las clonas positivas.....	39
5.6	Expresión heteróloga de la construcción <i>lanA</i> en pRSFDuet-1.	40
6	Resultados	42
6.1	Análisis bioinformático del genoma de <i>S. thermocarboxydus</i> K155.	42
6.2	Diseño y síntesis de <i>lanA</i> con codones optimizados para su expresión en <i>E. coli</i> .	48
6.3	Expresión heteróloga en <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	49
6.4	Subclonación del gen <i>lanA</i> optimizado en pRSFDuet-1	51

6.4.1	Amplificación de <i>lanA</i> optimizado	52
6.4.2	Ensayo de restricción del plásmido.....	53
6.4.3	Ensayo de restricción de colonias transformantes	54
6.4.4	Secuenciación de clonas positivas	54
6.5	Ensayos de expresión de LanA	55
6.5.1	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	56
6.5.2	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS y Rosetta	57
6.5.3	Ensayo de expresión con represor en <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS y <i>E. coli</i> Rosetta.....	58
7	Discusión	60
8	Conclusiones	67
9	Referencias bibliográficas	68
10	Anexos	76
10.1	Protocolos experimentales	81
10.1.1	Preparación de células electrocompetentes	81
10.1.2	Electroporación.....	82
10.1.3	Transformación por choque térmico	83
10.1.4	Aislamiento de plásmido.....	83
10.1.5	Aislamiento de plásmido (Miniprep)	85
10.1.6	Conservación de colonias de <i>E. coli</i>	87
10.1.7	Ensayo de expresión de proteínas.....	87
10.1.8	Tinción con azul de Coomassie	89
10.1.9	Transferencia a membrana para ensayo de western blot.	89
10.1.10	Western blot (reconocimiento con anti-His).	91
10.2	Secuencia de nucleótidos de gen <i>lanA</i> de la cepa <i>S. thermocarboxydus</i> K155	92
10.3	Secuencia de nucleótidos de gen <i>lanA</i> optimizado para su expresión en <i>E. coli</i> y modificado con el sitio de corte de la proteasa Furin	93
10.4	Secuencia de aminoácidos de péptido LanA de la cepa <i>S. thermocarboxydus</i> K155.	93
10.5	Secuencia de aminoácidos de péptido LanA modificado con el sitio de corte de la proteasa Furin	93
10.6	Secuencia de nucleótidos de gen <i>lanB</i> de la cepa <i>S. thermocarboxydus</i> K155	93
10.7	Secuencia de aminoácidos de la proteína LanB de la cepa <i>S. thermocarboxydus</i> K155.	96

10.8	Secuencia de nucleótidos de gen <i>lanC</i> de la cepa <i>S. thermocarboxydus</i> K155	97
10.9	Secuencia de aminoácidos de la proteína LanC de la cepa <i>S. thermocarboxydus</i> K155.	99

Índice de Figuras

Figura 1.	Cronología que muestra la década en que aparecieron nuevas clases de antibióticos en la clínica.	12
Figura 2.	Gráfica de crecimiento bacteriano y de generación de producto.	14
Figura 3.	Dibujos esquemáticos de diversas cadenas de esporas producidas por actinobacterias.	15
Figura 4.	Representación esquemática del ciclo de esporulación de <i>Streptomyces</i> .	16
Figura 5.	Ruta biosintética general de productos naturales de sintetizados ribosomalmente y modificados postraduccionalmente.	20
Figura 6.	Estructura química de lantipéptido nisina y mecanismo de formación de puentes tioéter en lantipéptidos.	22
Figura 7.	Representación esquemática de las 5 clases de maquinaria enzimática para producir lantipéptidos.	23
Figura 8.	Mecanismo de acción de lantibióticos al unirse al lípido II.	27
Figura 9.	Metodología general.	30
Figura 10.	Resultados obtenidos del análisis del genoma de la cepa <i>S. thermocarboxydus</i> K155 por medio del programa en línea antiSMASH 6.0.	43
Figura 11.	Alineamiento local múltiple de LanA de <i>S. thermocarboxydus</i> K155.	44
Figura 12.	Modelo de la estructura de LanB de la cepa <i>S. thermocarboxydus</i> K155.	45
Figura 13.	Alineamiento local múltiple de regiones correspondientes a LanB de <i>S. thermocarboxydus</i> K155.	46

Figura 14. Modelo de la estructura de LanC de la cepa <i>S. thermocarboxydus</i> K155.	47
Figura 15. Alineamiento local múltiple de regiones correspondientes a LanC de <i>S. thermocarboxydus</i> K155.	48
Figura 16. Mapa del plásmido pD421-lanA.	49
Figura 17. Ensayo de expresión en <i>E. coli</i> BL21 (DE3). Inducción de LanA con IPTG 0-1 mM. 4 h.	50
Figura 18. Ensayo de expresión en <i>E. coli</i> BL21 (DE3). Inducción de LanA con IPTG 0-1 mM. 16 h.	51
Figura 19. Mapa de construcción pSBlanA.	52
Figura 20. Amplificación del gen <i>lanA</i> por PCR.	53
Figura 21. Digestión del vector pRSFDuet-1 con las enzimas <i>EcoRI</i> y <i>HindIII</i> .	53
Figura 22. Digestión de colonias transformantes con las enzimas <i>EcoRI</i> y <i>HindIII</i> .	54
Figura 23. Electroferograma de gen <i>lanA</i> (colonia 1).	55
Figura 24. Alineamiento de gen <i>lanA</i> optimizado con los resultados de secuenciación de colonias positivas.	55
Figura 25. SDS-PAGE. Ensayo de expresión en <i>E. coli</i> BL21 (DE3). Inducción de LanA con IPTG 1 mM. 0-16 h. Tinción de Coomassie.	56
Figura 26. SDS-PAGE. Ensayo de expresión en <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS. Inducción de LanA con IPTG 1 mM. 0-16 h. Tinción de Coomassie.	57
Figura 27. SDS-PAGE. Ensayo de expresión en <i>E. coli</i> Rosetta. Inducción de LanA con IPTG 1 mM. 0-16 h. Tinción de Coomassie.	58
Figura 28. SDS-PAGE. Ensayo de expresión en <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLyss y <i>E. coli</i> Rosetta. Inducción de LanA con IPTG 1 mM. 0-4 h. 37°C Tinción de Coomassie.	59
Figura 29. Ensamble de sándwich para transferencia de proteínas.	90

Índice de Tablas

Tabla 1. Aplicaciones de lantipéptidos en el área médica.	25
Tabla 2. Cepas de <i>E. coli</i> y plásmidos utilizados en este trabajo.	31
Tabla 3. Reacción de digestión para linealizar el plásmido pD421-lanA.	34
Tabla 4. Características de los cebadores diseñados para la amplificación de <i>lanA</i> .	36
Tabla 5. Componentes de reacción de PCR para amplificar <i>lanA</i> .	36
Tabla 6. Condiciones de reacción para amplificar <i>lanA</i> por PCR.	37
Tabla 7. Reacción de ligación pRSFDuet-1 y <i>lanA</i> .	38
Tabla 8. Reacción de digestión para liberar el gen <i>lanA</i> .	39
Tabla 9. Cebadores usados para la secuenciación de la construcción.	40
Tabla 10. Reacción de digestión para liberar el inserto correspondiente a <i>lanA</i> .	41
Tabla 11. Características de genes biosintéticos asociados a la producción un lantipéptido de clase I en la cepa <i>S. thermocarboxydus</i> K155.	44

Abreviaturas

%	Por ciento	mL	Mililitros
°C	Grados Celsius	mM	Milimolar
µg	Microgramos	MRSA	Staphylococcus aureus resistente a meticilina
µL	Microlitros	ms	Milisegundos
µm	Micrómetros	mV	Milivolts
ACR-DFA	Proteína de choque térmico alfa-cristalina de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	N	Normal
ADN	Ácido desoxirribonucleico	Na₂HPO₄·H₂O	Fosfato disódico monohidratado
ADNp	Ácido desoxirribonucleico plasmídico	NaCl	Cloruro de sodio
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico	NaH₂PO₄·H₂O	Bifosfato de sodio monohidratado
ARN	Ácido ribonucleico	NaOH	Hidróxido de sodio
ARNt	ARN de transferencia	NETs	Trampas extracelulares de neutrófilos
BCIP/NBT	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/nitrozol de tetrazolio	ng	Nanogramos
BGC	Clúster de genes biosintéticos	NRPS	Péptidos sintetizados no ribosomalmente
DMSO	Dimetilsulfóxido	nt	Nucleótidos
dNTPs	Desoxiucleótidos trifosfato	p/v	Peso/Volumen
DO	Densidad óptica	pb	Pares de bases
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	PBS	Buffer fosfato salino
EtOH	Etanol	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
g	Gramos	PE	Fosfatidiletanolamina
G+C/GC	Guanina y Citosina	PKS	Policétido sintasas
h	Horas	pmol	Picomol
H₂O	Agua	RiPPs	Péptidos sintetizados ribosomalmente y modificados postraduccionalmente
HCl	Ácido clorhídrico	rpm	Revoluciones por minuto
IgG	Inmunoglobulina G	SDS	Dodecilsulfato de sodio
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido	SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecilsulfato de sodio
Kan	Kanamicina	SSI	Solución salina isotónica
kb	Kilobases	Tm	Temperatura de fusión
kDa	Kilodalton	Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
L	Litros	U	Unidad
LB	Medio Luria-Bertani	V	Volts
M	Molar	v/v	Volumen/Volumen
mA	Miliamperios	VHS	Virus de herpes simple
mg	Miligramos	VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
MgCl₂	Cloruro de magnesio	VRE	Enterococos resistentes a vancomicina
min	Minutos	VRS	Virus respiratorio sincitial

1 Introducción

La resistencia microbiana a los antibióticos constituye un serio problema a nivel mundial, encontrándose entre las primeras amenazas para la salud pública a las que se enfrenta la humanidad. Esta crisis se atribuye principalmente al uso excesivo e indebido de estos medicamentos, así como a la falta de interés de la industria farmacéutica por la búsqueda y desarrollo de nuevos antibióticos (1).

El descubrimiento de nuevas cepas productoras de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana promete una solución a la carencia de antibióticos efectivos, ya que es posible descubrir nuevas moléculas activas (2). Dentro de estos productos naturales se encuentran los lantipéptidos, un tipo de péptidos policíclicos que contienen puentes tioéter denominados lantioninas, sintetizados ribosomalmente y modificados postraduccionalmente (RiPPs) (3). En general estos péptidos han presentado actividad contra algunas bacterias Gram positivas y Gram negativas, al inhibir la biosíntesis de la pared celular y alterar la integridad de la membrana citoplásmica mediante la formación de poros (4). Típicamente el clúster genético para la síntesis de un lantipéptido está conformado por el gen *lanA* que codifica para el péptido precursor y los genes *lanB* y *lanC* que codifican para las enzimas que catalizan la deshidratación y la formación de anillos tioéter, respectivamente (3).

El objetivo este proyecto fue, clonar y expresar el gen *lanA* que codifica para el péptido precursor de un lantipéptido de clase I de la cepa *Streptomyces*

thermocarboxydus K155, iniciando así la estrategia para obtener el péptido maduro y posteriormente, evaluar su actividad biológica.

2 Antecedentes

2.1 Resistencia a antibióticos

Los antibióticos son sustancias químicas o metabolitos producidos por microorganismos, con la capacidad de inhibir el crecimiento e incluso destruir microorganismos sin dañar al hospedero (5). Su uso se remonta a hace más de 200 años, sin embargo, el rápido y relativamente fácil descubrimiento de estos compuestos (figura 1), desencadenado en los años 40's (2), condujo al uso desmesurado de los mismos para tratar infecciones humanas. Lo anterior, aunado al uso de los antibióticos en la ganadería y agricultura, en conjunto con las malas prácticas de higiene y un deficiente sistema de salud en cuanto a prevención de enfermedades, limitado acceso a medicamentos, vacunas y diagnósticos (6, 7) ha dado como resultado la selección de bacterias patógenas resistentes a múltiples fármacos (8) y el aumento de infecciones causadas por las mismas.

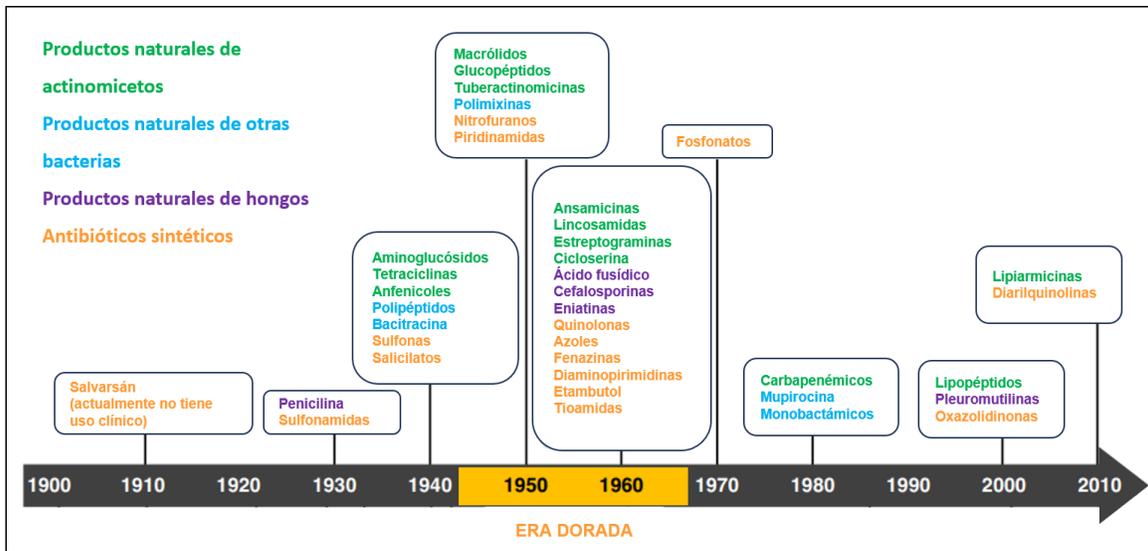


Figura 1. Cronología que muestra la década en que aparecieron nuevas clases de antibióticos en la clínica. Modificado de Hutchings et al., 2019.

La resistencia a los antimicrobianos ocurre cuando bacterias, virus, hongos y parásitos desarrollan la habilidad de sobrevivir en presencia de compuestos diseñados para matarlos o inhibir su crecimiento, haciendo las infecciones más difíciles de tratar y aumentando el riesgo de la diseminación y severidad de las enfermedades e incluso causando la muerte (1).

La aparición de bacterias patógenas resistentes a antibióticos es un grave problema en la salud pública y se considera una de las mayores amenazas a la salud humana, incluye especies como *Enterococcus* resistentes a vancomicina (VRE), *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) y *Streptococcus pneumoniae* resistente a fármacos (2).

Una alternativa para enfrentar este problema es el descubrimiento de nuevas cepas productoras de antibióticos en entornos no explorados que, combinado con nuevas

herramientas como la minería de genomas, hacen posible descubrir y producir nuevos productos naturales o metabolitos secundarios (2).

2.2 Productos naturales.

Los productos naturales son compuestos químicos o sustancias farmacológica o biológicamente activas que son encontradas en la naturaleza y producidas por organismos vivos (9).

Se dividen en 2 grupos principales, los metabolitos primarios, que son aquellos compuestos presentes en todas las células y que son indispensables en el metabolismo, reproducción, crecimiento y desarrollo de las mismas, estos compuestos incluyen los ácidos nucleicos, aminoácidos esenciales y azúcares (figura 2). El segundo grupo corresponde a los metabolitos secundarios que son característicos de un limitado grupo de especies y llaman la atención por su efecto biológico en otros organismos (10).

2.2.1 Metabolitos secundarios

De forma resumida, los metabolitos secundarios son compuestos orgánicos producidos por microorganismos, generalmente después de la fase de crecimiento vegetativo más activo (11), que no son esenciales para su reproducción, desarrollo y crecimiento en condiciones de laboratorio. En su ambiente natural le confieren funciones de defensa, señalización para interacciones ecológicas y para muerte

celular programada durante su diferenciación morfológica y se ha descubierto que muchos son activos contra bacterias, hongos, virus, nematodos e insectos (2).

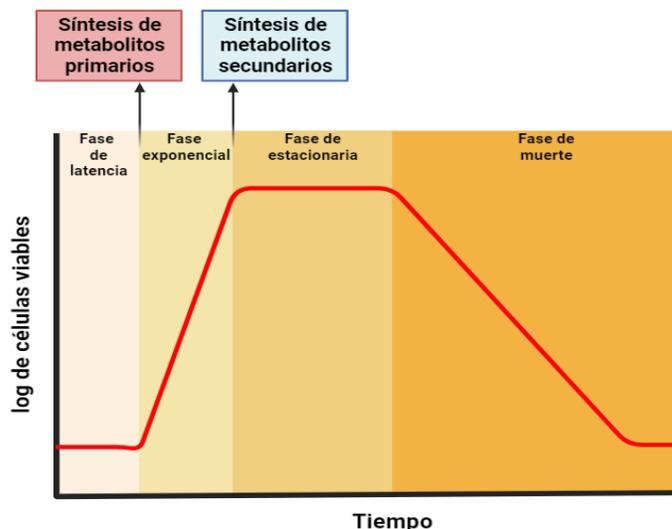


Figura 2. Gráfica de crecimiento y de generación de producto. La producción de metabolitos secundarios ocurre al final de la fase exponencial y al inicio de la fase estacionaria del crecimiento bacteriano. Elaboración propia.

La biosíntesis de metabolitos secundarios inicia a partir de precursores del metabolismo primario donde distintas enzimas realizan modificaciones al combinar ciclos de elongación, ramificación y heterociclación (12) resultando en la construcción de compuestos como alcaloides, terpenoides, policétidos, RiPPs, entre otros (13).

En el área microbiana, las principales fuentes de metabolitos secundarios hasta la fecha han sido hongos y actinobacterias (14). Se ha reportado que más de 10,000 de estos compuestos provienen de este último grupo y aproximadamente 7,600 son producidos por el género *Streptomyces* (15).

2.3 Actinobacterias

Las actinobacterias son un grupo de bacterias filamentosas Gram positivas con alto contenido de GC en su genoma, caracterizadas por su morfología similar a los hongos ya que muchas actinobacterias producen micelio y esporas. Su cromosoma organizado en un nucleoide procariota y la presencia de peptidoglucano en su pared celular es lo que las caracteriza como bacterias y diferencia del reino eucariota (16).

Al constituir uno de los filos bacterianos más grandes pueden encontrarse en ecosistemas acuáticos y terrestres, son habitantes del suelo, ambientes acuáticos, plantas simbios, patógenos de plantas o animales o comensales gastrointestinales (17).

Respecto a su morfología, las actinobacterias se caracterizan macroscópicamente por su aspecto reseco y áspero, y la formación de micelio aéreo sobre medios sólidos. Microscópicamente (figura 3), este grupo puede presentar tanto distintas formas celulares (incluyendo cocos, cocobacilos) como diferentes tipos de micelio (de distinto tamaño, grosor y conformación) y distintas cadenas de esporas (16).

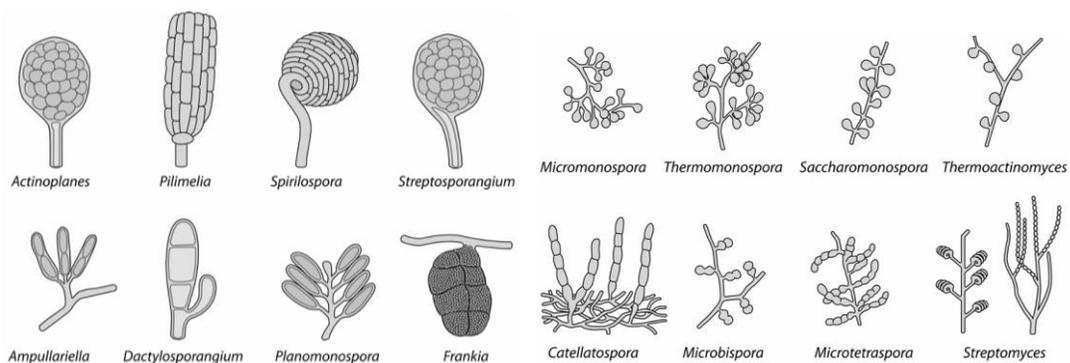


Figura 3. Dibujos esquemáticos de diversas cadenas de esporas producidas por actinobacterias. Barka et al., 2016.

El ciclo de vida de las actinobacterias filamentosas como *Streptomyces* (figura 4) inicia con la germinación de una espora, que conduce al crecimiento y desarrollo de hifas para formar el micelio vegetativo bajo condiciones favorables (12). Este micelio primario es responsable de la absorción de nutrientes y se trata de una red ramificada de hifas compartimentadas con septos muy espaciados que crece de forma profunda en el medio sólido (16). Después de un tiempo, inicia un proceso genético controlado, denominado muerte celular programada, donde una pequeña fracción de células del micelio del sustrato temprano sufren un proceso de degradación regulado y los segmentos vivos de hifas se diferencian en hifas multinucleadas, esta fase puede denominarse micelio reproductivo temprano y durante ésta comienza la producción de antibióticos. Las hifas ramificadas rompen la tensión superficial del medio, formando el micelio aéreo que atraviesa la superficie del suelo, en esta etapa final ocurre un segundo evento de muerte celular programada, seguido de compartimentación y formación de esporas maduras (18).

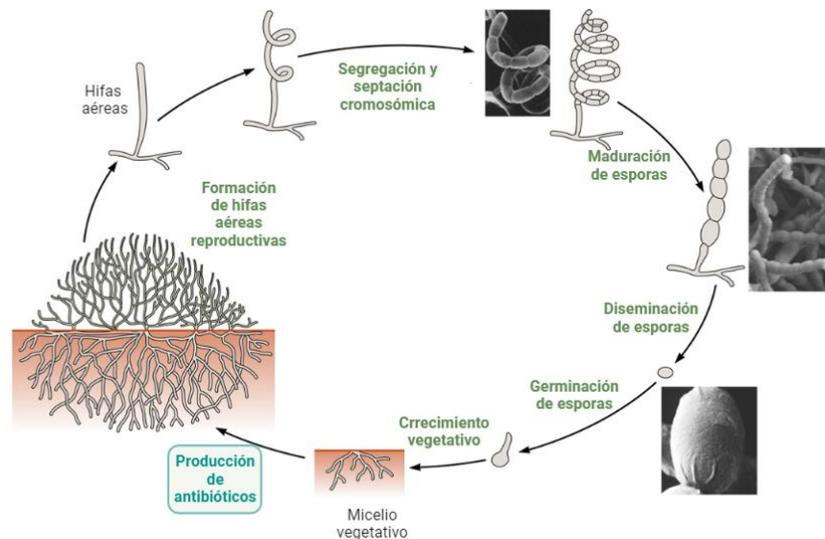


Figura 4. Representación esquemática del ciclo de esporulación de *Streptomyces*. Modificado de Barka et al., 2016.

La fase de producción de antibióticos es de sumo interés desde la perspectiva biotecnológica, pues permite el uso de estas bacterias a nivel industrial (17).

2.4 *Streptomyces* spp.

Este género se conoce por su vida libre en suelos terrestres como su principal hábitat (11), donde juega un papel importante en el ciclo del carbono (16); sin embargo, ya se han reportado aislamientos de *Streptomyces* en otras fuentes como agua, plantas y animales.

El suelo, al ser un ambiente complejo con numerosas fuentes de estrés (químico, físico y biológico) para los microorganismos que lo habitan, es un factor sumamente importante para el desarrollo de *Streptomyces*. Este género presenta en su genoma un amplio número de genes que codifican para reguladores, proteínas de transporte, y enzimas biosintéticas que le permiten producir una amplia gama de metabolitos secundarios, para así combatir este constante entorno de estrés y sobrevivir en comparación con otras especies (11). Estas características, en un enfoque biotecnológico llevó a considerar al género *Streptomyces* como la fuente más importante de metabolitos secundarios, entre los que destacan antibióticos, antifúngicos, antitumorales, pesticidas y agentes inmunomoduladores. Sin embargo, poco se conoce sobre la regulación de la producción de estos metabolitos en *Streptomyces* (12).

Esta regulación está orquestada a diferentes niveles y requiere de la participación de diversos factores y mecanismos de retroalimentación. A nivel genético, podría

estar controlada por un sólo gen o clústeres de genes. A nivel de ARNm los sitios de inicio de la transcripción, los sitios de unión a ribosoma y los ribointerruptores desempeñan un papel importante en la regulación de la activación y desactivación de la cascada de antibióticos. Finalmente, a nivel fisiológico, los mismos antibióticos pueden actuar como señales para iniciar, mejorar o detener la producción de metabolitos en un evento de retroalimentación (12).

A pesar de que *Streptomyces* presenta un alto potencial para producir una amplia variedad de metabolitos secundarios, en la realidad éstos generalmente se producen en pequeñas cantidades (11), o bien muchos genes pueden encontrarse silenciados bajo ciertas condiciones ambientales, incluidas las de laboratorio, lo que limita conocer el verdadero potencial de estos microorganismos. El avance de herramientas como la minería genómica, ingeniería genética y procesos de optimización de rutas biosintéticas, han jugado un papel importante para comprender el potencial de este género para la producción de diversos metabolitos secundarios (19).

2.5 Minería genómica

El término “minería genómica” se refiere al análisis bioinformático utilizado, no solamente para detectar rutas biosintéticas para la producción de un metabolito secundario, sino también para predecir su estructura química o su posible función (20). Este enfoque desempeña un papel importante en la exploración de clústeres de genes biosintéticos (BGC por sus siglas en inglés) silenciosos que pueden codificar para la producción de metabolitos secundarios no reportados. Haciendo uso de herramientas bioinformáticas, genética molecular y química analítica es

posible obtener el producto metabólico de un clúster de genes encontrado en el genoma de un organismo (21).

Herramientas bioinformáticas como BAGEL (<http://bagel4.molgenrug.nl>), PRISM (<https://prism.adapsyn.com>), antiSMASH (<https://antismash.secondarymetabolites.org/#!/start>), entre otras, han sido desarrolladas para identificar BGCs dentro del genoma de diversos organismos, incluyendo especies del género *Streptomyces*. La mayoría de estas herramientas se basan en identificar secuencias altamente conservadas dentro de los BGCs para mapear su ubicación (22). Esto es válido para la identificación y localización de varias familias químicas de metabolitos secundarios como policétido sintetasas (PKS), terpenos, antraciclinas, derivados del shikimato, entre otros.

El BGC detectado se compara con otros caracterizados experimentalmente utilizando bases de datos comunitarias como MIBiG, Interpro y Pfam y con base en la similitud que presenten es que se asigna una posible función a cada gen del clúster (23, 24).

Para el género *Streptomyces*, el uso de la minería genómica ha revelado que cada especie puede llegar a poseer hasta 30 posibles BGCs y aunque muchos productos de estos clústeres aún no se han identificado (22) es importante destacar la presencia de metabolitos de interés en el área farmacológica como policétidos sintetizados por policétido sintetasas (PKS), péptidos sintetizados no ribosomalmente (NRPS) cuya biosíntesis es independiente del mecanismo ARNm-ribosoma o RiPPs.

2.6 Péptidos sintetizados ribosomalmente y modificados postraduccionalmente (RiPPs)

Los péptidos sintetizados ribosomalmente y modificados postraduccionalmente (RiPPs) representan una de las clases principales de productos naturales. Su gran diversidad estructural les confiere distintas actividades biológicas y un alto potencial para diversas aplicaciones farmacéuticas (25). Los RiPPs se producen por la modificación enzimática de pequeños péptidos precursores que tienen una secuencia líder específica (24). Esta secuencia es reconocida por las enzimas modificadoras mediante secuencias de reconocimiento para posteriormente actuar sobre la región “core” (péptido sin secuencia líder), que una vez modificada se escindirá del péptido líder resultando en el péptido maduro (figura 5), y eventualmente se exportará de la célula productora (25). Las modificaciones que se han observado son la generación de estructuras cíclicas, metilaciones/alquilaciones de los esqueletos, epimerización, adición de grupos lipídicos, entre otras (26).

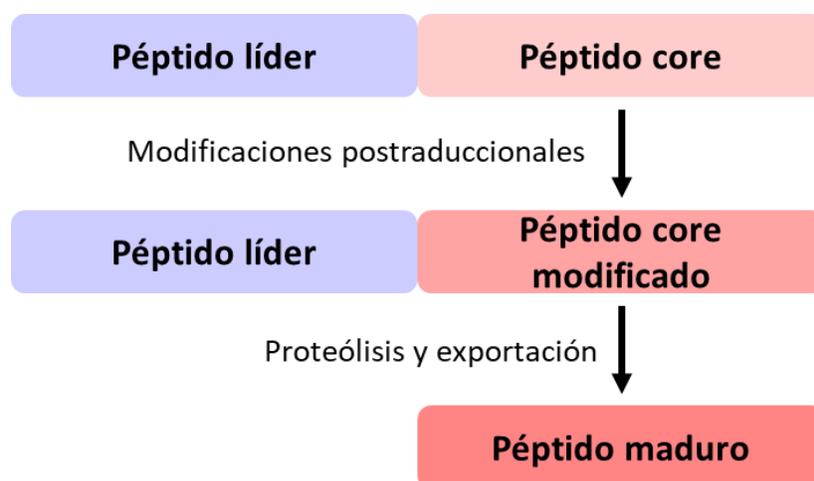


Figura 5. Ruta biosintética general de productos naturales de sintetizados ribosomalmente y modificados postraduccionalmente. Elaboración propia.

Su biosíntesis se lleva a cabo por un conjunto de genes co-localizados en la misma región genómica (BGC). Los RiPPs siguen una vía biosintética donde se requieren al menos dos componentes: genes estructurales pequeños que codifican para uno o más péptidos precursores y uno o más genes que codifican para enzimas modificadoras del péptido precursor. Es importante mencionar que existen genes adicionales relacionados con la maduración, transporte, inmunidad y regulación encontrados en el mismo BGC del metabolito (24).

Actualmente existen herramientas de minería genómica que permiten la detección de RiPPs (ver 27), tal es el caso de antiSMASH, un programa en línea que puede detectar alrededor de 28 clases diferentes de este tipo de compuestos (24), incluyendo un grupo denominado lantipéptidos.

2.7 Lantipéptidos

Se les llama lantipéptidos a este tipo de RiPPs, por su característica estructural principal: son policíclicos y contienen anillos denominados lantioninas o metil-lantioninas formados por puentes tioéter entre residuos de cisteína y didehidroalanina o didehidrobutirina (4).

Los lantipéptidos son sintetizados en el ribosoma como un péptido precursor denominado LanA cuya región “core” será modificada por lantioninsintetasas específicas denominadas LanB, LanC, LanY y LanK (28) o por sintetasas multifuncionales conocidas como LanM, LanKC y LanL. La formación de puentes

tioéter ocurre por la deshidratación de serina y treonina generando los residuos didehidroalanina o didehidrobutirina, respectivamente, seguido por una adición de Michael de un cisteinil tiol para dar el puente característico (figura 6) (4).

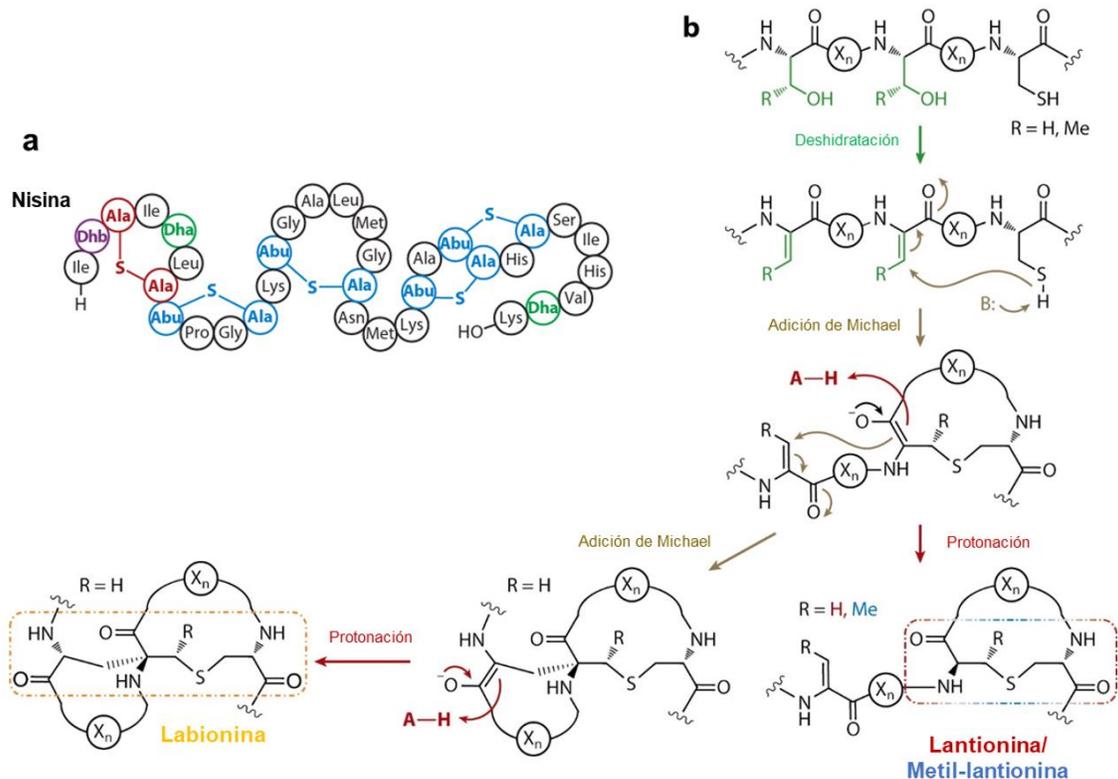


Figura 6. (a) Estructura química de lantipéptido nisina. (b) Mecanismo de formación de puentes tioéter en lantipéptidos. Modificado de Knerr y Van Der Donk, 2012.

2.7.1 Clasificación

Las sintetasas de lantipéptidos difieren en el número y tipos de enzimas necesarias para generar los puentes tioéter, el mecanismo químico de deshidratación y el tipo de macrociclos producidos. La participación de estas distintas enzimas para llevar

a cabo las modificaciones postraduccionales permite organizar los lantipéptidos en 5 clases (figura 7).

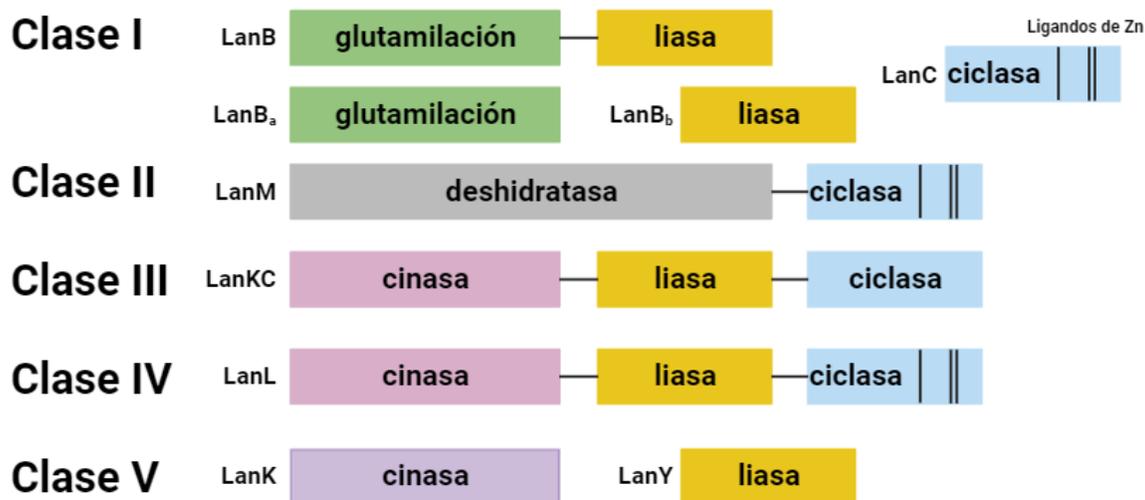


Figura 7. Representación esquemática de las 5 clases de maquinaria enzimática para producir lantipéptidos. Modificado de Thibodeaux, 2023.

Los lantipéptidos de clase I cuentan con enzimas específicas que llevan a cabo la deshidratación de serina y treonina y la ciclización tioéter, estas son LanB y LanC respectivamente, en algunos casos, la deshidratasa LanB se divide en una enzima, de glutamilación LanB_a y una liasa LanB_b (28). En la clase II, estas reacciones se llevan a cabo solo por una sintetasa bifuncional, llamada LanM que contiene un dominio de deshidratasa amino terminal y un dominio de ciclasa de tipo LanC carboxilo terminal. Los lantipéptidos de clase III y IV se modifican por una sintetasa trifuncional que presenta un dominio de liasa amino terminal, un dominio cinasa central y un dominio de ciclasa carboxilo terminal (4), la diferencia entre estas enzimas es que en los lantipéptidos de clase IV el dominio ciclasa es similar al dominio ciclasa de LanM y a LanC, pues contienen ligandos de zinc (29).

Finalmente, las sintetasas de clase V, corresponden a enzimas específicas, una cinasa denominada LanK y una liasa denominada LanY que formarán el heterodímero, es importante mencionar que, hasta la fecha, no se han observado dominios de ciclización en esta clase (28).

2.7.2 Aplicaciones

Esta variedad de clases de lantipéptidos ha permitido descubrir distintas bioactividades relevantes para su aplicación en el área médica (tabla 1). Los lantipéptidos de clase I y II destacan como antibióticos al ser efectivos contra bacterias Gram positivas estrechamente relacionadas a la cepa productora como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, entre otros. Esta clase de lantipéptidos también han presentado una actividad limitada contra algunas bacterias Gram negativas, que aumenta en combinación con colistina o agentes quelantes como EDTA. Algunos también pueden actuar además como anticancerígenos al inducir la apoptosis de células cancerígenas, como antivirales al inhibir la entrada de filovirus y flavivirus a las células del hospedero y como inmunomoduladores al potenciar la respuesta inmune contra *Salmonella entérica* y *E. coli*. Dentro de los lantipéptidos de clase II, la duramicina llegó a la fase II de estudios clínicos para el tratamiento de fibrosis quística, ya que al permitir el flujo de iones cloruro en las células, causa una disminución en los niveles de calcio intracelular. Por otra parte, algunos lantipéptidos de clase III han mostrado actividad antiviral, antialodínica y antinociceptiva (29).

Tabla 1. Aplicaciones de lantipéptidos en el área médica. Tomado de van Staden et al, 2021 (29).

Bioactividad	Modo de acción	Lantipéptido	Aplicación
Antibiótico	Previene biosíntesis de pared celular y facilita la ruptura de membrana bacteriana	Nisina (Clase I)	Actividad contra infección por <i>Streptococcus pneumoniae</i> y <i>S. aureus</i>
		Mutacina 1140 (Clase I)	Actividad contra <i>Clostridioides difficile</i>
		Microbisporicina (Clase I)	Actividad contra septicemia causada por <i>S. aureus</i> y contra infección por <i>S. pneumoniae</i> , MRSA y VRE
Anticancerígeno	Induce apoptosis celular.	Nisina	Eficacia contra carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello
	Reduce proliferación de células tumorales. Induce apoptosis.	Duramicina (Clase II)	Potencia fagocitosis al generar la variante duramicina-IgG
Antiviral	Inhibe entrada de filovirus y flavivirus al unirse a PE.	Labirintopeptina A1 (Clase III)	Actividad contra VIH, VHS y VRS.
Inmunomodulador	Induce producción de quimiocinas, activación de NETs, modulación de fosfolipasa-2	Nisina	Protección contra <i>Salmonella entérica</i> y <i>E. coli</i> .
		Gallidermina Pep5	Respuesta inmune contra patógenos donde la fagocitosis no es suficiente.
Regulación de canales iónicos	Activa vía de secreción o salida de cloruro de las células epiteliales.	Duramicina	Tratamiento de fibrosis quística
Antialodínico y antinociceptivo.	Desconocido	Labirintopeptina A2 (Clase III)	Atenúa alodinia táctil
		NAI-112 (Clase III)	Reduce alodinia e hiperalgesia

2.7.3 Lantibióticos

Al grupo de lantipéptidos que presenta actividad antibiótica, se les conoce específicamente como lantibióticos o bacteriocinas de clase I. Las bacteriocinas corresponden a aquellos péptidos antimicrobianos que son activos contra un rango limitado de bacterias estrechamente relacionadas con la cepa productora (30) y de forma más específica, las bacteriocinas de clase I se caracterizan por ser péptidos pequeños (generalmente menores a 5 kDa), termoestables y contener los aminoácidos lantionina o metil-lantionina característicos de los lantipéptidos (31).

Como se mencionó anteriormente, los lantipéptidos de clase I y II destacan por su actividad antibiótica, principalmente contra bacterias Gram positivas; sin embargo, se ha descubierto que también pueden actuar sobre algunas Gram negativas (4).

Se han descrito dos mecanismos de acción contra bacterias, que permiten dividir a los lantibióticos en dos grupos. El primero, conocido como lantibióticos tipo A, caracterizados por causar la formación de poros en la membrana citoplasmática de las células blanco (31), dentro de este grupo se encuentra la nisina, que es el único lantipéptido producido de manera industrial, utilizado por más de 60 años como conservador de alimentos (32). Estas alteraciones en la membrana pueden formarse de dos formas, la primera involucra la interacción electrostática entre cargas positivas del péptido y componentes con carga negativa en la superficie de la membrana de las bacterias, permitiendo la inserción en la misma causando la formación de “poros de vida corta”. La segunda forma descrita para la nisina implica el reconocimiento y unión al lípido II (figura 8) (molécula que permite el transporte

del precursor de la síntesis de la pared celular), seguido de una orientación transmembranal de la nisina y la formación de poros estables (33).

El segundo mecanismo, descrito para lantibióticos tipo B, como la mersacidina, también involucra la unión con el Lípido II, causando un efecto “secuestrante” al impedir que el lípido II pueda unirse a las subunidades para la construcción del péptidoglucano, inhibiendo así la síntesis de la pared celular y, por ende, causando la muerte de la bacteria. Este mecanismo llama la atención de forma particular ya que hasta la fecha no se ha encontrado un mecanismo de resistencia de las bacterias (34).

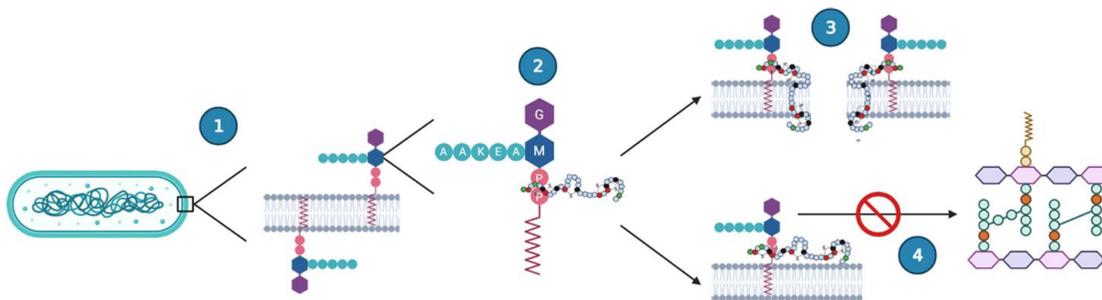


Figura 8. Mecanismo de acción de lantibióticos al unirse al lípido II. La unidad precursora de la pared celular (1) es el blanco para estos lantibióticos, que específicamente se unen al pirofosfato del lípido II (2), para posteriormente insertarse en la membrana (3) y causar la formación de poros. Adicionalmente, la unión al lípido II puede resultar también en la inhibición de la biosíntesis de la pared celular (4). Modificado de van Staden et al, 2021.

Se ha reportado que los lantipéptidos presentan ventajas y desventajas al proponer su uso en la industria, por su naturaleza policíclica adquieren cierta estabilidad y resistencia a proteasas y presentan una alta especificidad a su blanco de acción (35). En el caso de la nisina, se ha comprobado su estabilidad y actividad incluso después de procesos como esterilización y pasteurización (32), además presentan

baja citotoxicidad para el humano (36), baja resistencia de otros microorganismos a estos péptidos comparada con otras clases de antibióticos y excelente actividad *in vivo* e *in vitro* contra agentes patógenos. Sin embargo, las limitaciones de la nisina incluyen baja estabilidad en sangre, baja solubilidad en soluciones acuosas a condiciones fisiológicas, susceptibilidad a digestión enzimática y en general propiedades farmacocinéticas pobres (7). Actualmente, se realizan experimentos que consisten en modificar el péptido maduro para mejorar estas propiedades y promover su uso terapéutico.

2.8 *Streptomyces thermocarboxydus* K155

En la búsqueda de metabolitos secundarios con potencial uso farmacológico, en 2019 se publicó el aislamiento y caracterización de la cepa *Streptomyces thermocarboxydus* K155, proveniente de una muestra de suelo en el Valle de Chalco, Estado de México, México. El microorganismo aislado presentó actividad antibiótica contra *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* y *Saccharomyces cerevisiae*; sin embargo, no se identificó la estructura del compuesto activo (37). Por otra parte, análisis bioinformáticos del genoma la cepa, que fue secuenciado, muestran la predicción de sintetetasas para producir geosmina, hopeno, alvaflavenona, diterpenos (38), policétidos, sideróforos y un lantipéptido (39). El estudio de este último llama la atención por sus potenciales aplicaciones como antibiótico, por lo que este proyecto busca analizar el clúster asociado a la producción del mismo e iniciar una estrategia para obtener el péptido maduro, para que en un futuro sea posible evaluar su actividad antibiótica.

3 Objetivos generales

Clonar y expresar el gen *lanA* que codifica para el péptido precursor de un clúster biosintético correspondiente a un lantipéptido de clase I de la cepa *S. thermocarboxydus* K155.

4 Objetivos particulares

- Analizar bioinformáticamente los clústeres de genes que codifican para la producción de metabolitos secundarios en el genoma de *S. thermocarboxydus* K155.
- Seleccionar un clúster para la síntesis de un lantipéptido, estudiar que genes lo conforman y si reúnen las características para obtener un péptido maduro.
- Clonar y expresar el gen *lanA* en un hospedero heterólogo.

5 Procedimiento experimental

La metodología general a seguir para lograr los objetivos planteados en este proyecto se muestra en la figura 9.

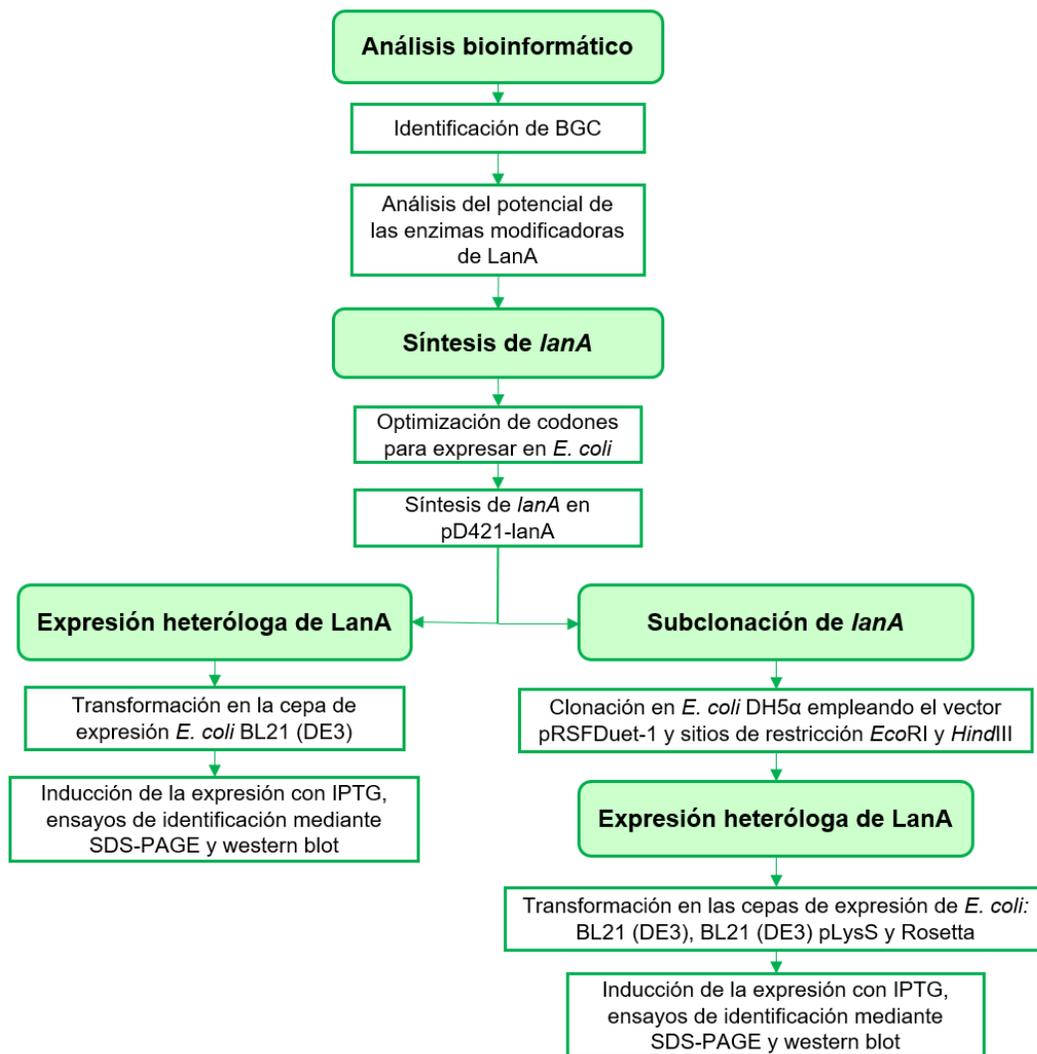


Figura 9. Metodología general. Elaboración propia.

5.1 Cepas y plásmidos

Las cepas de *Escherichia coli* y los plásmidos se enlistan en la tabla 2. Las cepas de *E. coli* se cultivaron en medio LB a 37°C. Para su conservación, se prepararon las células en suspensión en glicerol al 20% y se almacenaron a -70°C.

Tabla 2. Cepas de *E. coli* y plásmidos utilizados en este trabajo.

Cepas	Genotipo
DH5α	F ⁻ φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺) <i>phoA supE44 λ⁻thi-1 gyrA96 relA1</i>
Top10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ(<i>araleu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)
BL21(DE3) pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysS(Cam ^R)
Rosetta	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) pRARE (Cam ^R)
Plásmidos	
pD421	Resistencia a kanamicina, gen <i>lacI</i> , gen <i>lacO</i> , origen de replicación p15A, promotor T5.
pRSFDuet-1	Resistencia a kanamicina, gen <i>lacI</i> , origen de replicación RSF, promotor T7.

5.2 Análisis bioinformático

Con el fin de buscar los potenciales metabolitos secundarios que podría producir la cepa de *S. thermocarboxydus* K155 se realizó inicialmente un análisis de su genoma con el programa antiSMASH 6.0. La secuencia del genoma completo (número de acceso de NCBI: PRJNA312938) fue introducida en formato FASTA utilizando los parámetros predeterminados del programa.

Para el estudio de los posibles genes biosintéticos involucrados en la síntesis del lantipéptido (*lanA*, *lanB* y *lanC*) se obtuvieron las secuencias de aminoácidos que codifica cada gen en formato FASTA. A partir de las secuencias de aminoácidos de las enzimas LanB y LanC, se modeló su estructura utilizando el programa SWISS-MODEL. Asimismo, se buscaron los aminoácidos del sitio catalítico de la proteína modelo, para posteriormente con el programa Clustal Omega realizar alineamientos locales múltiples de las secuencias del lantipéptido de *S. thermocarboxydus* K155 con otras ya reportadas y buscar el grado de conservación de dichos aminoácidos.

5.3 Síntesis del gen *lanA*

Debido a las complicaciones para clonar *lanA* a partir del ADN genómico de *S. thermocarboxydus* K155 (empleando clonación tradicional y clonación por ensamble de Gibson), se decidió sintetizar y optimizar el gen para su expresión en *Escherichia coli*. En el diseño se agregó el sitio de corte de la proteasa Furin en el extremo carboxilo del péptido líder, debido a que LanA no cuenta con la secuencia de reconocimiento de NisP o alguna otra proteasa que permitirá escindir el péptido maduro una vez realizadas las modificaciones postraduccionales. La síntesis del gen en el vector de expresión pD421-NH fue realizado por la compañía

estadounidense ATUM (<https://www.atum.bio>). El vector se caracteriza por tener un fuerte sitio de unión a ribosoma, contiene el promotor T5 que es inducible con IPTG, cuenta con una etiqueta de histidinas en la región amino terminal y con el gen de resistencia a kanamicina. El plásmido fue enviado en papel filtro, por lo que para su recuperación se realizó lo siguiente:

1. Se removió el papel filtro de la bolsa de plástico y se colocó en una superficie limpia.
2. Se agregaron 100 μ L de Tris-HCl 10 mM pH 7.5 directamente en el centro del papel filtro.
3. Para la recuperación del plásmido con el gen *lanA*, se dejó incubando a temperatura ambiente durante 2 minutos.
4. Para separar la solución con la construcción del papel filtro, se perforó el fondo de un tubo de 0.6 mL con una aguja.
5. Se colocó el papel filtro en el tubo de 0.6 mL y este tubo dentro de un tubo de 1.5 mL.
6. Se centrifugó durante 1 minuto a máxima velocidad (13 000 rpm).
7. En el sobrenadante se encuentra la construcción con aproximadamente 1 μ g de plásmido.

La construcción se transformó en células competentes *E. coli* TOP10 por choque térmico, posterior a la recuperación se plaquearon 500 μ L en cajas de LB y se incubaron a 37°C por 24 h.

Se aislaron las colonias y se seleccionaron 10 para extraer el ADN plasmídico mediante miniprep. Se cuantificó cada muestra empleando el NanoDrop y se

linealizó el plásmido digiriendo con la enzima *NdeI* según las proporciones de la tabla 3.

Tabla 3. Reacción de digestión para linealizar el plásmido pD421-lanA.

Reacción de digestión	
ADN plasmídico	20 μ L (500 ng)
<i>NdeI</i>	0.5 μ L (5U)
Buffer rCutSmart	2.5 μ L
H ₂ O	2 μ L
Volumen final	25 μ L

Una vez corroborado el peso molecular de la construcción por electroforesis en agarosa, se seleccionó una colonia para transformar en la cepa de expresión.

5.4 Expresión del gen *lanA* en *E. coli* BL21 (DE3)

De acuerdo con el proveedor, la proteína podía ser expresada en cualquier cepa de *E. coli*, aunque ellos usan BL21. Para llevar a cabo la transformación en la cepa de expresión se prepararon células electrocompetentes *E. coli* BL21 (DE3). Posteriormente se realizó la transformación por electroporación agregando 2 μ L de plásmido a 50 μ L de células competentes, tras la recuperación de las células en 1 mL de LB con 1% glucosa (para reprimir la expresión de la proteína), se plaquearon 500 μ L en una caja de LB con Kanamicina (50 μ g/mL) y se incubaron por 24 horas a 37°C.

Se seleccionaron y aislaron 4 colonias transformantes para su conservación en glicerol y para realizar los ensayos de expresión de *lanA*.

Para los ensayos de expresión se realizó un preinóculo de una de las colonias transformadas en medio LB con Kan (50 µg/mL) y glucosa 2% para reprimir el promotor T5 y se incubó a 37°C durante toda la noche en agitación de 180 rpm. Al siguiente día se tomó una alícuota de 300 µL de cada colonia y se inoculó en 30 mL de LB con Kan (50 µg/mL) y glucosa (2%). Los cultivos se incubaron a 37°C en agitación a 180 rpm hasta una DO₆₀₀ de 0.6-0.8. Una vez alcanzada la densidad óptica deseada se indujo la expresión de *lanA* con IPTG en diferentes concentraciones desde 0, 0.25, 0.5, 0.75 hasta 1 mM en tubos de ensayo con 5 mL de células cada uno. Se incubaron nuevamente a 37°C en agitación (180 rpm) durante toda la noche (aproximadamente 16 h) y se procesaron muestras de 100 µL para correrlas en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 14%.

Cada muestra se corrió en dos geles SDS-PAGE a 40 mA durante 3 h aproximadamente. Cuando terminaron de correr, uno de los geles se tiñó con azul de Coomassie y el segundo gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa Amersham™ Protan® con poro de 0.2 µm para realizar un western blot e identificar la proteína de interés (LanA) que contiene una etiqueta de histidinas, utilizando anticuerpos anti 6XHis.

5.5 Subclonación de *lanA* en pRSFDuet-1

Al no encontrar expresión de *lanA* usando el plásmido pD421-NH, se subclonó la secuencia optimizada de *lanA* en el vector de expresión pRSFDuet-1. Para ello se amplificó el gen *lanA* optimizado a partir del ADN plasmídico de la transformación en *E. coli* BL21 (DE3).

5.5.1 Obtención del inserto (*lanA*)

Se diseñaron cebadores para la amplificación del gen *lanA*, agregando los sitios de restricción *EcoRI* (extremo 5') y *HindIII* (extremo 3') para la posterior ligación de *lanA* con el vector pRSFDuet-1 (tabla 4).

Tabla 4. Características de los cebadores diseñados para la amplificación de *lanA*.

Nombre	Secuencia	T _m (°C)	GC (%)
lanAbrv fwd	ATATGGAATTCTATGCGCACCGAG	66.6	45.83
lanAbrv rev	GAAGCTTTTATTAGGTGCCTTAG	63.6	39.13

Para la amplificación del gen se llevó a cabo la reacción de PCR como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Componentes de reacción de PCR para amplificar *lanA*.

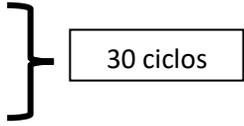
Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen final
ADNp <i>E. coli</i> BL21 (DE3) + <i>lanA</i>	41.1 ng/μL	250 ng/50 μL	7.3 μL
dNTPs	10 mM	0.2 mM	1.2 μL
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	1.8 μL
Amortiguador PCR	10X	1x	6 μL
DMSO	100%	5%	3 μL
Oligonucleótido fwd	10 pmol/μL	0.2 pmol/μL	1.2 μL
Oligonucleótido rev	10 pmol/μL	0.2 pmol/μL	1.2 μL
ADN Polimerasa	5 U/μL	0.05 U/μL	0.6 μL
Platinum Taq			
H ₂ O libre de nucleasas			37.7 μL
			60 μL Master mix

Se exploraron varias temperaturas para determinar la temperatura óptima de alineamiento de los cebadores, en la tabla 6 se muestran las condiciones empleadas para una reacción de 30 ciclos.

Una vez que se determinó la temperatura óptima de alineamiento a 55°C se llevó a cabo una reacción de 60 µL a dicha temperatura para purificar el amplicón con el kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up* y posteriormente digerirlo con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* que permitirían llevar a cabo la ligación con el vector. Finalmente, se cuantificó la concentración final del amplicón con el espectrofotómetro NanoDrop.

Tabla 6. Condiciones de reacción para amplificar *lanA* por PCR.

Etapa	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95.0 °C	5:00 min
Desnaturalización	95.0 °C	1:00 min
Alineamiento	55-65 °C	0:45 min
Polimerización	72.0 °C	0:15 min
Polimerización final	72.0 °C	5:00 min
Enfriamiento	4.0 °C	∞



5.5.2 Obtención del vector pRSFDuet-1

Un microlitro del plásmido de expresión pRSFDuet-1 se electroporó en 50 µL de células electrocompetentes de *E. coli* DH5α. Tras la hora de recuperación en 1 mL de medio LB con 1% glucosa se plaquearon 500 µL de células diluidas (1:500, 10:500 y 100:500) en cajas de LB con Kanamicina (50 µg/mL) y se incubaron a 37°C durante 24 h.

Se seleccionaron 3 colonias transformantes y se aislaron para su conservación en glicerol y aislamiento de plásmido.

Al concluir el protocolo de aislamiento de plásmido se realizó una digestión para una de las muestras con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* y se purificó la banda correspondiente al vector digerido con el kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up*. Finalmente, se cuantificó la concentración final del vector con el espectrofotómetro NanoDrop.

5.5.3 Ligación *lanA* y pRSFDuet-1

Se realizó la ligación de vector más el gen *lanA* en una proporción de 1:3 y 1:5.

Para calcular la cantidad en ng necesaria de inserto correspondiente a 100 ng de vector, se empleó la herramienta NEBioCalculator (<https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>).

Las reacciones de ligación se realizaron en tubos de 1.5 mL en hielo según las proporciones que se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Reacción de ligación pRSFDuet-1 y *lanA*.

Componente	Ligación 1:3	Ligación 1:5
Buffer de ligasa de ADN T4 (10x)	2 µL	2 µL
ADN de vector (3.8 kb)	1.6 µL (14.45 ng)	2.6 µL (24.08 ng)
ADN de inserto (0.183 kb)	5.2 µL (100 ng)	5.2 µL (100 ng)
H ₂ O libre de nucleasas	10.2 µL	9.6 µL
Ligasa de ADN del fago T4	1 µL	1 µL
Volumen final de reacción	20 µL	20 µL

*La ligasa debe agregarse al final.

*El buffer debe descongelarse y suspenderse a temperatura ambiente.

Se debe mezclar la reacción pipeteando hacia arriba y abajo de forma gentil, posteriormente se incubó por 72 h a 4°C para transformar 50 µL de células competentes *E. coli* DH5α por electroporación. Posterior a la transformación se

plaqueó todo el volumen final en cajas de LB con Kanamicina (50 µg/mL) y se incubaron a 37°C por 24 h.

Se aislaron las colonias transformantes y se inocularon 3 de ellas en 5 mL de medio LB con Kanamicina (50 µg/mL) para llevar a cabo el aislamiento de plásmido.

5.5.4 Análisis de restricción para confirmar las clonas positivas.

Una vez concluido el aislamiento de plásmido se cuantificó la concentración de las muestras en el espectrofotómetro NanoDrop y se realizó un ensayo de restricción con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* (tabla 8) para liberar el gen *lanA* y así confirmar la construcción *lanA* con pRSFDuet-1.

Tabla 8. Reacción de digestión para liberar el gen *lanA*.

Reacción de digestión	
ADN plasmídico	15 µL (1400 ng)
<i>EcoRI</i>	1 µL (10U)
<i>HindIII</i>	1 µL (10U)
Buffer 2 NEB	2 µL
H ₂ O	1 µL
Volumen final	20 µL

Las clonas que presentaron la banda del gen *lanA* fueron usadas para secuenciarse.

Los plásmidos se aislaron usando el kit *GeneAII® Exprep™ Plasmid SV mini* para asegurarse que no tuvieran ADN genómico que pudiera interferir con la secuenciación

Las muestras de plásmido fueron secuenciadas en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biomédicas, UNAM. Se emplearon los cebadores de secuenciación que sugiere el manual del vector PRSFDuet-1 (tabla 9).

Tabla 9. Cebadores usados para la secuenciación de la construcción.

Nombre	Secuencia	T _m (°C)
ACYCDuetUP1	GGATCTCGACGCTCTCCCT	65.9
DuetDOWN1	GATTATGCGGCCGTGTACA	64.5

5.6 Expresión heteróloga de la construcción *lanA* en pRSFDuet-1.

Se analizaron las secuencias del gen *lanA* en la construcción (*lanA* + pRSFDuet-1) para corroborar que no tuvieran mutaciones puntuales. Al corroborar el 100% de identidad de las secuencias, la construcción se transformó en 3 cepas de expresión de *E. coli*, estas fueron BL21 (DE3), BL21 (DE3) pLysS y Rosetta.

La transformación se llevó a cabo por electroporación de células competentes agregando 1 µL de plásmido a 50 µL de células competentes. Después de 1 h de recuperación de las células (sección 5.4.3), se plaquean 4 cajas de medio LB con Kanamicina (50 µg/mL) para *E. coli* BL21 (DE3) y LB con Kanamicina (50 µg/mL) con Cloranfenicol (25 µg/mL) para *E. coli* BL21 (DE3) pLysS y Rosetta de la siguiente manera:

- Caja 1: Control negativo (células competentes sin transformar + LB con glucosa 1%)
- Caja 2: 100 µL de células transformadas.
- Caja 3: 100 µL de células transformadas, dilución 1:100
- Caja 4: 100 µL de células transformadas, dilución 10:100

Se aislaron 10 colonias transformantes de cada cepa y para corroborar la presencia de *lanA* se realizó miniprep a 2 colonias transformantes de cada cepa de *E. coli* para

posteriormente digerir las muestras con *EcoRI* y *HindIII* (tabla 10) y corroborar la presencia de la banda correspondiente al gen *lanA*.

Tabla 10. Reacción de digestión para liberar el inserto correspondiente a *lanA*.

Reacción de digestión	
ADN plasmídico	15 μ L (1400 ng)
<i>EcoRI</i>	1 μ L (10U)
<i>HindIII</i>	1 μ L (10U)
Buffer 2 NEB	2 μ L
H ₂ O	1 μ L
Volumen final	20 μ L

Para los ensayos de expresión se realizó un preinóculo de una de las colonias transformadas en medio LB con Kanamicina (50 μ g/mL) para *E. coli* BL21 (DE3) y LB con Kanamicina (50 μ g/mL) con Cloranfenicol (25 μ g/mL) para *E. coli* BL21 (DE3) pLysS y Rosetta, adicionalmente puede agregarse glucosa 2% para reprimir el promotor T7. Se incubaron a 37°C durante toda la noche en agitación de 180 rpm. Se inocularon 300 μ L de preinóculo en 30 mL de medio LB con los antibióticos mencionados anteriormente, correspondientes para cada cepa y glucosa 2% si se agregó en el preinóculo. Los medios se incubaron a 37°C, 180 rpm hasta una DO₆₀₀ de 0.6-0.8, posteriormente se indujo la expresión de *lanA* con IPTG 1 mM a diferentes tiempos (0, 1, 4 y 16 h) en tubos de ensayo con 5 mL de cultivo. Para la inducción se incubaron a 37°C, 180 rpm. Al término de los diferentes tiempos de inducción, se tomaron muestras para correrlas en geles de poliacrilamida al 14% y realizar ensayos de western blot (sección 5.3).

Si se emplea glucosa en el medio como represor del promotor, antes de la inducción deben realizarse 2 lavados de las células con 1 volumen de solución salina isotónica (SSI) 0.85% a 8000 rpm durante 10 minutos y finalmente suspender las células en el volumen inicial de medio LB (30 mL).

6 Resultados

6.1 Análisis bioinformático del genoma de *S. thermocarboxydus* K155.

Inicialmente se analizó el genoma de la cepa *Streptomyces thermocarboxydus* K155 (número de acceso de NCBI: PRJNA312938) por medio del programa en línea antiSMASH para la búsqueda BGCs de metabolitos secundarios. El genoma de *S. thermocarboxydus* K155 tiene un tamaño de 7,388,025 pb, con un contenido de GC de 72.26%, y un número aproximado de 6,851 genes.

Cuando se sube el genoma de la cepa al programa antiSMASH en formato FASTA, éste predice los marcos abiertos de lectura (ORFs) *de novo*. A partir de esa predicción, realiza la búsqueda de los clústeres biosintéticos utilizando diferentes herramientas especializadas para cada grupo químico de metabolitos (40).

Los potenciales BGCs encontrados dentro del genoma de *S. thermocarboxydus* K155 reportados por antiSMASH fueron terpenos, policétido sintasas (PKS) tipo 1, 2 y 3, sideróforos y un lantipéptido de nuestro interés (figura 10).

Region	Type	From	To
Region 1	thioamitides	45,138	67,532
Region 2	lanthipeptide-class-i	197,686	222,202
Region 3	T3PKS	251,502	292,575
Region 4	terpene	460,573	482,572
Region 5	T2PKS	706,660	778,251
Region 6	T2PKS , RRE-containing	1,032,483	1,105,031
Region 7	ectoine	1,660,247	1,670,645
Region 8	siderophore	2,666,778	2,677,701
Region 9	RRE-containing	4,727,155	4,748,390
Region 10	terpene	4,889,058	4,909,881
Region 11	RiPP-like	5,781,033	5,791,646
Region 12	T1PKS , terpene	5,793,787	5,849,450
Region 13	siderophore	6,004,623	6,017,805
Region 14	terpene	6,426,174	6,452,016
Region 15	RiPP-like	6,855,627	6,865,842
Region 16	terpene	7,314,063	7,335,064

Figura 10. Tabla con los resultados obtenidos del análisis del genoma de la cepa *S. thermocarboxydus* K155 por medio del programa en línea antiSMASH 6.0 para la búsqueda BGCs.

De acuerdo con antiSMASH se predice un BGC para la producción de un lantipéptido de clase I. Como se mencionó en los antecedentes, esta clase de lantipéptidos está constituida por tres genes que corresponden al péptido precursor y a los genes de las enzimas modificadoras (ciclasa y deshidratasa). En este caso particular, el BGC está conformado por tres genes biosintéticos *lanA* (péptido precursor), *lanB* (deshidratasa) y *lanC* (ciclasa) (tabla 11).

Tabla 11. Características de genes biosintéticos asociados a la producción de un lantipéptido de clase I en la cepa *S. thermocarboxydus* K155.

Nombre del gen	Tipo de gen biosintético	Tamaño (nt)	Función
<i>lanA</i>	adicional	162	Péptido precursor
<i>lanB</i>	principal	3144	Deshidratasa
<i>lanC</i>	principal	1377	Ciclasa

La secuencia de aminoácidos del péptido precursor del lantipéptido de clase I de *S. thermocarboxydus* K155 se comparó con secuencias de péptidos precursores de otros lantipéptidos de la misma clase ya reportados en la literatura, provenientes de actinobacterias; empleando el programa en línea Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), se observó que se encuentran conservados los dominios LDLD o FXLD (figura 11), involucrados en el reconocimiento de las enzimas modificadoras.

```

LanA_K155                MRTEIVL---SQDAPELDLDLDRVSDLPDQAESFGQG---TYTSPSSYAIGTRCPVCC
LanA_EmbleyaNF3_2.4     MTDRIILLEETTETRDFVLDLDRVIAEGELRAADFGKDCPVTYSPNATSGVQSRICIPCC
PspA_Planosporicin      -MGISSPALPQNTADLFQLDLEIGVEQSLASPAIT--SVSWCTPGCTSEGGGSGCSHCC
MibA_Microbisporicin    MPADILETRTSETEDLLDLDSIGVEEITAGPAVT--SWSLCTPGCTSPGGGNSCSFCC
  
```

Figura 11. Alineamiento local múltiple de LanA de *S. thermocarboxydus* K155, mostrando el dominio LDLD/FXLD conservado. LanA_EmbleyaNF3_2.4 secuencia LanA de lantipéptido de clase I del clúster 2.4 de *Embleya* sp (Roblero, 2023). PspA secuencia LanA de planosporicina producido por *Planomonospora alba* (NCBI CCQ18695.1). MibA secuencia LanA de microbisporicina producido por *Microbispora corallina* (NCBI ADK32554.1).

Para el análisis de la deshidratasa LanB (figura 12), primero se realizó un modelo por homología de la estructura de la proteína empleando el programa en línea Swiss Model (<https://swissmodel.expasy.org>).

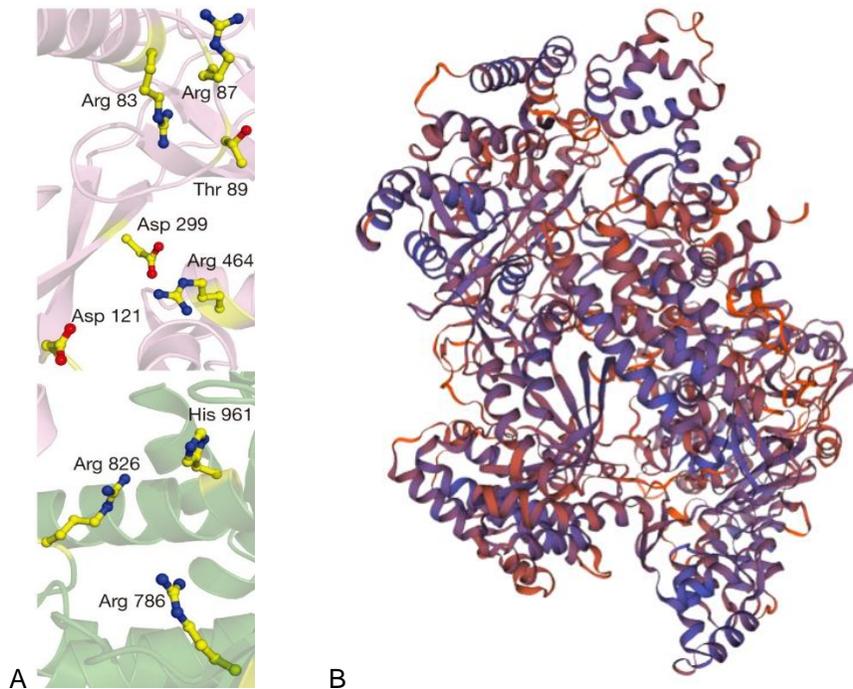


Figura 12. Modelo de la estructura de LanB de la cepa *S. thermocarboxydus* K155. Aminoácidos conservados del sitio catalítico de la enzima NisB (A). Modelo obtenido con el programa en línea Swiss Model (B).

El modelo está basado en NisB, que corresponde a la deshidratasa para la biosíntesis de la nisina con una identidad total del 17.31% (figura 12B). Se buscaron los aminoácidos del sitio catalítico de NisB (figura 12A) para verificar que estuvieran conservados en LanB.

El alineamiento de LanB con otras enzimas ya identificadas por el programa antiSMASH asociado a la base de datos MiBIG Hits, muestra la conservación de todos los aminoácidos del sitio catalítico de la proteína reportados en la literatura (figura 13). No se muestra el alineamiento de la secuencia completa, solo de las regiones donde se encuentran los aminoácidos del sitio catalítico.



Figura 13. Alineamiento local múltiple de regiones correspondientes a LanB de *S. thermocarboxydus* K155, señalando la conservación de aminoácidos del sitio catalítico. Las secuencias, en orden, empleadas para el alineamiento corresponden a los lantipéptidos microbisporicina (*Microbispora corallina*), paenibacilina (*Paenibacillus polymyxa* OSY-DF), subtilomicina (*Bacillus subtilis*), nisina (*Lactococcus lactis*), penisina

(*Paenibacillus ehmensis*), paenicidina (*Paenibacillus polymyxa*), geobacilina (*Geobacillus thermodentrificans* NG80-2) y nisina O (*Blautia obeum*).

De igual manera, se realizó la predicción de la estructura de la enzima ciclasa, LanC (figura 14B). En este caso se utilizó a la ciclasa NisC como templado para el modelo, con una identidad de 21.24%. Como en el caso de NisB, se buscaron los aminoácidos del sitio catalítico (figura 14A) reportados en esta proteína.

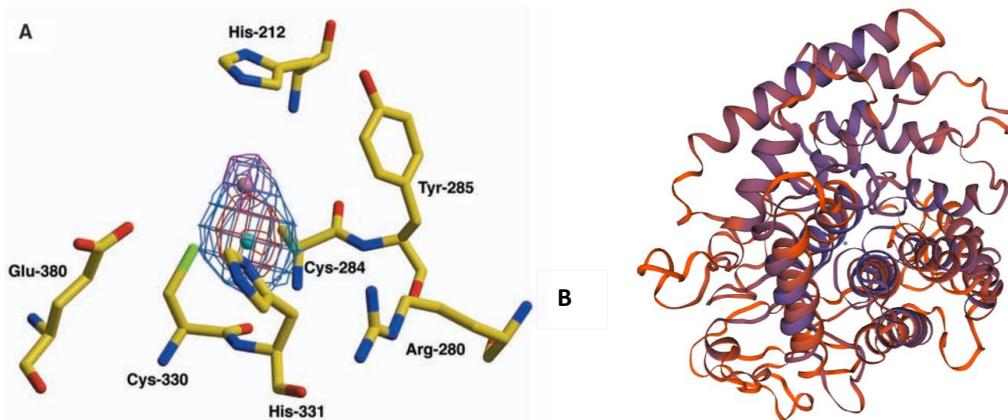


Figura 14. Modelo de la estructura de LanC de la cepa *S. thermocarboxydus* K155. Aminoácidos conservados del sitio catalítico de la enzima NisC (A). Modelo obtenido con el programa en línea Swiss Model (B).

El alineamiento de NisC con LanC (figura 15) muestra la conservación de la mayoría de los aminoácidos del sitio catalítico de la proteína reportados en la literatura. Solamente el aminoácido 314 de la secuencia de LanC presenta un cambio de arginina (R) a triptófano (W). Nuevamente, no se muestra el alineamiento de la secuencia completa, solo de las regiones donde se encuentran los aminoácidos del sitio catalítico.



Figura 15. Alineamiento local múltiple de regiones correspondientes a LanC de *S. thermocarboxydus* K155, señalando la conservación de aminoácidos del sitio catalítico.

6.2 Diseño y síntesis de *lanA* con codones optimizados para su expresión en *E. coli*.

En este punto debemos mencionar que en un inicio se realizaron varios intentos de clonación tradicional, amplificando el gen *lanA* por PCR, digiriendo el plásmido de expresión pQE31 y ligando con ligasa T4 o utilizando ensamble de Gibson con el vector pRSFDuet-1. En ninguno de los ensayos realizados se obtuvieron transformantes. Por ello, se decidió sintetizar el gen *lanA* con codones preferenciales para su expresión en *E. coli*. Al gen optimizado se le adicionó un sitio de corte para la proteasa Furin en la región final del péptido líder. Esto se hizo

porque se sabe que en general, los lantipéptidos son inactivos cuando tienen su secuencia líder, por ello, hay que removerla al final de su modificación. El diseño de la construcción con el gen sintético incluyó el uso del plásmido pD421, que permite la expresión de proteínas bajo el promotor T5, regulado por el represor *lacI*, tiene un tallo de histidinas en la región amino terminal y tiene como marcador, un gen de resistencia a kanamicina (figura 16).

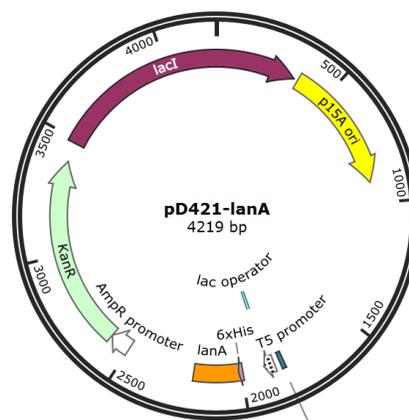


Figura 16. Mapa del plásmido pD421-lanA.

La construcción sintética fue transformada en una cepa de *E. coli* para clonación (Top10). Una vez verificada la construcción, se procedió con los ensayos de expresión.

6.3 Expresión heteróloga en *E. coli* BL21 (DE3)

La construcción pD412-lanA, se transformó en la cepa de expresión de *E. coli* BL21 (DE3). A pesar de que el plásmido tiene un promotor T5, el proveedor de la construcción señala que es posible expresar la proteína en cualquier otra cepa de *E. coli* y recomienda el uso de BL21. El primer ensayo de expresión se realizó a un

tiempo de inducción de 4 h variando las concentraciones de inductor de 0, 0.25, 0.5, 0.75 y 1 mM de IPTG (figura 17).

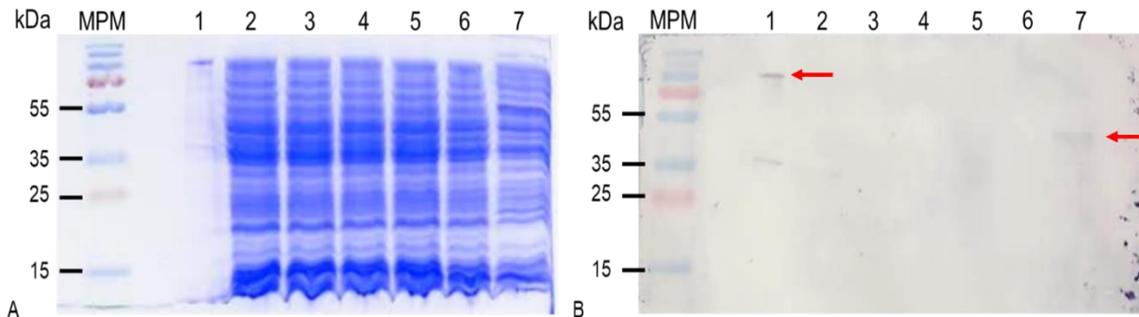


Figura 17. Ensayo de expresión de LanA en *E. coli* BL21 (DE3). Inducción de LanA con IPTG 0-1 mM. 4 h. A) Gel de electroforesis desnaturante al 14% de poliacrilamida y teñido con azul de Coomassie. Carriles: 1. Control positivo: ACR-DFA, 2. LanA sin IPTG, 3. LanA IPTG 0.25 mM, 4. LanA IPTG 0.5 mM, 5. LanA IPTG 0.75 mM, 6. LanA IPTG 1 mM, 7. Control positivo: bacteriocina 6.3. B) western blot empleando Anti-6XHis de ratón como anticuerpo primario y Anti-mouse IgG como anticuerpo secundario. 1. Control positivo: Proteína recombinante α -cristalina de *Mycobacterium tuberculosis* (ACR-DFA) (71.4 kDa), 7. Control positivo: bacteriocina 6.3 (44.4 kDa). Ambos controles cuentan con etiqueta de histidinas 6XHis.

En el gel de poliacrilamida no se observó ninguna banda que apareciera al inducir con el IPTG, aún a 1 mM. Lo mismo se observó en el western blot, en donde solamente se aprecia la banda correspondiente al control positivo (ACR-DFA y bacteriocina de *Streptomyces* sp.). Pensando que podría necesitarse de mayor tiempo de inducción, se realizó el mismo ensayo, pero a 16 h de incubación con el inductor (figura 18).

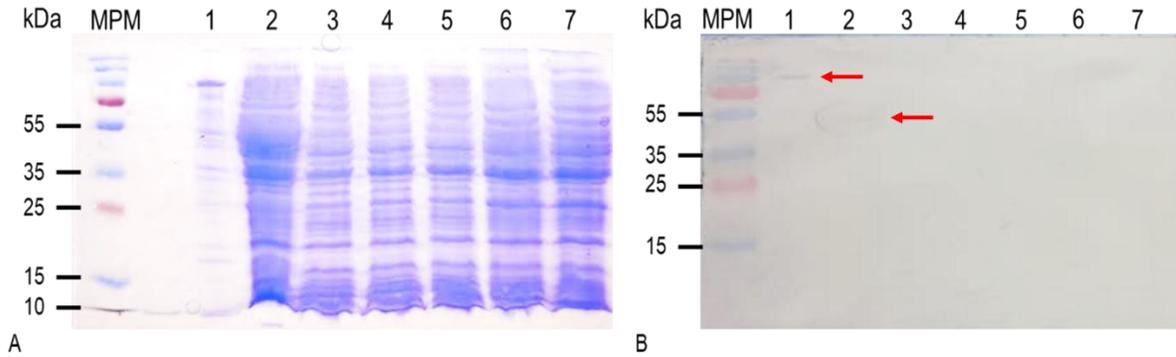


Figura 18. Ensayo de expresión de LanA en *E. coli* BL21 (DE3). Inducción de LanA con IPTG 0-1 mM. 16 h. A) Gel de electroforesis desnaturalizante al 14% de poliacrilamida y teñido con azul de Coomassie. Carriles: 1. Control positivo: ACR-DFA (, 2. Control positivo: bacteriocina 6.3, 3. LanA sin IPTG, 4. LanA IPTG 0.25 mM, 5. LanA IPTG 0.5 mM, 6. LanA IPTG 0.75 mM, 7. LanA IPTG 1 mM. B) western blot empleando Anti-6XHis de ratón como anticuerpo primario y Anti-mouse IgG como anticuerpo secundario. 1. Proteína recombinante α -cristalina de *Mycobacterium tuberculosis* (ACR-DFA) (71.4 kDa), 7. Control positivo: bacteriocina 6.3 (44.4 kDa). Ambos controles cuentan con etiqueta de histidinas 6XHis.

Sin embargo, tampoco se percibe el aumento o aparición de una banda que indique la expresión de LanA (peso teórico de 6.2 kDa), tanto en la tinción del gel de poliacrilamida con azul de Coomassie como en el western blot. Especulando que la regulación por el promotor T5 es tan fuerte que no permite la expresión adecuada de la proteína, se decidió cambiar de plásmido.

6.4 Subclonación del gen *lanA* optimizado en pRSFDuet-1

El gen *lanA* optimizado se clonó en el vector de expresión pRSFDuet-1. Este plásmido tiene dos sitios de clonación múltiple, los cuales cuentan con el promotor T7 bajo la regulación del represor *lacI*, y como marcador, el gen de resistencia a kanamicina. Para la construcción, se seleccionó el primer sitio de clonación, pues también cuenta con el tallo de histidinas. Se diseñó la nueva construcción usando

el programa Serial cloner (http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html) para diseñar también cebadores que permitieran que el gen *lanA* quedara en marco de lectura con el tallo de histidinas (figura 19).

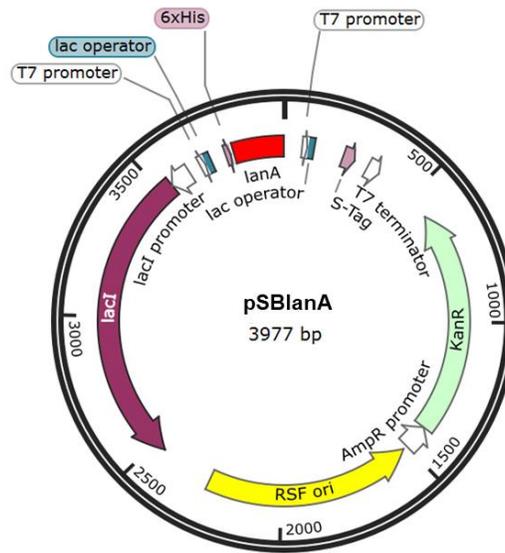


Figura 19. Mapa de construcción pSBlanA.

6.4.1 Amplificación de *lanA* optimizado

Una vez sintetizados los cebadores se llevó a cabo la reacción de PCR para amplificar el gen *lanA* optimizado a partir de la construcción pD421-*lanA* en *E. coli* BL21(DE3). Una búsqueda de temperaturas de alineamiento de 59 a 69°C, permitió determinar la temperatura óptima de 59°C al obtener una banda nítida de 182 pb (figura 20A) que corresponde al peso del gen *lanA*. La posterior digestión enzimática con *EcoRI* y *HindIII* y purificación de banda correspondiente a *lanA* se muestra en la figura 20B.

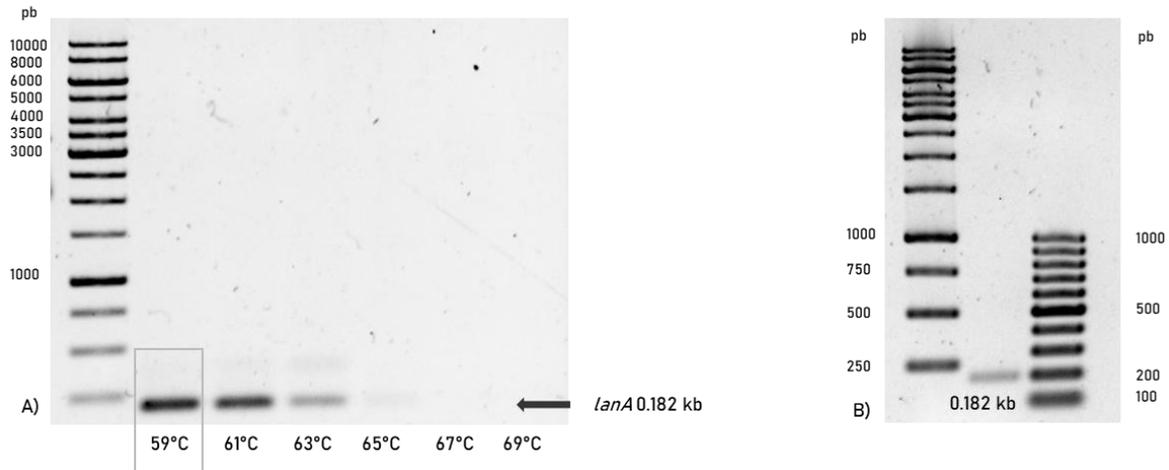


Figura 20. Amplificación del gen *lanA* por PCR. A) Barrido para búsqueda de condiciones de amplificación de *lanA*. B) Amplificación y purificación de *lanA*.

6.4.2 Ensayo de restricción del plásmido

A su vez, se digirió el plásmido pRSFDuet-1, nuevamente con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* y se purificó la banda de 3.8 kb (figura 21).

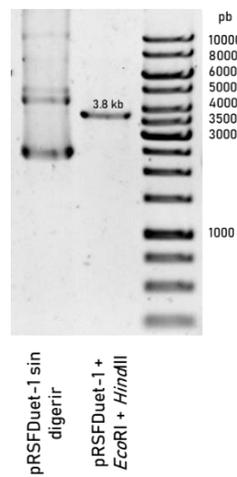


Figura 21. Digestión del vector pRSFDuet-1 con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*.

6.4.3 Ensayo de restricción de colonias transformantes

Tras la ligación del gen *lanA* con pRSFDuet-1 y su transformación en la cepa de clonación *E. coli* DH5 α , se obtuvieron 12 colonias transformantes, de éstas, se seleccionaron 3 al azar para corroborar la construcción pSBlanA. El ensayo consistió en realizar una digestión con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*, donde se observaría una banda de 182 pb (*lanA*) y una banda de 3.8 kb (pRSFDuet-1) si la construcción es correcta. La predicción de este patrón de bandas se observa en dos de las colonias seleccionadas (figura 22) por lo que ambas muestras se secuenciaron para corroborar la presencia e integridad de *lanA*.

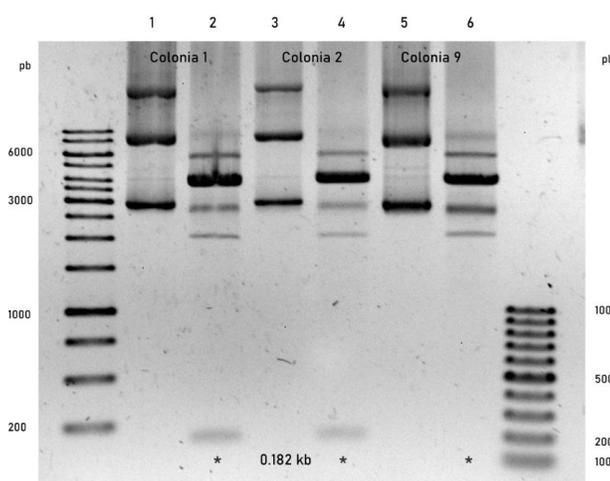


Figura 22. Digestión de colonias transformantes 1, 2 y 9 con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*.

Carriles 1, 3 y 5 corresponden al plásmido sin digerir, carriles 2, 4 y 6 corresponden al plásmido digerido

6.4.4 Secuenciación de clonas positivas

Los resultados de secuenciación de las colonias 1 y 2 se presentan en la figura 23, se comprobó la pureza de las muestras al observar picos bien definidos correspondientes a cada base y el alineamiento con la secuencia original descarta la presencia de mutaciones puntuales en nuestra construcción (Figura 24).

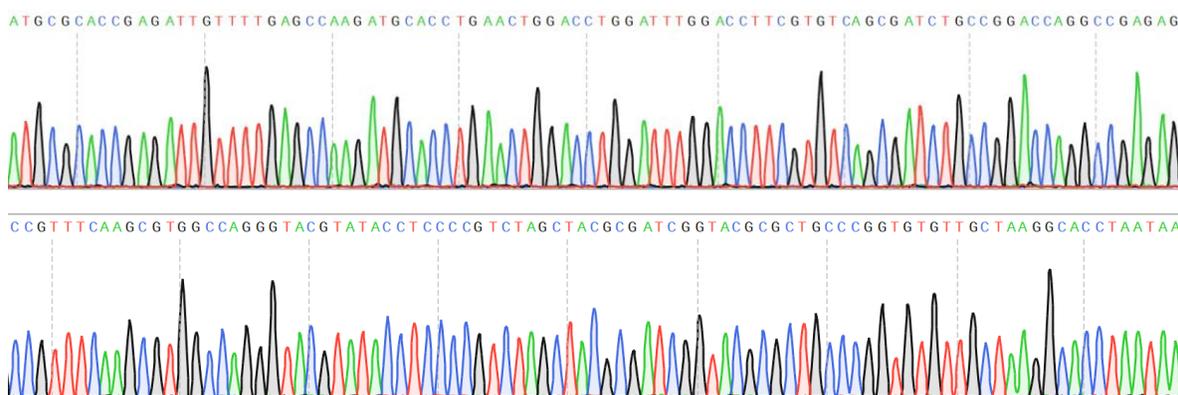


Figura 23. Electroferograma de gen *lanA* (colonia 1).

lanA_K155	-----ATGCGCACCGAGATTGTTTTGAGCCAAGATGCACC	35
Sec_col1	TCACCACAGCCAGGATCCGAATTCATGCGCACCGAGATTGTTTTGAGCCAAGATGCACC	179
Sec_col2	TCACCACAGCCAGGATCCGAATTCATGCGCACCGAGATTGTTTTGAGCCAAGATGCACC	180

lanA_K155	TGAACTGGACCTGGATTTGGACCTTCGTGTCAGCGATCTGCCGGACCAGGCCGAGAGCCG	95
Sec_col1	TGAACTGGACCTGGATTTGGACCTTCGTGTCAGCGATCTGCCGGACCAGGCCGAGAGCCG	239
Sec_col2	TGAACTGGACCTGGATTTGGACCTTCGTGTCAGCGATCTGCCGGACCAGGCCGAGAGCCG	240

lanA_K155	TTTCAAGCGTGCCAGGGTACGTATACCTCCCGTCTAGCTACGCGATCGGTACGCGCTG	155
Sec_col1	TTTCAAGCGTGCCAGGGTACGTATACCTCCCGTCTAGCTACGCGATCGGTACGCGCTG	299
Sec_col2	TTTCAAGCGTGCCAGGGTACGTATACCTCCCGTCTAGCTACGCGATCGGTACGCGCTG	300

lanA_K155	CCCGGTGTGTTGCTAAGGCACCTAATAA-----	183
Sec_col1	CCCGGTGTGTTGCTAAGGCACCTAATAAAAGCTTGC GGCCGATAATGCTTAAGTCGAAC	359
Sec_col2	CCCGGTGTGTTGCTAAGGCACCTAATAAAAGCTTGC GGCCGATAATGCTTAAGTCGAAC	360

Figura 24. Alineamiento de gen *lanA* optimizado con los resultados de secuenciación de colonias positivas. lanA_K155 corresponde a la secuencia original de *lanA* optimizado, Sec_col1 y Sec_col2 corresponden a las muestras secuenciadas.

6.5 Ensayos de expresión de LanA

La construcción pSBlanA se transformó en las cepas de expresión de *E. coli* BL21 (DE3), BL21 (DE3) pLysS y Rosetta. Esto se hizo para encontrar la mejor cepa que expresara el péptido, proponiendo que las distintas características entre cepas puedan variar la expresión de LanA.

6.5.1 *E. coli* BL21 (DE3)

El primer ensayo de expresión se realizó en *E. coli* BL21 (DE3) con una concentración de inductor de 1 mM de IPTG y variando el tiempo de inducción de 1, 4 y 16 h a 37°C, y 16 h a 29°C (figura 25).

En el gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie no se observó la aparición de una banda por debajo de 10 kDa, comparando con la muestra sin inductor, que indicara la expresión de LanA con un peso teórico de 6.2 kDa. Adicionalmente, se realizó el ensayo de western blot empleando un anticuerpo primario contra la etiqueta de histidinas, donde únicamente se observó la señal correspondiente a los controles positivos, la proteína ACR-DFA y bacteriocina 6.3 (dato no mostrado).

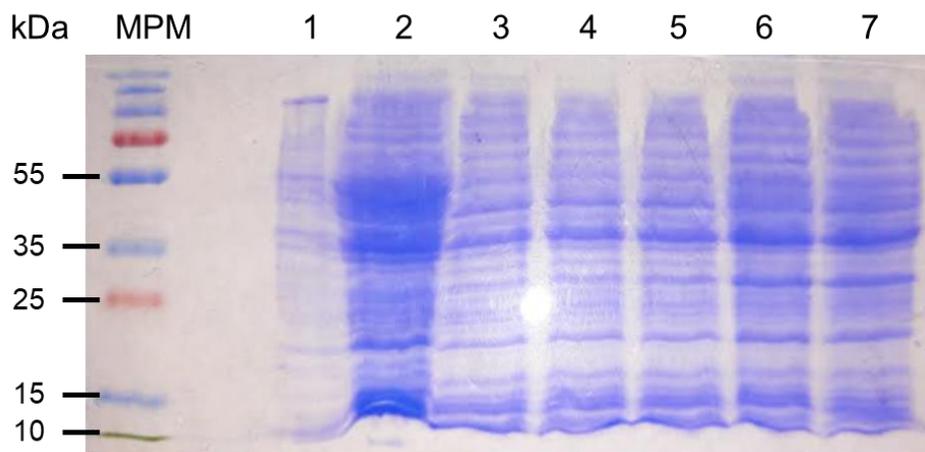


Figura 25. Ensayo de expresión de LanA en *E. coli* BL21 (DE3). Gel de electroforesis desnaturalizante al 14% de poliacrilamida y teñido con azul de Coomassie. Inducción de LanA con IPTG 1 mM. 0-16 h. Carriles: 1. Control positivo: ACR-DFA (71.4 kDa), 2. Control positivo: bacteriocina 6.3 (44.4 kDa), 3. Control negativo LanA sin IPTG, carriles 4 a 6 muestras con 1 mM de IPTG incubadas a 37°C por: 4. 1 h, 5. 4 h, 6. 16 h y 7. LanA IPTG 1 mM, 16 h, 29°C.

6.5.2 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS y Rosetta

Simultáneamente, se realizaron los ensayos de expresión en las cepas *E. coli* BL21 (DE3) pLysS y *E. coli* Rosetta, siguiendo los mismos parámetros que la expresión en *E. coli* BL21 (DE3) (sección 6.5.3).

Utilizando estas cepas se observó la aparición de bandas de proteína, en comparación con las muestras sin inductor, lo que podría indicar que se está expresando LanA; sin embargo, en ambas cepas estas bandas se observan en un peso superior al teórico de 6.2 kDa.

Para el caso de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Figura 26), se observa la aparición de una banda desde la primera hora de inducción, que se hace mucho más visible en las muestras correspondientes a 16 h, indicando la expresión de una proteína entre 15 y 25 kDa.

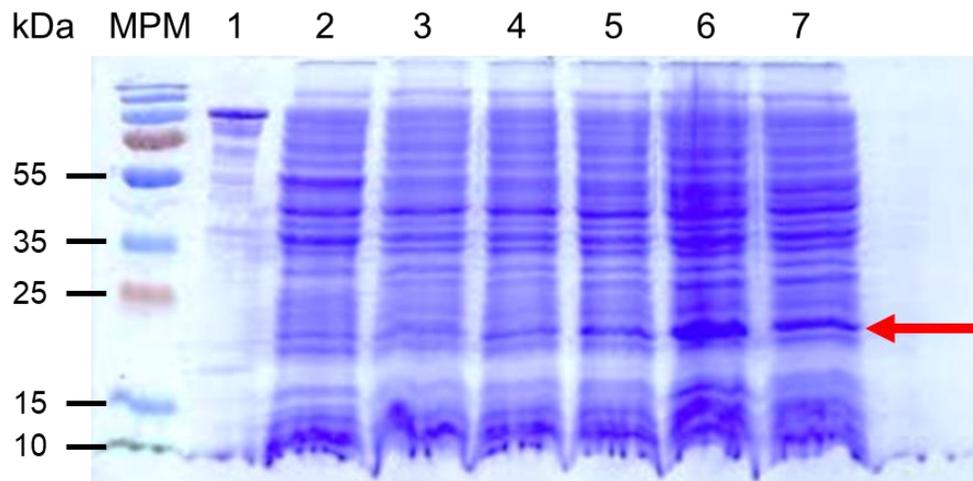


Figura 26. Ensayo de expresión en *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Inducción de LanA con IPTG 1 mM. 0-16 h. Gel de electroforesis desnaturizante al 14% de poliacrilamida y teñido con azul de Coomassie. 1. Control positivo: ACR-DFA (71.4 kDa), 2. Control positivo: bacteriocina 6.3 (44.4 kDa), 3. LanA sin IPTG, 4. LanA IPTG 1 mM, 1 h, 37°C 5. LanA IPTG 1 mM, 4 h, 37°C, 6. LanA IPTG 1 mM, 16h, 37°C, 7. LanA IPTG 1 mM, 16 h, 29°C.

Para la cepa *E. coli* Rosetta (figura 27) se observa la aparición de dos bandas de proteína, principalmente en las muestras correspondientes a 16 h, tanto a 37°C como a 29°C, una de estas se encuentra nuevamente entre 15 y 25 kDa y la segunda por arriba de 25 kDa.

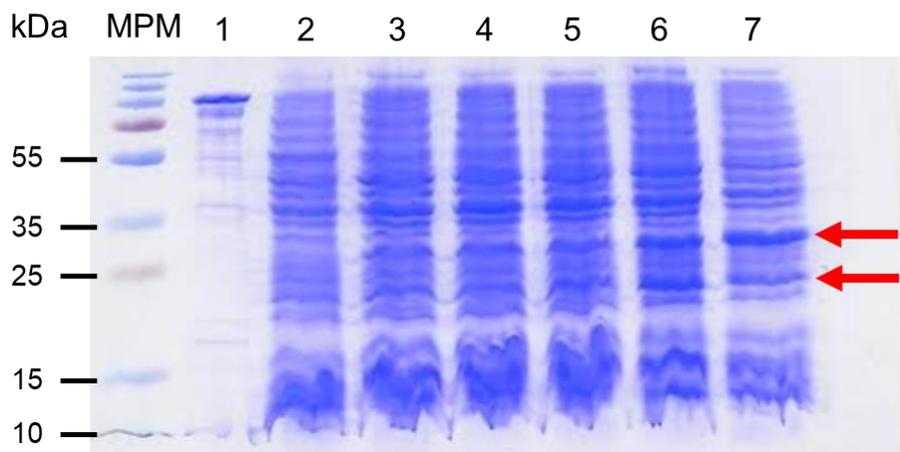


Figura 27. Ensayo de expresión de LanA en *E. coli* Rosetta. Gel de electroforesis desnaturalizante al 14% de poliacrilamida y teñido con azul de Coomassie. Carriles: 1. Control positivo: ACR-DFA (71.4 kDa), 2. Control positivo: bacteriocina 6.3 (44.4 kDa), 3. LanA sin IPTG, carriles 4 a 6 LanA inducido con IPTG 1 mM a 37°C incubado durante: carril 4. 1 h, carril 5. 4 h, carril 6. 16 h y carril 7. LanA IPTG 1 mM, 16 h, 29°C.

6.5.3 Ensayo de expresión con represor en *E. coli* BL21 (DE3) pLysS y *E. coli* Rosetta

Se realizó un segundo ensayo de expresión en las cepas de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS y Rosetta empleando glucosa como represor del promotor T7. En este caso, donde únicamente se indujo la expresión de LanA con IPTG 1mM durante 1 y 4 h a 37°C, el gel de poliacrilamida (figura 28) muestra nuevamente la aparición de una

banda a las 4 horas de inducción entre 15 y 25 kDa en ambas cepas comparada con la muestra sin inductor, asociándola a la producción de LanA.

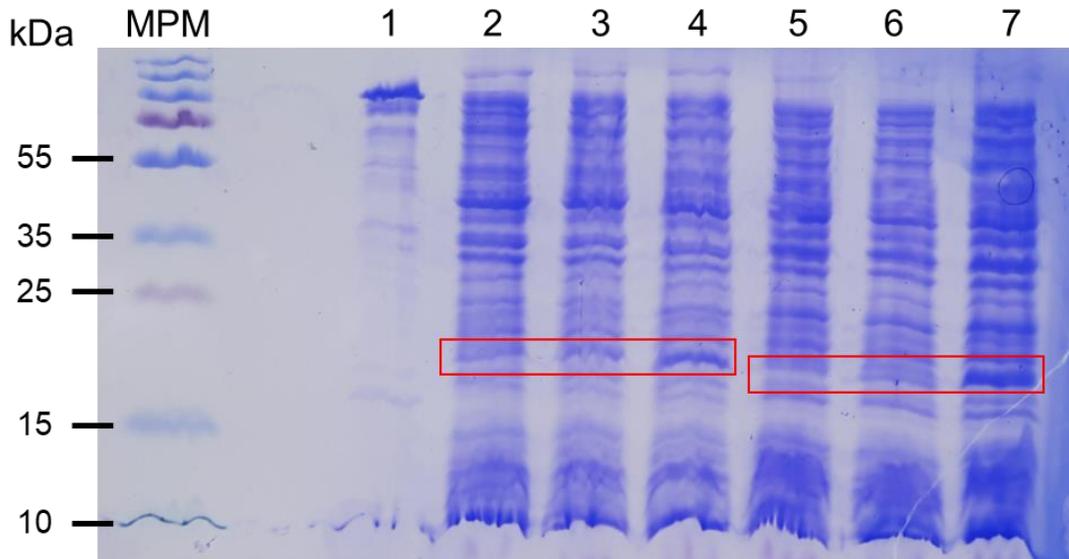


Figura 28. Ensayo de expresión de LanA en *E. coli* BL21 (DE3) pLyss y *E. coli* Rosetta. Gel de electroforesis desnaturalizante al 14% de poliacrilamida y teñido con azul de Coomassie. Carril 1. Control positivo: ACR-DFA (71.4 kDa), carriles 2 a 4, *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, carril 2: LanA sin IPTG, carril 3. LanA IPTG 1 mM, 1h, carril 4. LanA IPTG 1 mM, 4 h, carriles 5 a 7 *E. coli* Rosetta, carril 5. LanA sin IPTG, carril 6. LanA IPTG 1 mM, 1h, carril 7. LanA IPTG 1 mM, 4 h.

Es importante mencionar que por cada ensayo de expresión se realizó un western blot con anticuerpo primario Anti-6XHis donde únicamente se observó la señal correspondiente al control positivo ACR-DFA (empleado como control de reactivos y protocolo) y la bacteriocina 6.3, (empleado como control de inducción), independientemente de la cepa empleada. Pensando que las condiciones en las que se llevó a cabo la transferencia de proteínas o el western blot no eran las adecuadas para observar la señal correspondiente a LanA, se modificaron el tiempo y voltaje en transferencias y las concentraciones de anticuerpos y tiempos de incubación en los ensayos de western blot; sin embargo, en todos los casos se

obtuvo el mismo resultado. Finalmente, se propone que la ausencia de señal se debe a la falta de exposición de la etiqueta de histidinas.

7 Discusión

El análisis bioinformático del genoma de *S. thermocarboxydus* K155 con el programa en línea antiSMASH brindó la predicción de 16 regiones, asociando cada región a la producción de un metabolito secundario. Se empleó esta herramienta de búsqueda ya que es el software más completo utilizado para minería genómica, pues permite detectar hasta 81 clases diferentes de BGCs a la fecha (41, 42). De estas 16 regiones (posibles BGCs), sólo una sugiere la producción de un lantipéptido de clase I (Figura 10), haciendo de interés su estudio por su potencial como antimicrobiano. Al analizar la secuencia del BGC, se encuentran los componentes biosintéticos asociados a la producción y maduración de un lantipéptido de clase I, los cuales son el péptido precursor LanA, la enzima deshidratasa LanB y la enzima ciclasa LanC (43). Aunque se han descrito otros componentes en el BGC de lantipéptidos de clase I asociados al transporte (LanT), escisión (LanP), regulación (LanK y LanR) e inmunidad (LanIEFG) (42) del péptido maduro, estos no se encontraron dentro del clúster de *S. thermocarboxydus* K155. Sin embargo, la presencia de los genes mínimos para su biosíntesis es suficiente, para dar continuidad al estudio.

Siguiendo con el análisis bioinformático, se realizaron alineamientos locales múltiples de la secuencia de aminoácidos de LanA, LanB y LanC (individualmente) de *S. thermocarboxydus* K155 con secuencias de otros lantipéptidos ya reportados

en la literatura, este análisis permitió la búsqueda de los residuos conservados indispensables para la función de cada proteína involucrada en la biosíntesis del lantipéptido.

El alineamiento local múltiple del péptido precursor LanA, muestra el motivo conservado “LDLD” (Figura 11) característico de actinobacterias, y equivalente a “FXLD” y “FNLD” en otros organismos. Éste es un motivo conservado en el péptido líder de lantipéptidos de clase I que parece tener un papel importante en la interacción directa entre las enzimas modificadoras y el péptido precursor para formar el péptido maduro (44).

La presencia de todos los aminoácidos del sitio catalítico de la enzima LanB (figura 13), sugiere que será capaz de catalizar la reacción de deshidratación. En general estas enzimas llevan a cabo su acción por medio de dos reacciones, la glutamilación de las cadenas laterales de los residuos serina y treonina, seguido por la eliminación del glutamato, resultando en la formación de los residuos didehidroalanina y didehidrobutirina (45).

Respecto a LanC, el resultado del alineamiento muestra la presencia de casi todos los aminoácidos del sitio catalítico, excepto por la posición 314 de nuestra secuencia de estudio, que presenta un triptófano en lugar de arginina (figura 15). La enzima LanC es responsable de formar los puentes tioéter entre los residuos cisteína y didehidroalanina o didehidrobutirina. Según la literatura, es probable que esta arginina esté involucrada en la química ácido-base de la reacción de ciclización, donde su papel puede ser posicionar y activar una molécula de agua (46). Esto puede sugerir que, al cambiarse por un triptófano, se pierda o altere la función de la

proteína, pues este aminoácido es aromático, no polar y se caracteriza por su baja interacción con moléculas de agua debido a su hidrofobicidad (47). A raíz de este análisis se propone realizar una mutagénesis dirigida en LanC para cambiar el triptófano por arginina para que la enzima pueda desempeñar su función de ciclasa y dar como resultado el péptido maduro.

Los resultados del análisis bioinformático muestran el potencial para obtener un lantipéptido de clase I, lo que permite el desarrollo de una estrategia para producir el metabolito de manera heteróloga, pues esta técnica permite manipular la producción de metabolitos de una forma más rápida y fácil comparada con la cepa productora (41). Como primer objetivo, se planteó producir en un hospedero heterólogo el péptido precursor LanA.

Se optó por sintetizar y optimizar el gen *lanA*, debido a las complicaciones presentadas en la estrategia de clonación tradicional y por ensamble de Gibson a partir de la secuencia original rica en GC de la cepa *S. thermocarboxydus* K155. Se eligió a *E. coli* como hospedero heterólogo, pues presenta distintas ventajas como rápido crecimiento, genética ampliamente estudiada y medios de cultivo accesibles (48). La optimización del gen *lanA* consistió en sustituir codones poco usuales para el hospedero por codones de uso frecuente, para aumentar el nivel de expresión de proteína recombinante (49). En *lanA* significó la disminución del porcentaje GC de 66.7% a 57.4% en el uso de codones. Adicionalmente, como se menciona en la sección 5.3, se agregó la secuencia de reconocimiento de la proteasa Furin en el péptido líder ya que es necesaria su proteólisis para que el lantipéptido pueda ser activo (50). Esta proteasa ha mostrado resultados favorables al emplearse en un

lantipéptido de clase I proveniente de *Embleya* sp. y expresado en *E. coli*. El lantipéptido fue modificado en la cepa hospedera e hidrolizado *in vitro*, de esta forma presentó actividad antibiótica contra *Micrococcus luteus* (35). Se tuvo cuidado que la adición del dicho sitio de reconocimiento no modificara la acción de las enzimas biosintéticas mediante un análisis *in silico* con el programa RiPPMiner (http://www.nii.ac.in/~priyesh/lantipepDB/new_predictions/index.php#/~priyesh/lantipepDB/new_predictions/index.php) que predice estructuras químicas de RiPPs (51).

Cuando se utilizó el plásmido de expresión con el promotor T5, no hubo producción del péptido LanA (peso teórico de 6.2 kDa según la herramienta ProtParam de ExPASy [<https://web.expasy.org/protparam/>]), como se observa en los geles teñidos con azul de Coomassie (figuras 17A y 18A), pues comparado con el control negativo (muestra no inducida) no se observa la aparición de alguna banda de proteína. Posterior a los geles de electroforesis, se transfirieron las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa con tamaño de poro de 0.2 µm, tamaño recomendado para proteínas pequeñas menores a 15 kDa (52). Con la membrana se realizó un ensayo de western blot para identificar a LanA-6XHis de entre todas las proteínas que produce *E. coli*. Ambos ensayos (figura 17B y 18B) muestran solamente la señal correspondiente a los controles positivos, una bacteriocina tipo III proveniente de *Streptomyces* (53) y la proteína ACR-DFA, confirmando que no se está expresando el péptido LanA. Es probable que no se esté expresando el péptido porque la cepa BL21 (DE3) no tiene un reconocimiento eficiente del promotor T5 en comparación con una cepa como M15 que fue modificada para su uso con plásmidos expresados bajo el promotor T5. Sin embargo, en nuestro caso específico, no era conveniente

emplear a *E. coli* M15 porque contiene el plásmido pREP4 que confiere resistencia a kanamicina (54) al igual que el plásmido pD421-lanA, lo cual dificultaría la selección de colonias con ambos plásmidos.

Ya que con las condiciones de expresión probadas con el plásmido pD421 no se obtuvo el péptido LanA, se decidió probar la expresión bajo el control del promotor T7. Para ello se subclonó el gen optimizado *lanA* en el vector pRSFDuet-1 que cuenta con el promotor T7. De esta manera fue posible realizar los ensayos de expresión en las cepas de *E. coli* BL21 (DE3), BL21 (DE3) pLysS y Rosetta. Estas contienen el profago lambda DE3 que contiene el gen de la ARN polimerasa T7 bajo el promotor de *lacUV5* permitiendo que su expresión sea inducida con IPTG, además de que son deficientes en las proteasas Lon y OmpT lo cual reduce la degradación de proteínas heterólogas expresadas en las células (55). Adicionalmente, *E. coli* BL21 (DE3) pLysS contiene el plásmido pLysS que expresa constitutivamente a la lisozima T7 la cual inhibe la expresión de las proteínas al unirse a la RNA polimerasa T7 hasta su inducción con IPTG, reduciendo la expresión basal de genes recombinantes (56). Finalmente, la cepa *E. coli* Rosetta está diseñada para mejorar la expresión de genes con “codones poco usuales” para *E. coli* pues contiene ARNt para los codones AGG, AGA, AUA, CUA, CCC y CGA dentro de un plásmido con resistencia a cloranfenicol (55).

En los ensayos de expresión en *E. coli* BL21 (DE3) pLysS y *E. coli* Rosetta se observó la aparición de bandas que sugieren la expresión de una proteína tras inducir con IPTG (figura 26 y figura 27). Lo anterior se confirmó en un segundo ensayo de inducción, empleando glucosa como represor antes de inducir con IPTG.

La presencia de glucosa evita que la enzima adenilato ciclasa, sintetice el AMPc necesario para activar la transcripción de los genes del operón *lac*, además de que la glucosa también evita el transporte del inductor (57). En el plásmido pRSFDuet-1 la expresión del péptido se encuentra bajo la regulación del represor LacI, por lo que se impide la síntesis de LanA en presencia de glucosa en el medio. El resultado, como se observa en la figura 28 fue el aumento de una sola banda en ambas cepas entre 15 y 25 kDa en presencia del inductor. Sorprendentemente esta banda no corresponde al peso teórico de LanA, se propone que distintas unidades de péptidos se estuvieran agrupando formando trímeros. Esta agregación puede ocurrir por la interacción con las histidinas de la etiqueta pues, aunque debido a su tamaño tan pequeño se piensa que causan perturbaciones mínimas en la estructura y función de las proteínas con las que se fusionan, existe evidencia que sugiere que las histidinas pueden interferir con las interacciones entre proteínas, causando que estas se agreguen, cambien su solubilidad y/o afecten el estado de oligomerización (58).

Anteriormente, Ramírez-Rendón y González-López (tesis en proceso), observaron este mismo comportamiento en el péptido precursor de un lantipéptido de clase I de la actinobacteria *Micromonospora echinospora* que presentó un peso aproximado de 25 kDa cuando el teórico corresponde a 7 kDa. Sin embargo, este se encontró en la fracción insoluble y fue posible identificarlo mediante la técnica western blot. Sería interesante seguir este protocolo y analizar si en la fracción insoluble también se observan bandas que indiquen la presencia de LanA de *S. thermocarboxydus* K155; ya que Shi y colaboradores revelaron en 2011 (59) que cuando se expresa el

péptido precursor en ausencia de las enzimas modificadoras, estos suelen formar cuerpos de inclusión.

A pesar de que es evidente la producción de una proteína inducida en los geles desnaturalizantes teñidos con azul de Coomassie, no fue posible identificar si corresponde a LanA empleando la técnica western blot. Esto puede ocurrir por complicaciones debidas a una transferencia incompleta o ineficiente o baja concentración de anticuerpos. Sin embargo, como se menciona en la sección 6.5.4, se modificaron todas estas condiciones en la medida de lo posible, y siempre se observaba sólo la señal del control positivo. Es posible que las histidinas estén ocultas dentro de la estructura del péptido LanA, sobre todo tomando en cuenta que parece que se está agregando. De esta forma, la falta de exposición de la etiqueta de histidinas dificultaría su interacción con el anticuerpo primario dando como resultado la ausencia de señal en el western blot. Otra posible explicación a estos resultados experimentales es la acción de la metionina peptidasa, que cataliza la eliminación de la metionina N-terminal durante la síntesis de proteínas en *E. coli* (60), es posible que ocurra este proceso en la síntesis de LanA y al eliminar la metionina se elimine también la etiqueta de histidinas haciendo imposible su identificación con esta técnica. Adicionalmente, podría identificarse LanA a nivel de transcrito mediante la técnica RT-PCR para corroborar que la problemática de identificación ocurre a nivel proteína.

En general, los trabajos publicados sobre la producción heteróloga de lantipéptidos en *E. coli* no realizan experimentos para la detección del péptido precursor, sino que solamente se enfocan en clonar y expresar el BGC completo. Por ello, para futuras

investigaciones, se propone la clonación de *lanB* en el segundo sitio múltiple de clonación de la construcción pSBlanA y *lanC* en un vector compatible, por ejemplo, pETDuet-1. De esta forma, con todos los genes del BGC clonados dentro del hospedero heterólogo se esperaría obtener el péptido maduro para evaluar su actividad antibiótica.

Otra propuesta para obtener el péptido maduro sería empleando las enzimas biosintéticas LanB y LanC del lantipéptido de clase I de *Embleya* sp., estudiada y expresada por Roblero en 2023 (33). Se ha visto con otros modelos bacterianos, que las enzimas modificadoras de lantipéptidos son promiscuas y pueden reconocer péptidos precursores de otro origen. Esta metodología ya se ha empleado para producir lantipéptidos de clase I y clase II con las enzimas modificadoras de la nisina (61) lo que presentaría una gran ventaja al ahorrar el tiempo y recursos que tomaría expresar las enzimas del lantipéptido de *S. thermocarboxydus* K155.

8 Conclusiones

El genoma de *S. thermocarboxydus* K155 posee un clúster de genes biosintéticos que codifica para un lantipéptido de clase I.

La optimización de codones del gen *lanA* facilitó su clonación en *E. coli*, lo que permitió la obtención de la construcción pSBlanA.

Se indujo la expresión de una proteína en las cepas de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS y Rosetta, al inducirse con IPTG 1 mM durante 16 h a 37°C o 29°C, podría tratarse de LanA debido al sistema de inducción empleado; sin embargo, hace falta realizar más experimentos que permitan confirmar la producción el péptido de interés.

9 Referencias bibliográficas

1. Centers for Disease Control and Prevention (5 de Octubre 2022) *Antimicrobial Resistance. About Antimicrobial Resistance.*
<https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>. Recuperado el 20 de septiembre de 2023.
2. Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current opinion in microbiology*, 51, 72-80.
3. Van Der Donk, W. A., & Nair, S. K. (2014). Structure and mechanism of lanthipeptide biosynthetic enzymes. *Current opinion in structural biology*, 29, 58-66.
4. Knerr, P. J., & Van Der Donk, W. A. (2012). Discovery, biosynthesis, and engineering of lantipeptides. *Annual review of biochemistry*, 81, 479-505.
5. Bennett, J. W. (2015). What is an Antibiotic. *Antibiotics: Current Innovations and Future Trends; Sánchez, S., Demain, AL, Eds*, 1-18.
6. World Health Organization (17 de noviembre de 2021) *Antimicrobial resistance.*
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
Recuperado el 20 de septiembre de 2023.
7. Geng, M., & Smith, L. (2018). Improving the attrition rate of Lanthipeptide discovery for commercial applications. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 13(2), 155-167.
8. Demain, A. L., & Sanchez, S. (2015). The need for new antibiotics. In *Antibiotics: Current Innovations and Future Trends* (pp. 65-82). Caister Academic Press.

9. Krause, J., & Tobin, G. (2013). Discovery, development, and regulation of natural products. *Using old solutions to new problems-natural drug discovery in the 21st century*, 1, 1-35.
10. Hanson, J. R. (2003). *Natural products: the secondary metabolites* (Vol. 17). Royal Society of Chemistry.
11. Challis, G. L., & Hopwood, D. A. (2003). Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(suppl_2), 14555-14561.
12. de Lima Júnior, A. A., de Sousa, E. C., de Oliveira, T. H. B., de Santana, R. C. F., da Silva, S. K. R., & Coelho, L. C. B. B. (2023). Genus *Streptomyces*: Recent advances for biotechnological purposes. *Biotechnology and Applied Biochemistry*.
13. Romero-Rodríguez, A., Maldonado-Carmona, N., Ruiz-Villafán, B., Koirala, N., Rocha, D., & Sánchez, S. (2018). Interplay between carbon, nitrogen and phosphate utilization in the control of secondary metabolite production in *Streptomyces*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 111, 761-781.
14. Harvey, A. L. (2008). Natural products in drug discovery. *Drug discovery today*, 13(19-20), 894-901.
15. Rastegari, A. A., Yadav, A. N., & Yadav, N. (2019). Genetic manipulation of secondary metabolites producers. In *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering* (pp. 13-29). Elsevier.

16. Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., ... & van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1-43.
17. Anandan, R., Dharumadurai, D., & Manogaran, G. P. (2016). An introduction to actinobacteria. In *Actinobacteria-basics and Biotechnological applications*. IntechOpen.
18. Lajtai-Szabó, P., Hülber-Beyer, É., Nemestóthy, N., & Bélafi-Bakó, K. (2022). The role of physical support in secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Biochemical Engineering Journal*, 185, 108495
19. Sharma, V., Kaur, R., & Salwan, R. (2021). *Streptomyces*: host for refactoring of diverse bioactive secondary metabolites. *3 Biotech*, 11(7), 340.
20. Nes, I. F., & Johnsborg, O. (2004). Exploration of antimicrobial potential in LAB by genomics. *Current opinion in biotechnology*, 15(2), 100-104.
21. Gomez-Escribano, J. P., & Bibb, M. J. (2014). Heterologous expression of natural product biosynthetic gene clusters in *Streptomyces coelicolor*: from genome mining to manipulation of biosynthetic pathways. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(2), 425-431.
22. Lee, N., Hwang, S., Kim, J., Cho, S., Palsson, B., & Cho, B. K. (2020). Mini review: Genome mining approaches for the identification of secondary metabolite biosynthetic gene clusters in *Streptomyces*. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 1548-1556.
23. Ziemert, N., Weber, T., & Medema, M. H. (2020). Genome mining approaches to bacterial natural product discovery. In *Comprehensive Natural Products III (Third Edition)* (pp. 19-33). Elsevier.

24. Zdouc, M. M., van der Hooff, J. J., & Medema, M. H. (2023). Metabolome-guided genome mining of RiPP natural products. *Trends in Pharmacological Sciences*.
25. Lopatniuk, M., Riedel, F., Wildfeuer, J., Stierhof, M., Dahlem, C., Kiemer, A. K., & Luzhetskyy, A. (2023). Development of a *Streptomyces*-based system for facile thioholgamide library generation and analysis. *Metabolic Engineering*, 78, 48-60.
26. Vagstad, A. L. (2023). Engineering ribosomally synthesized and posttranslationally modified peptides as new antibiotics. *Current Opinion in Biotechnology*, 80, 102891.
27. Xu, Z., Park, T. J., & Cao, H. (2023). Advances in mining and expressing microbial biosynthetic gene clusters. *Critical Reviews in Microbiology*, 49(1), 18-37.
28. Thibodeaux, C. J. (2023). The conformationally dynamic structural biology of lanthipeptide biosynthesis. *Current Opinion in Structural Biology*, 81, 102644.
29. van Staden, A. D. P., van Zyl, W. F., Trindade, M., Dicks, L. M., & Smith, C. (2021). Therapeutic application of lantibiotics and other lanthipeptides: Old and new findings. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(14), e00186-21.
30. Benmechernene, Z., Fernandez-No, I., Kihal, M., Bohme, K., Calo-Mata, P., & Barros-Velazquez, J. (2013). Recent patents on bacteriocins: food and biomedical applications. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences (Discontinued)*, 7(1), 66-73.
31. Negash, A. W., & Tsehai, B. A. (2020). Current applications of bacteriocin. *International Journal of Microbiology*, 2020.

32. Chakraborty, P., Nath, D., Hoque, M., Sarkar, P., Hati, S., & Mishra, B. K. (2022). Biopolymer-based antimicrobial coatings for aquatic food products: A review. *Journal of Food Processing and Preservation*, *46*(4), e16465.
33. Breukink, E., & de Kruijff, B. (2006). Lipid II as a target for antibiotics. *Nature reviews Drug discovery*, *5*(4), 321-323.
34. Hasper, H. E., Kramer, N. E., Smith, J. L., Hillman, J. D., Zachariah, C., Kuipers, O. P., ... & Breukink, E. (2006). An alternative bactericidal mechanism of action for lantibiotic peptides that target lipid II. *Science*, *313*(5793), 1636-1637.
35. Roblero, O. (2023). Aplicación de minería de genomas para la detección de un péptido antimicrobiano y su posterior expresión heteróloga [Tesis de maestría en Ciencias Bioquímicas, UNAM]. TESIUNAM.
36. Lagedroste, M., Reiners, J., Smits, S. H., & Schmitt, L. (2019). Systematic characterization of position one variants within the lantibiotic nisin. *Scientific reports*, *9*(1), 935.
37. Ávalos-García, M., Ruiz-Villafán, B., Rodríguez-Sanoja, R., & Sánchez, S. Aislamiento y caracterización de una cepa de *Streptomyces thermocarboxydus* con actividad antibiótica.
38. Guzmán-Trampe, S. M., Ikeda, H., Vinuesa, P., Macías-Rubalcava, M. L., Esquivel, B., Centeno-Leija, S., ... & Sanchez, S. (2020). Production of distinct labdane-type diterpenoids using a novel cryptic labdane-like cluster from *Streptomyces thermocarboxydus* K155. *Applied microbiology and biotechnology*, *104*, 741-750.

39. Fernández, A. (2016). Expresión heteróloga de una policétido sintasa tipo III de *Streptomyces thermocarboxydus* K155. [Tesis de licenciatura en Química Farmacéutica Biológica, UNAM]. TESIUNAM.
40. Blin K., Shaw S., Kloosterman A.M., Charlop-Powers Z., van Wezel G.P., Medema M.H., Weber T. (2021) antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities. *Nucleic Acids Research*, 49: W29-W35.
41. Blin, K., Shaw, S., Augustijn, H. E., Reitz, Z. L., Biermann, F., Alanjary, M., ... & Weber, T. (2023). antiSMASH 7.0: New and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation. *Nucleic acids research*, gkad344.
42. Lee N, Hwang S, Lee Y, Cho S, Palsson B, Cho BK. (2019) Synthetic biology tools for novel secondary metabolite discovery in *Streptomyces*. *J. Microbiol. Biotechnol*, 29, 667-686.
43. Alkhalili, R. N., & Canbäck, B. (2018). Identification of putative novel class-I lanthipeptides in Firmicutes: A combinatorial in silico analysis approach performed on genome sequenced bacteria and a close inspection of Z-geobacillin lanthipeptide biosynthesis gene cluster of the thermophilic *Geobacillus* sp. strain ZGt-1. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), 2650.
44. 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.

45. Ortega, M. A., Hao, Y., Zhang, Q., Walker, M. C., Van Der Donk, W. A., & Nair, S. K. (2015). Structure and mechanism of the tRNA-dependent lantibiotic dehydratase NisB. *Nature*, *517*(7535), 509-512.
46. Li, B., Yu, J. P. J., Brunzelle, J. S., Moll, G. N., Van Der Donk, W. A., & Nair, S. K. (2006). Structure and mechanism of the lantibiotic cyclase involved in nisin biosynthesis. *Science*, *311*(5766), 1464-1467.
47. McKee, T., & McKee, J. R. (2009). *Bioquímica: Las bases moleculares de la vida (4a. ed.)*. McGraw-Hill Interamericana. 128, 129.
48. Al-Hawash, A. B., Zhang, X., & Ma, F. (2017). Strategies of codon optimization for high-level heterologous protein expression in microbial expression systems. *Gene Reports*, *9*, 46-53.
49. Saito, Y., Kitagawa, W., Kumagai, T., Tajima, N., Nishimiya, Y., Tamano, K., ... & Kameda, T. (2019). Developing a codon optimization method for improved expression of recombinant proteins in actinobacteria. *Scientific reports*, *9*(1), 8338.
50. Zhang, Y., Chen, M., Bruner, S. D., & Ding, Y. (2018). Heterologous production of microbial ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 1801.
51. Agrawal, P., Khater, S., Gupta, M., Sain, N., & Mohanty, D. (2017). RiPPMiner: a bioinformatics resource for deciphering chemical structures of RiPPs based on prediction of cleavage and cross-links. *Nucleic acids research*, *45*(W1), W80-W88.

52. LI-COR. (21 de enero de 2020). How to select the best western blot membrane. <https://www.licor.com/bio/blog/how-to-select-the-best-Western-blot-membrane>. Recuperado el 3 de octubre de 2023.
53. Vázquez, M. (2017). Minería genómica de una cepa de *Streptomyces* sp., aislada del cuachalalate: alternativa contra la búsqueda de nuevos compuestos con actividad farmacéutica. [Tesis de maestría en Ciencias Bioquímicas, UNAM]. TESIUNAM.
54. QIAexpressionist, A. (2002). A handbook for high-level expression and purification of 6xhis-tagged proteins. *Qiagen*. p1-125.
55. EMD Chemicals Inc. (2011) Rosetta™(DE3) Competent Cells – Novagen. User protocol. 3,4.
56. Invitrogen (2010) One Shot® BL21(DE3) One Shot® BL21(DE3)pLysS One Shot® BL21(DE3)pLysE Competent Cells. User Manual. 2.
57. Swint-Kruse, L., Parente, J., Matthews, K. (2021). Transcription | lac Operon Regulation. *Encyclopedia of Biological Chemistry III* (Third Edition, pp 455-465), Elsevier.
58. Majorek, K. A., Kuhn, M. L., Chruszcz, M., Anderson, W. F., & Minor, W. (2014). Double trouble—Buffer selection and His-tag presence may be responsible for nonreproducibility of biomedical experiments. *protein science*, 23(10), 1359-1368.
59. Shi, Y., Yang, X., Garg, N., & Van Der Donk, W. A. (2011). Production of lantipeptides in *Escherichia coli*. *Journal of the American Chemical Society*, 133(8), 2338-2341.

60. Arif, A., Mohammed, K., & Nadeem, M. S. (2018). Biochemical and in silico evaluation of recombinant E. coli aminopeptidase and in vitro processed human interferon $\hat{I}\pm$ -2b. *Turkish Journal of Biology*, 42(3), 240-249.
61. van Heel, A. J., Kloosterman, T. G., Montalban-Lopez, M., Deng, J., Plat, A., Baudu, B., ... & Kuipers, O. P. (2016). Discovery, production and modification of five novel lantibiotics using the promiscuous nisin modification machinery. *ACS synthetic biology*, 5(10), 1146-1154.

10 Anexos

Medio LB

Componente	cantidad
Extracto de levadura	5 g/L
Triptona	10 g/L
NaCl	5 g/L
Agar	15 g/L

Soluciones para aislamiento de plásmido

Buffer TE

Tris	10 mM
------	-------

EDTA 1 mM

Solución I

Sacarosa 5 mM

EDTA 10 mM

TRIS pH 8 25 mM

Solución II

Se prepara al momento de uso

NaOH 0.2 N

SDS 1 % p/v

Solución III

Acetato de sodio 3 M

Llevar a pH 4.8 con ácido acético

Soluciones para preparación de geles de poliacrilamida

Buffer 4X Tris-HCl/SDS pH 6.8 (para gel concentrador)

TRIS pH 8 6% p/v

SDS 0.4% p/v

Disolver el TRIS base en 1/3 del volumen final de agua destilada, ajustar al pH con HCl 1N, filtrar con sistema Millipore, posteriormente agregar el SDS y llevar al volumen final con agua destilada.

Buffer 4X Tris-HCl/SDS pH 8.8 (para gel resolvedor)

TRIS pH 8 6% p/v

SDS 0.4% p/v

Disolver el TRIS base en 1/3 del volumen final de agua destilada, ajustar al pH con HCl 1N, filtrar con sistema Millipore, posteriormente agregar el SDS y llevar al volumen final con agua destilada.

Buffer Tris glicina 5X (buffer de corrida)

TRIS pH8 15.1 g/L

Glicina 94 g/L

SDS 10% 50 mL/L

Disolver el TRIS base y la glicina en 900 mL de agua destilada, ajustar el pH a 8.3, posteriormente agregar el volumen de SDS y llevar al volumen final con agua destilada

Amortiguador de muestra 4X (buffer de carga)

TRIS HCl 0.5 M pH 6.8 1 mL

Glicerol 800 µL

SDS 10% 1.6 mL

β -mercaptoetanol	400 μ L
Azul de bromofenol 0.1%	200 μ L
H ₂ O	4 mL

Soluciones para tinción de geles de poliacrilamida

Solución stock I

Azul de Coomassie	0.2% p/v
Etanol	90% v/v

Solución stock II

Ácido acético	20% v/v
---------------	---------

Solución de fijación

Etanol	40% v/v
Ácido acético glacial	10% v/v
H ₂ O	50% v/v

Solución de tinción

Solución stock I	50% v/v
Solución stock II	50% v/v

Solución de destinción II

Etanol	20% v/v
Ácido acético glacial	10% v/v
H ₂ O	70% v/v

Soluciones para preparación de western blot

Buffer de transferencia 10X

Glicina	144 g/L
TRIS base	30 g/L

PBS 10X

Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O	14.24 mg/mL
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	27.60 mg/mL
NaCl	8.19 mg/mL

Anticuerpos

PBS 10X	10% v/v
Tween 20	0.05% v/v
Leche descremada	3% p/v
Anticuerpo Anti-6XHis (1 mg/ml)	0.025% v/v

Anticuerpo Anti-mouse IgG (1 mg/mL) 0.025% v/v

Solución de lavado

PBS 10X 10% v/v

Tween 20 0.05% v/v

Disolver en agua destilada.

10.1 Protocolos experimentales

10.1.1 Preparación de células electrocompetentes

1. A partir de un stock de 50 μ L de *E. coli* DH5 α en glicerol realizar un preinóculo en 25 mL de medio LB, incubar a 37°C y con agitación toda la noche.
2. Tomar 2 mL de preinóculo de *E. coli* e inocular en 300 mL de medio LB, incubar a 37°C y con agitación hasta DO₆₀₀ entre 0.6-1.0.
3. Una vez que alcanza la DO, se coloca el matraz con el cultivo en hielo (4°C) por 30 minutos. A partir de aquí hay que tener cuidado de mantener las células todo el tiempo en frío.
4. Pasar el cultivo a una botella fría (4°C) y centrifugar a 10 000 rpm, 4°C por 15 minutos.
5. Descartar el sobrenadante y colocar 1 volumen de agua MiliQ estéril fría (4°C). Homogeneizar el cultivo cuidadosamente.
6. Centrifugar a 10 000 rpm y 4°C por 15 minutos.

7. Descartar el sobrenadante y agregar $\frac{1}{2}$ volumen de agua MiliQ fría, homogeneizar y centrifugar a 10 000 rpm, 4°C por 15 minutos.
8. Descartar cuidadosamente el sobrenadante (es fácil que se desprendan las células en este punto).
9. Adicionar aproximadamente 20 mL de glicerol 10% v/v estéril (preparado con agua Milli-Q) y trasvasar a un tubo de 40 mL. Homogeneizar y centrifugar a 10 000 rpm y 4°C por 10 minutos.
10. Descartar el sobrenadante con cuidado y adicionar 10 mL de glicerol 10%, homogeneizar y centrifugar a 10 000 rpm y 4°C por 10 minutos.
11. Descartar el sobrenadante con cuidado y suspender en el mínimo volumen (1 – 1.5 mL de glicerol 10%). Realizar esto a 4°C.
12. Alicuotar en tubos de 1.5 mL estériles (previamente enfriados) con 50 μ L de células cada uno.
13. Congelar rápidamente con hielo seco/EtOH y almacenar las alícuotas a -70°C.

10.1.2 Electroporación

1. Tomar un tubo con 50 μ L de células electrocompetentes (sección anterior).
2. Adicionar 2 μ L de ADN y dejar incubando en hielo.
3. Sacar una celda de electroporación del congelador (-20°C)
4. Colocar las células con ADN en la celda de electroporación, cuidando de no introducir burbujas.
5. Limpiar la celda por fuera para evitar humedad.
6. Dar choque eléctrico de 1250 mV por 5 ms.

7. Después del choque agregar 950 μL de medio LB con glucosa [100 mM] e incubar a 37°C con agitación por 1 hora.
8. Realizar diluciones en SSI o en medio LB líquido. Colocar la dilución en cajas de agar LB con antibiótico adecuado e incubar a 37°C por 24 horas.

10.1.3 Transformación por choque térmico

1. Agregar 5 μL de ADN plasmídico a 50 μL de células competentes, mezclar gentilmente y dejar reposar el hielo por 20 minutos.
2. Colocar el tubo en un termobloque precalentado a 42°C durante 1 minuto.
3. Reposar en hielo de 2 a 5 minutos.
4. Agregar 1 mL de medio LB e incubar durante 1 hora a 37°C en agitación.
5. Transferir 500 μL de células transformadas a una caja de LB con el antibiótico respectivo.

10.1.4 Aislamiento de plásmido

1. Hacer un cultivo de 50 mL con medio LB por 12 h a 37°C. Terminando la incubación centrifugue el cultivo a 10000 rpm durante 10 minutos.
2. Lavar con 1 volumen de solución salina o agua estéril y centrifugar a 10000 rpm durante 10 minutos. Descartar sobrenadante.
3. Suspender el botón en 6 mL de Solución I.
4. Adicionar 12 mL de Solución II, mezclar por inversión el tubo hasta que la solución esté transparente.
5. Adicionar 10 mL de Solución III, mezclar por inversión. Opcional: incubar 10 minutos en hielo o a 4°C.
6. Centrifugar a 10000 rpm durante 15 minutos.

7. Recuperar el sobrenadante con el ADN y tirar el botón (debris celular).
8. Adicionar un volumen de isopropanol y mezclar.
9. Incubar de 10 min a 1 día a temperatura ambiente.
10. Centrifugar a 10000 rpm, 4°C de 10 a 20 minutos dependiendo del tiempo de incubación.
11. Descartar el isopropanol.
12. Añadir 15 mL de EtOH al 70%, agitar hasta levantar el botón de DNA.
13. Centrifugar a 10000 rpm durante 10 minutos.
14. Descartar el EtOH.
15. Dejar secar botón a temperatura ambiente.
16. Suspender el botón en 500 µL de buffer TE.
17. Checar en gel de electroforesis.
18. Adicionar ARNasa a una concentración final de 50 µg/mL e incubar 1 hora a 37°C.
19. Checar en gel de electroforesis.
20. Si ya no hay ARN, limpiar con un volumen de fenol cloroformo 1:1.
21. Centrifugar a 10000 rpm durante 5 minutos.
22. Recuperar la fase acuosa en un tubo limpio.
23. Adicionar un volumen de cloroformo.
24. Centrifugar a 10000 rpm durante 5 minutos.
25. Recuperar la fase acuosa en un tubo limpio.
26. Adicionar 0.1 volumen de NaCl 1M.
27. Adicionar 1 volumen de isopropanol.
28. Incubar a temperatura ambiente 10 minutos.

29. Centrifugar a 10000 rpm durante 10 minutos.
30. Descartar el isopropanol.
31. Adicionar $\frac{1}{2}$ volumen de EtOH 70%.
32. Centrifugar a 10000 rpm durante 10 minutos.
33. Descartar sobrenadante.
34. Dejar secar el botón a temperatura ambiente.
35. Suspender el buffer TE o agua MiliQ.

10.1.5 Aislamiento de plásmido (Miniprep)

1. Picar con la punta de un palillo estéril una colonia de bacterias que contenga un plásmido que confiera resistencia al antibiótico del plásmido, inocular en 3 mL del medio LB más el antibiótico correspondiente e incubar a 37°C con agitación toda la noche.
2. Alicuotar en tubos de 1.5 mL el cultivo y centrifugar más a 10000 rpm durante 10 minutos. Descartar el sobrenadante.
3. Lavar con 1 volumen de solución salina o agua estéril y centrifugar a 10000 rpm durante 10 minutos. Descartar el sobrenadante.
4. Suspender el botón en 100 μ L de Solución I.
5. Adicionar 200 μ L de Solución II, mezclar por inversión el tubo hasta que la solución esté transparente.
6. Adicionar 150 μ L de Solución III, mezclar por inversión. Opcional: incubar 10 minutos en hielo o a 4°C.
7. Centrifugar a 10000 rpm durante 15 minutos.
8. Recuperar sobrenadante y tirar el botón.

9. Adicionar un volumen de isopropanol.
10. Incubar de 10 min a 1 día a temperatura ambiente. Mezclar.
11. Centrifugar a 10000 rpm y 4°C de 10 a 20 minutos dependiendo del tiempo de incubación.
12. Descartar el isopropanol.
13. Añadir 0.5 mL de EtOH al 70%, agitar hasta levantar el botón de DNA.
14. Centrifugar a 10000 rpm durante 10 minutos.
15. Descartar el EtOH.
16. Dejar secar botón a temperatura ambiente.
17. Suspender el botón en 500 µL de buffer TE.
18. Checar en gel de electroforesis.
19. Adicionar RNasa a una concentración final de 50 µg/mL e incubar 1 hora a 37°C.
20. Checar en gel de electroforesis.
21. Si ya no hay RNA, limpiar con un volumen de fenol cloroformo 1:1.
22. Centrifugar a 10000 rpm durante 5 minutos.
23. Recuperar la fase acuosa en un tubo limpio.
24. Adicionar un volumen de cloroformo.
25. Centrifugar a 10000 rpm durante 5 minutos.
26. Recuperar la fase acuosa en un tubo limpio.
27. Adicionar 0.1 volumen de NaCl 1M.
28. Adicionar 1 volumen de isopropanol.
29. Incubar a temperatura ambiente 10 minutos.
30. Centrifugar a 10000 rpm durante 10 minutos.

31. Descartar el isopropanol.
32. Adicionar ½ volumen de EtOH 70%.
33. Centrifugar a 10000 rpm durante 10 minutos.
34. Descartar el sobrenadante.
35. Dejar secar el botón a temperatura ambiente.
36. Suspender el botón en buffer TE o agua MiliQ.

10.1.6 Conservación de colonias de *E. coli*

1. Inocular una colonia en 50 mL de LB con el antibiótico adecuado, incubar a 37°C en agitación toda la noche.
2. Centrifugar el cultivo a 10000 rpm durante 10 minutos.
3. Descartar el sobrenadante.
4. Lavar el botón con 1 volumen de SSI, centrifugar a 10000 rpm durante 10 minutos.
5. Descartar el sobrenadante.
6. Suspender el botón en 5 mL de glicerol 20% frío.
7. Hacer alícuotas de 1mL en tubos de 1.5 mL.
8. Congelar en hielo seco y conservar a -70°C

10.1.7 Ensayo de expresión de proteínas

1. Se realiza un preinóculo de la colonia transformada con el plásmido de expresión en 25 mL de medio LB con el antibiótico respectivo.

2. Inocular un volumen de preinóculo correspondiente al 1% del volumen total de medio LB con el antibiótico adecuado. Incubar a 37°C en agitación hasta una DO₆₀₀ de 0.6-0.8
3. Si se agregó glucosa, lavar las células con 1 volumen de SSI, centrifugar a 9500 rpm durante 10 minutos y suspender el botón en el volumen inicial de medio LB con el antibiótico necesario.
4. Separar el cultivo en tubos de ensayo con 5 mL cada uno e inducir con IPTG según la concentración que corresponda (0, 0.25, 0.5, 0.75 y 1 mM). Incubar en agitación a 37°C el tiempo de inducción indicado.
5. Tomar por triplicado muestras de 1 mL al tiempo que corresponda.
6. Centrifugar cada muestra a 15 000 rpm durante 5 minutos.
7. Descartar el sobrenadante. En este punto el botón de células se puede congelar a -20°C o procesar.
8. Para procesar, a cada muestra se le agrega amortiguador de muestra a concentración final 2X, hervir durante 5 minutos. Pasado el tiempo se enfría rápidamente en hielo.
9. Cargar las muestras en un gel de poliacrilamida al 14%.
10. Correr los geles a 20 mA por cada gel en la cámara, durante 3 h aproximadamente.

10.1.8 Tinción con azul de Coomassie

1. Retirar con cuidado uno de los geles de los vidrios y colocarlo sobre un recipiente de plástico que se adecúe al tamaño de este.
2. Agregar solución de fijación suficiente para cubrir el gel e incubarlo durante 30 minutos con agitación.
3. Descartar la solución de fijación.
4. Agregar la solución de tinción suficiente para cubrir el gel e incubarlo durante 20 minutos con agitación.
5. Descartar la solución de tinción.
6. Agregar solución de destinción I hasta cubrir el gel durante 30 segundos. Agitar suavemente.
7. Descartar solución de destinción I.
8. Agregar solución de destinción II hasta cubrir el gel, incubar en movimiento hasta que se vean las bandas claramente.
9. Descartar solución de destinción II.
10. Sumergir el gel en agua destilada hasta su captura fotográfica.

10.1.9 Transferencia a membrana para ensayo de western blot.

1. Se prepara el amortiguador de transferencia en el momento (buffer de transferencia 1X con metanol 10%).

2. Se agrega una pequeña cantidad de buffer recién preparado en un recipiente, en el mismo se coloca el equipo para hacer un sándwich con la parte negra (carga -) hacia abajo dentro del recipiente como se muestra a en la figura 29.

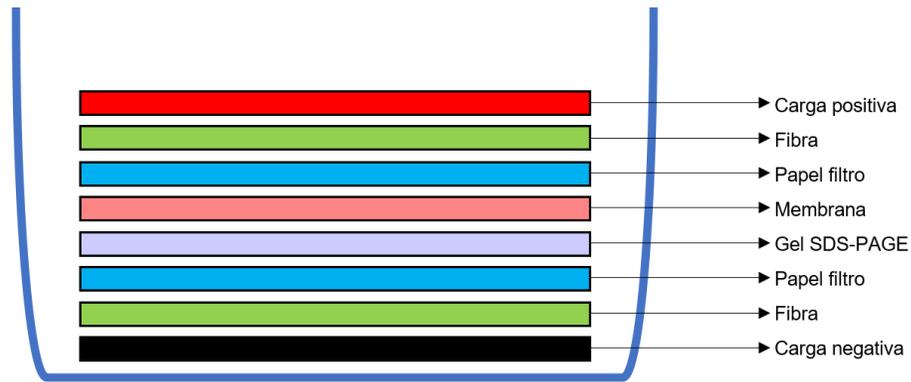


Figura 29. Ensamble de sándwich para la transferencia de proteínas.

3. Previamente se debe activar la membrana de nitrocelulosa sumergiéndola 20 segundos en agua Milli-Q, posteriormente puede colocarse en buffer de transferencia y los demás componentes del sándwich deben ser humedecidos previamente con el amortiguador de transferencia. Tener mucho cuidado de evitar que se seque cualquier componente del sándwich ya que esto propiciaría una mala transferencia.
4. Se deben eliminar las burbujas de aire entre el gel SDS-PAGE y la membrana para que no interfieran con la transferencia. Entonces se cierra el sándwich y se monta en el soporte que contiene la cantidad de amortiguador de transferencia necesaria para cubrirlo. La parte negra debe coincidir con la del mismo color en el “casting”.

5. Se conecta el equipo y se realiza la transferencia a 60V durante 1-1.5 h o 20 V durante toda la noche. Se debe de evitar que aumente la temperatura porque la transferencia sería ineficiente.
6. Una vez hecha la transferencia, se desmonta el equipo, se retira la membrana y se deja secar sobre papel bond. El secado se puede realizar a temperatura ambiente durante 3 h aproximadamente, a 37°C durante 1 h o se puede guardar durante algunos días. Cuando la membrana está húmeda se observan las proteínas transferidas como bandas traslúcidas en la membrana opaca, en este momento se deben numerar los pozos con lápiz en la parte superior de la membrana, teniendo cuidado de no tocar la zona donde se transfirieron las proteínas.

10.1.10 Western blot (reconocimiento con anti-His).

1. Se bloquea la membrana con una solución de PBS 1X, Tween 20 0.05% y leche descremada 3%, durante una hora a temperatura ambiente y con ligera agitación.
2. Se prepara el anticuerpo primario (ratón anti 6XHis) a una concentración final de 1:4000 en una solución con la misma composición mencionada en el punto 1; se cubre la membrana con esta solución y se incuba a 15-25°C por 1 h con ligera agitación.

3. Una vez pasado el tiempo de incubación, se lava la membrana con 20 mL de PBS 1X con Tween 20 0.05% tres veces. Cada lavado se realiza durante 5 minutos.
4. Se prepara el anticuerpo secundario (anti-mouse IgG acoplado a fosfatasa alcalina) de la misma forma que el primario a una concentración final de 1:4000, se incuba a 15-25°C por 1 h con ligera agitación.
5. Al término de la incubación, se lava la membrana con 20 mL de PBS 1X con Tween 20 0.05% tres veces. Cada lavado se realiza durante 5 minutos.

Revelado

6. Se agrega el sustrato de la enzima (BCIP/NBT) en un volumen suficiente para cubrir la membrana y se incuba a temperatura ambiente hasta que las bandas sean visibles.
7. Se detiene la reacción adicionando H₂O destilada.

10.2 Secuencia de nucleótidos de gen *lanA* de la cepa *S. thermocarboxydus*

K155

```
ATGCGTACCGAGATCGTTCTGTCCCAGGATGCCCCCGAGCTGGACCTCGACC
TGGACCTGCGTGTGTCCGATCTGCCGGACCAGGCCGAGTCGTTCCGGGCAGG
GCACCTACACCTCGCCGAGCAGCTACGCGATCGGCACGCGCTGCCCCGTCT
GTTGCTGA
```

10.3 Secuencia de nucleótidos de gen *lanA* optimizado para su expresión en *E. coli* y modificado con el sitio de corte de la proteasa Furin

ATGCGCACCGAGATTGTTTTGAGCCAAGATGCACCTGAACTGGACCTGGATTT
GGACCTTCGTGTCAGCGATCTGCCGGACCAGGCCGAGAGCCGTTTCAAGCG
TGGCCAGGGTACGTATACCTCCCCGTCTAGCTACGCGATCGGTACGCGCTGC
CCGGTGTGTTGCTAAGGCACCTAATAA

10.4 Secuencia de aminoácidos de péptido LanA de la cepa *S. thermocarboxydus* K155.

MRTEIVLSQDAPELDLDDLRLVSDLPDQAESFGQGTYTSPSSYAIGTRCPVCC

10.5 Secuencia de aminoácidos de péptido LanA modificado con el sitio de corte de la proteasa Furin

MRTEIVLSQDAPELDLDDLRLVSDLPDQAESRFKRGQGTYTSPSSYAIGTRCPVC
C

10.6 Secuencia de nucleótidos de gen *lanB* de la cepa *S. thermocarboxydus* K155

GTGGCGGCGGAGTCCGAAGCCGATCAGACGTCTGCAGCATTTCGAGGTACGG
GAGCCCGTGCTCGTCCGCATGGCGAGCCGGCCGCGCGGGCGCCGCACTCGC
GGGCGTCGACGCCACCGATCCGGTGCCGGGGGCGCGACGGCTCGCCTCCG
ATCCCCTGCTCGGCCAGGCCGTCCGGGTGGCGAGCAGTTCCTGGCGCACA
GTCTGGACCGTCTGACCAGCGACGAGGGTGC GGCCGCGCTGGGACGCAAAC
GGACGTTGAGCGCCGCGCGCACCCCTCACGCGGTACGCCCGCCGGGCGCG

GCGCGTCCGACGCCGTTTCGGTCTGTTTCGCGGGGGTGGGCAGGGCCAGGTT
CGGTTCCGCGGCCAAGGCGGAGCCGGGGGCCGGTGAGGTCGCGGTCCGGC
TCGACGGGGCATGGCTGCGGCGTCGTGTCCTGGCCTGGCTCGCGGAGCCC
GCCGTCCGCCGGCGTGTGGACGTCGTCTCAACGACCTGTGCTTCCTGCGG
GACGGGCGACTGCATCTGCGGACCGGAGGGCAGGAGCAGTCGGTGCGGGA
CAACTCGCTGGTCGGTGCCGTACGGGAGGGGGCGCGGACCCTGGTGCGGT
ACGGCGACCTGCTCGATTCGCTCACCGAGCGTTTCCCCACGGTGGACGCC
AGCAGCTCGACCGTCAGCTCGCCGAGCTCGTCCGGCACGGTTTCCTCCTCAC
GTCGATCACCCCGCACCTCATCGACACCGCGCTGCTCGACGGCATCGAGGC
CGTGCTCGACGAGCCGCTGCCCGACGACGCGCGGGCGCTCCGGACCATCC
GGGCGGCCTGTGCGCGGCATCAGCTGGACGCCCCGGGGCAGGGCGGAGAC
TCGTGGCGAGCGTTGCTGGACGAGGTCCGGCGACTCGATGTCCCCGGCATG
GGCGGTGATGCCCGGTCCCGGCCTCCCGTGACGTGGATCTGCACATGCGG
GGCGAGTTCGTGTCGTCGCCGGAGACGGTCGGGCATGAGGTGTGCCGGTACGCG
GCCGCGATCTGGGCGATCACCCCGGAGTGGACGACGCTGGCGTACATGCGG
GACTACCGCGACCGCTTCATCGAGCGGTACGGCACCGCCTGCGCCGTACCG
CTGGGCGACCTGGCCGACCCGCACCGCGGGCTCGGTCTGCCTCCCGAGTAC
GGCGCGGAGCCCACGTTTCGCGCGCATCGGGCCCGGTGACGAGGCGGACGG
TCCGCGACGCGCGCTCATCGGTGAGTTGATCCAGGAGGCCGTCTGTCCGG
CGGCGACCTGGTGCTGACGGACGACGTCGTACGGCGTCTCGCGGACGTCGC
CCGGCACGACCCGGAGGCCGCGCCGCCGCGCGGACTCGAACTCTGCTTCCA
GGTGCTCGCCGACAGCACCGCCGCCCTGGACCGCGGCGACTTCCGCCTGCT
CGGCAGCCCGCACATCGGGGCCTGGGCGGCCGGGGCGACCGCGGGCCGTT

TCGCGGAGGCGGCCGACCTCACCGCCGGACTCGCCCCGGCTGGCTGCCGAC
ACGTCCGGCGCCGCCGACGGCGAAGTGATCGCCGCGCAGGTGGAGTTGGC
TCCCCGGGAGCCGCGCGGACTCAACATCGTCCAGGTGCCCCGGCTGCTGCC
GTACCGCATCCCCGTCCGGTGTGCCCGACGACCGGGACGACCCCCGCTGTCT
GGACTGGCGTTCCCTTCTCGTCGCCGCCGGATCGGACGGGCTGCGGCTGCT
GCACCCGGAGAGCGGGCGCCCTGTCCGGCCCCGTGCTGCCCCACATGCTGG
CCCTGGACACGCAGGCTCCGCCGGTGGCGCGCTTCTGATGGATCTGGCGA
CGGCACGGCCGCGGGTGTGGTCGGGGTGGGACTGGGCCGGGCACGACACC
CTGCCGTATCTGCCCCGTGTGCGGTACGGACGGGTGGTGGCGATGCCCAAG
CGGTGGCTGCCCGGGCGACGGCTGCGCGACGCGGGCGCGCGCCAAGGGCG
CGGACGTGTGGGAGCAGGGCCTCGACGCCTGGCGTCGGCGTCTCGCCGTA
CCGGACCGGCTGCAGATCGCGCGCAACGACCAGATGTACCCCGTCGACCTG
CGCGAGCGCTGGGACAGGGACCTCTTGCGGTCCGAACTCTGCGCCTCTCAG
CCCCAGTTCGTCCTGTACGAGGATGTGACCGCCGAGGGGGCGGGGCTCGGC
TGGAACGGCGGGCGCAGTACGGAGATCGTGGTGCCCCTCGCGGGGGCGCG
GCGGTCCGGCGAGACCGTGAGTGGGGAGCGTACGCAAGCGCCACCGCCGG
TGCGGCTCGCGCCCACCCGGTTCCATCTGCCGGGCGAGGACTGGCTGTTG
TCAAGTGGTACGCGGAACCGTCGGCCCATGACGCCCTGCTCGCCGATCACC
TTCCCGCCGTGCTCGCCGAGATCGAGGACGACGTGACCGCTGGTTCTTCGT
GCGGTACCAGGACCCCGAGCCTCATCTGCGGTTGCGGTTCCATGGTGACAG
TCAGGCCTTGAACGGGCGGGTGTGCCCCGCGCTCAGCCGTGCGGCGCGTCT
GCTCGTCGAGAACGGGGCGCTGCGTTCGACGGCTCTCGACACCTACCGGCC
CGAGACGGACCGCTACGGCGGCGAGGCTCTCCAGGAGTCCGCCGAGCGCC

TGTTCCACACGGACAGTCTGTTCGGCCGTCGTGCAGGTGCGTGCCCTGCGAG
GTGCGGCGCGGGCACTTCCAGCCGACGTGCTCGCCGGGCTCGGGCACGCG
GTGCTTCTCGAGTCCCTCGGGGACTGGGACTGGTGC GGCTGGGTGCGACCGG
ATGTTACCAAGACCGACGAGCACGAGGTCTACCAGCGTCACCGTGCTCTCG
CCGACCGGCTGGTCATGCCGGGGAACATGGTGGCGTCGGCCGCGGAAGCG
CTGAGGGCGCCCGCGCTCCACGCGCTGTGGGCCGGCTCCGACGAGCCACG
TGCGTACGGGCGGTTGATCCTTTCCGCCCCGGAGGCCGACCGCGACGAGGC
GCTGCTGTCGCTGCTGCACATGCCGGCACAACCGTCAGTTCGGCATCGACCG
GTCGGCGGAGGCTCGGGGGTACGCGGTGCTGCGGGGTGCGGTACGGAGTC
ATCTGGGACGACGGCGTCACGGCGGCGAAGGAGCGAGCGGCGAGGGCGGT
CGATGA

10.7 Secuencia de aminoácidos de la proteína LanB de la cepa *S. thermocarboxydus* K155.

VAAESEADQTSAAFEVREPVLRMASRPRGAALAGVDATDPVPGARRLASDLL
GQAVRVASSSLAHSRLDRLTSDEGAAALGRKRTL SAARTLTRYARRAAARPTPFGL
FAGVGRARFGSAAKAEPGAGEVAVRLDGAWLRRRVLAWLAEPVRRRVDVVLN
DLCFLRDGRLHLRTGGQEQSVRDNSLVGAVREGARTLVAYGDLLDSLTERFPTV
DAQQLDRQLAELVRHGFLLTSITPHLIDTALLDGIEAVLDEPLPDDARALRTIRAAC
ARHQLDAPGQGGDSWRALLDEVRRLDVPGMGGDARSRPPVHVDLHMRGEFVV
PETVGHEVCRYAAAIWAITPEWTTLAYMRDYRDRFIERYGTACAVPLGDLADPHR
GLGLPPEYGAEPFARIGPGDEADGPRRALIGELIQEAVLSGGDLVLTDDVVRRLA
DVARHDPEAAPPRLGLELCFQVLADSTAALDRGDFRLLGSPHIGAWAAGATAGRF

AEAADLTAGLARLAADTSGAADGEVIAAQVELAPREPRGLNIVQVPRLLPYRIPVG
VPDDRDDPRCLDWRSLLVAAGSDGLRLLHPESGRPVRPVLPHMLALDTQAPPVA
RFLMDLATARPRVWSGWDWAGHDTLPYLPRVRYGRVVAMPKRWLPGRRLRDA
ARAKGADVWEQGLDAWRRRLAVPDRLQIARNDQMYPVDLRERWDRDLLRSELC
ASQPQFVLYEDVTAEGAGLGWNGGRSTEIVVPLAGARRSGETVSGERTQAPP
VRLAPTRFHLPGEDWLFVKWYAEPSAHDALLADHLPVLAIEIDDVDRWFFVRY
QDPEPHLRLRFHGDSQALNGRVLPALSRAARLLVENGALRSTALD TYR PET DRY
GGEALQESAERLFHTDSL SAVVQVRALRGAARALPADVLAGLGHAVLLES LGDW
DWCGWVDRMFTKTDEHEVYQRHRALADRLVMPGNMVASAAEALRAPALHALW
AGSDEPRAYGRLILSAPEADRDEALLSLLHMRHNRQFGIDRSAEARGYAVLRGAV
RSHLGRRRHGGEGASGEGGR

10.8 Secuencia de nucleótidos de gen *lanC* de la cepa *S. thermocarboxydus*

K155

ATGAACGGGGCGACGGACGTGACCACCACCGGGGGCACGACTCGGGAACG
CGCGGGCGGCACGACCTCACGGGCGCTTCGGGAACGAGCGGGCGCCGTGT
CCGCCGAGATCCTGGAACGGCTGGCCGACCCCGCCGCCACCGTCGCGGCC
ACGCGCATCCCGGCCGAGGCCGCGGACGACGGGGTCGCCGAGCCGGTCTG
GGCCGAGCTGACCCTGGGCAGCGGCAGCCCGGGACTGGCCCTCGCTTTCG
CAGGGGCCGCCCGCGACGCCGCGCGGCAGGTCCCGCGCGCCCATGCGTAT
CTCATGGCGGGCACGCGCGCCGTGTCAGGGACGGGCGGCACGGCGAGCGG
CATCTTCAAGGGACCCGGCGCCCTGGCGTTCGCCGTGCTGGTCGCCACCG
CACCACCGGCGGGTATGTCTCCGCGCTCGAGCGGTTTCGACGCCTACCAGCG

CGATCTCGTACGGACGGTCCTGCCGCCCGTCGAGGACCGGCCGTTGTGCGAC
CATCGGGCACTACGAGGTGGTGCCTGGACTGACCGGGGTGGGCCGTTATCT
GCTGGCCCGTGCGGAGACCTGCGAGGAACCGCTGACGGCGGTCTCGGCT
GTCTGGTCCGTCTGTCACTGGGCACGGTGGAGCATCAGGGCGCACAGGTGC
CGCGCTGGTGGGCGTTGGACGCGCCGCGGATCGGCTCGGAGGAGGCGTTT
CCCGGTGGTCACCTCAACCTCGGCCTGTCGCACGGCGTTGCCGGACCGCTC
GCGTTGATGGCCCTGGCATGGGAGCAGGGTGTGCGGGTGCCGGGGCAGCG
GGAGGCGATGGAGGCGACGGCCGGCCTGCTGCGGACCTGGGCGGTGACGG
ACCGGCACGGTGTGTTCTGGCCCGGCTACCTCTCCTTCGCCGAGTGGCAGC
GCGGACCCGACGCGTATGCAGGGGCCGCAAGTGGCCGGCCTGGTGCTAC
GGGGCTCCCGGGGTGTCCCGCGCGCTGCAACTGGCGGGGCGGGCTCTCGG
CCGGACGGACTTCTCGGACCTGGCCCGCGCCTCGGTGGACCGGCTGCTCGC
CCTCCCCCGGAAGAACTGGGGGATCAACGACCATGCCCTGTGCCACGGTTG
GGCGGGGGCTCTGCATCAGCTCGGCCGGCTCGACGAGGAGTGGAAGGAAC
CCCGGCTGGCCGCACTGCGGGACGACATCGCCGCCGAACCTCGTCTCCGCCT
TCGACCCCGCACTGCCGTTCCGACTGCGCTTACGATGACGAAGGCGCCGT
TCGGATCCGACGTGTCCGGTTATCTGGACGGTGCCGCGGGGGTTCGCGCTCG
CGCTGGACTCGTACGCGGTGGGAGGGACTCCGGCCGACTGGGACATGCCGT
TGCTGCTGGCCTGA

10.9 Secuencia de aminoácidos de la proteína LanC de la cepa *S. thermocarboxydus* K155.

MNGATDVTTTGGTTRERAGGTTSRALRERAGAVSAEILERLADPAATVAATRIPA
EAADDGVAEPVWAEELTGGSGSPGLALAFAGAARDAARQVPRAHAYLMAGTRAV
SGTGGTASGIFKGGALAFVLAHRTTGGYVSALERFDAYQRDLVRTVLPPVED
RPLSTIGHYEVVRGLTGVGRYLLARAETCEEPLTAVLGCLVRLSLGTVEHQGAQV
PRWWALDAPRIGSEEAFFGGHLNLGLSHGVAGPLALMALAWEQGVRVPGQREA
MEATAGLLRTWAVTDRHGVPWPGYLSFAEWQRGPDAYAGAAKWPWCYAGAP
GVSRALQLAGRALGRTDFSDLARASVDRLALPRKNWGINDHALCHGWAGALH
QLGRLDEEWKEPRLAALRDDIAAELVSAFDPALPFGLRFTMTKAPFGSDVSGYLD
GAAGVALALDSYAVGGTPADWDMPLLLA