



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN CLÚSTER INÉDITO
ASOCIADO A LA PRODUCCIÓN DE UN LANTIPÉPTIDO EN UN
ACTINOMICETO ENDÓFITO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
CARLOS ADRIÁN GARCÍA AUSENCIO

TUTOR PRINCIPAL
SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
JOSÉ ADELFO ESCALANTE LOZADA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

ARMANDO HERNÁNDEZ GARCÍA
INSTITUTO DE QUÍMICA

Ciudad de México. Octubre, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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

Dra. Amelia Farrés González Sarabia	Presidente
Dr. Daniel Genaro Segura González	Secretario
Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán	Vocal
Dr. José Antonio Pedroza García	Vocal
Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava	Vocal

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Microbiología Industrial del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Sergio Sánchez Esquivel.

Financiamiento

Este trabajo fue financiado por el Programa PAPIIT, DGAPA, UNAM, proyecto IN205922 “Aplicaciones de la minería genómica para la búsqueda de lantipéptidos inéditos con actividad antimicrobiana”. También se recibió financiamiento del Programa “Nuevas Alternativas para el Tratamiento de Enfermedades Infecciosas” (NUATEI) del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Así mismo, durante el desarrollo de este trabajo se recibió una beca de posgrado por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el número de CVU 1011836.

Agradecimientos

Al Dr. Sergio Sánchez Esquivel, por haberme recibido en su laboratorio desde la realización del servicio social hasta la culminación de mis estudios de maestría.

A la Dra. Beatriz Ruíz, por su valiosa asesoría técnica durante la realización de este proyecto.

Al Dr. Fernando Guzmán Chávez, por proporcionarme las bases y los recursos necesarios para la culminación de este proyecto, así como su asesoría técnica.

A la M. en C. Dulce Ramírez Rendón, por ser mi primera maestra dentro del laboratorio, por sus enseñanzas y su apoyo en de la realización de mi servicio social y mi estancia estudiantil.

A los Doctores Adelfo Escalante y Armando Hernández, por conformar mi comité tutor durante la maestría y asesorarme a lo largo de cada semestre.

A Andrea Aguilar Cabrera y Onely Roblero Mejía, por su apoyo en la etapa final del proyecto.

A los Doctores Amelia Farrés, Daniel Segura, Martha Lydia Rubalcava, José Antonio Pedroza y Víctor Bustamante Santillán, por su tiempo al revisar esta tesis y por todos sus comentarios y observaciones.

Al CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología), por otorgarme la beca con número de CVU 1011836 durante la maestría.

Agradecimientos personales

A mis padres Carlos y Marisela, por estar siempre apoyándome a lo largo de toda mi etapa estudiantil, por alentarme a continuar con lo que más me apasiona y por siempre estar a mi lado y hacerme saber que siempre voy a contar con ellos. Los amo.

A mi familia: mi hermana Marycarmen, a mis tíos Sergio, Elsa, José Luis y Haydé; a mis abuelos María Vidal, Enedina y Arturo; y a mis primos Erick y Akemi, por siempre recibirme con los brazos abiertos cuando regresaba a mi natal Oaxaca y nunca olvidarse de mí.

A mis amigas Jazmín, Abyayala y Marisita, con las que he compartido y espero seguir compartiendo invaluable momentos durante mi etapa universitaria y por el resto de mi vida. Porque me animaron a seguir con el que siempre fue mi sueño, por todas las anécdotas que hemos compartido y por ser parte importante de mi vida.

A mis amigas Tere, Karla, Arantxa y Olivia, por mostrarme que podía tener una familia dentro de esta gran ciudad y acompañarme a lo largo de todas mis crisis universitarias.

Al *Team Iantipéptidos*, con el que compartía más que una mesa de trabajo: Dulce, One, Ximenita, Susanita, Andrea y el Doctor Fernando. A Bere y Almita por su amistad y a todos mis compañeros de laboratorio Bety, Rodri, Fernando, Karen, Emiliano y Valerie que siempre me han mostrado un apoyo sincero.

A Alejandro, por aguantar todos mis episodios de estrés cuando no avanzaba el proyecto y aun así estar ahí echándome porras y hacerme creer en mí.

Y a todas las personas que mostraron y han mostrado interés para que este proyecto sea exitoso incluyéndote a ti, que estás leyendo este escrito. Muchas gracias.

Índice

Índice de figuras	8
Índice de tablas	11
Tabla de abreviaturas	12
Resumen	13
Marco teórico	14
I. Resistencia bacteriana a los antibióticos	14
II. Actinobacterias: fuente de productos naturales	15
II.I Microorganismos endófitos	17
III. Bacteriocinas	19
III.I Lantipéptidos	20
III.I.1 Clasificación	21
III.I.2 Biosíntesis	23
III.I.3 Otras modificaciones postraduccionales	26
III.I.4. Organización del clúster biosintético	27
III.I.5. Mecanismo de acción antibacteriano	29
III.I.6 Lantipéptidos utilizados comercialmente	31
IV. Descubrimiento de nuevos productos naturales por minería genómica	33
Justificación del proyecto	36
Hipótesis	36
Objetivo general	37
Objetivos particulares	37
Metodología	38
Resultados y discusión	50
I. Análisis bioinformático	50
I.i Búsqueda de BGC de lantipéptidos	50
I.ii Análisis de un BGC de lantipéptido clase IV	52
I.iii Análisis del BGC de lantipéptido clase II	57
I.iii.1 Análisis de la secuencia lanM	59
I.iii.2 Análisis del gen transportador (lanT)	63

I.iii.3 Análisis del gen <i>lanA</i>	64
I.iii.4 Análisis del gen regulador.....	70
II. Clonación heteróloga en <i>Escherichia coli</i>	72
II.i Clonación del gen <i>lanM</i>	72
II.ii Clonación del gen <i>lanA</i> por ensamble Golden Gate.....	74
II.iii Clonación del gen <i>lanA</i> en pRSFDuet-1	76
III. Inducción de la expresión mediante el sistema <i>Cell-Free</i>	79
Conclusiones	87
Perspectivas	88
Referencias bibliográficas	89
Anexos	96
Anexo 1: Medios y soluciones.....	96
Anexo 2: Condiciones de reacción para la amplificación por PCR del gen <i>lanA</i>	98
Anexo 3: Gen <i>lanA</i> amplificado con la secuencia de reconocimiento de <i>Bsal</i> y los sitios de fusión.....	99
Anexo 4: Condiciones para el ensamble Golden Gate	100
Anexo 5: Esquema general del ensamble Golden Gate	101
Anexo 6: Vectores pRSFDuet-1 y pFGC-T7-RJBB.....	102
Anexo 7: Protocolo de extracción de plásmido por lisis alcalina.....	103
Anexo 8: Preparación rápida de células quimio-competentes de <i>E. coli</i>	105
Anexo 9. Transformación de las células quimio-competentes	106
Anexo 10: Soluciones para SDS-PAGE.....	107
Anexo 11: Soluciones para Tris-Tricina-PAGE	110
Anexo 12: Protocolo de purificación de proteínas con afinidad a níquel (Ni-NTA Spin Kit)	
112	
Anexo 13: Secuencias de los genes	113

Índice de figuras

Figura 1. Fármacos aprobados por la FDA entre 2003-2019.....	15
Figura 2. Algunos ejemplos de fármacos y compuestos aislados de <i>Streptomyces</i> , y sus blancos de acción.....	16
Figura 3. Los microorganismos endófitos como fuente prometedora de diversos compuestos bioactivos	18
Figura 4. Proporción de compuestos con actividad antimicrobiana aislados de distintas fuentes vegetales	19
Figura 5. Estructura de las modificaciones postraduccionales características del grupo de los lantipéptidos.....	20
Figura 6. Clasificación de los lantipéptidos con base en la maquinaria enzimática... 21	21
Figura 7. Ruta sintética para la producción de un lantipéptido de clase I.....	23
Figura 8. Ubicación de las enzimas biosintéticas en la formación de la nisina.....	24
Figura 9. BGC típico asociado a la producción de un lantipéptido.....	27
Figura 10. BGC comúnmente encontrados en el análisis de 1,110 genomas de cepas de <i>Streptomyces</i>	29
Figura 11. Mecanismos de acción clásicos de las bacteriocinas clase I (nisina & Pep5) y II (mersacidina).....	30
Figura 12. Estructuras de algunos lantipéptidos.....	32
Figura 13. Esquema general de la identificación de nuevos productos naturales por minería genómica.....	34
Figura 14. Metodología del proyecto.....	38
Figura 15. Secuencia del péptido modificado para ser escindido por la proteasa Factor Xa.....	41
Figura 16. Construcción pUCIDT- <i>lanA</i> , donde se observa la inserción del gen <i>lanA</i> ..	41
Figura 17. Construcción pRSFD- <i>lanA</i> , donde se observa la inserción del gen <i>lanA</i>	43
Figura 18. Construcción pFGC- <i>lanA</i> , donde se observa la inserción del gen <i>lanA</i>	46
Figura 19. BGC asociados a la producción de lantipéptidos en <i>Embleya</i> sp. NF3	52

Figura 20. Clúster 21: BGC asociado a la producción de un lantipéptido clase IV en <i>Embleya</i> sp. NF3	53
Figura 21. Alineamiento del dominio de liasa de fosfotreonina/serina de la enzima putativa LanL contra las enzimas StcL y VenL.....	55
Figura 22. Alineamiento del dominio de cinasa de treonina/serina del putativo LanL contra las enzimas StcL y VenL.	55
Figura 23. Alineamiento del dominio de ciclasa del putativo LanL contra las enzimas StcL y VenL.....	56
Figura 24. Clúster 3: BGC asociado a la producción de un lantipéptido clase II en <i>Embleya</i> sp. NF3	57
Figura 25. Alineamiento del dominio de ciclasa de la enzima putativa LanM.	60
Figura 26. Alineamiento del dominio de deshidratasa de la enzima putativa LanM...	61
Figura 27. Modelo tridimensional de la enzima LanM.....	62
Figura 28. Alineamiento del dominio N-terminal de la enzima putativa LanT	63
Figura 29. Secuencia del propéptido A y B.....	65
Figura 30. Alineamiento del péptido líder del Propéptido A contra diversos PL de clase II.....	66
Figura 31. Alineamiento del péptido líder LanA contra el péptido líder de los lantipéptidos tipo cinamicina	66
Figura 32. Predicción de la estructura secundaria del péptido líder.....	67
Figura 34. Diagrama de Wenxiang.....	67
Figura 33. Estructura secundaria y proyección de rueda helicoidal	67
Figura 35. Secuencia del Propéptido A con las putativas modificaciones postraduccionales	69
Figura 36. Estructura prevista para el Propéptido A mediante RiPPMiner	69
Figura 37. Alineamiento del dominio C-terminal del putativo LuxR contra el regulador LiaR.....	71
Figura 38. Estructura de tallo-bucle identificada entre la región espaciadora del gen <i>lanA</i> y <i>lanM</i>	72
Figura 39. PCR de los plásmidos para la la identificación del gen <i>lanA</i> en gel de agarosa 0.8%	75

Figura 40. Verificación del patrón de bandas de la construcción pFGC- <i>lanA</i> , en gel de agarosa 0.8% (m/v).....	76
Figura 41. Resultados de la secuenciación de la construcción pFGC- <i>lanA</i>	76
Figura 42. PCR de los plásmidos para la identificación del gen <i>lanA</i> en gel de agarosa 0.8% (m/v).....	77
Figura 43. Verificación la liberación del inserto de la construcción pRSFDuet- <i>lanA</i> , en gel de agarosa 0.8% (m/v).....	78
Figura 44. Resultados de la secuenciación de la construcción pRSFDuet- <i>lanA</i>	78
Figura 45. Visualización de las reacciones de <i>cell-free</i>	80
Figura 46. Separación y visualización de las proteínas presentes en la reacción CFPS de la construcción pFGC- <i>lanA</i> en gel de Tris-Tricina-SDS al 16% (m/v) de poliacrilamida.	81
Figura 47. Separación y visualización de las proteínas presentes en la reacción CFPS de la construcción pFGC- <i>lanA</i> en gel de SDS-PAGE al 16% (m/v) de poliacrilamida.	82
Figura 48. Separación y visualización de las proteínas presentes en la reacción CFPS de la construcción pFGC- <i>lanA</i> en gel de SDS-PAGE al 16% (m/v) de poliacrilamida.	83

Índice de tablas

Tabla 1. Modificaciones postraduccionales adicionales identificadas en lantipéptidos	26
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen <i>lanA</i>	42
Tabla 3. Componentes de la reacción de digestión con <i>EcoRI</i>	43
Tabla 4. Componentes de la reacción de digestión con <i>HindIII</i>	44
Tabla 5. Componentes de la reacción de ligación.....	44
Tabla 6. Componentes de la reacción de ensamble Golden Gate	45
Tabla 7. Condiciones de la reacción de ensamble Golden Gate	45
Tabla 8. Condiciones de la reacción para la expresión libre de células (<i>cell-free</i>)	48
Tabla 9. Características de los genomas de las cepas de interés.....	50
Tabla 10. Clústeres asociados a la producción de bacteriocinas y lantipéptidos identificados en antiSMASH 6.1.1	50
Tabla 11. Clústeres asociados a la producción de bacteriocinas y lantipéptidos identificados en BAGEL4.....	51
Tabla 12. Clústeres asociados a la producción de bacteriocinas y lantipéptidos identificados en PRISM4.4.4.....	51
Tabla 13. Funciones putativas identificadas para los genes codificados en el clúster 21	53
Tabla 14. Resultados de los alineamientos de la enzima putativa LanL (clúster 21)..	53
Tabla 15. Resultados de los alineamientos de la enzima putativa LanL con una cobertura del 100% (clúster 21)	54
Tabla 16. Funciones putativas identificadas para los genes codificados en el clúster 3.	57
Tabla 17. Resultados de los alineamientos de la enzima putativa LanM (clúster 3) ...	59
Tabla 18. Resultados de los alineamientos de la enzima putativa LanM con una cobertura del 100% (clúster 3).....	59
Tabla 19. Puntuación dada a los alineamientos del péptido estructural A, con secuencias de lantipéptidos ya reportadas.....	68
Tabla 20. Pesos moleculares predichos para el Propéptido A en función de los residuos Ser/Thr deshidratados.....	69
Tabla 21. Pesos esperados de las construcciones con el gen <i>lanA</i>	82

Tabla de abreviaturas

BGC	Clúster de genes biosintéticos
PN	Producto natural
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Dha	Dehidroalanina
Dhb	Dehidrobutirina
Lan	Lantionina
MeLan	Metilantionina
PL	Péptido líder
Da	Daltones
kDa	Kilodaltones
pb	Pares de bases
nt	Nucléotidos
GC	Contenido de guanina-citosina
aa	Aminoácido
o/n	<i>Over night</i> (toda la noche)
MW	Masa molecular
min	Minutos
h	Horas
s	Segundos
μL	Microlitros
μg	Microgramos
ng	Nanogramos
U	Unidad
cbp	Cuanto baste para
M	Molar
N	Normal
mM	Milimolar
% v/v	Porcentaje volumen/volumen
% m/v	Porcentaje masa/volumen

Resumen

En los últimos años la resistencia bacteriana a los medicamentos (RAM) ha sido un problema de salud pública que se ha ido incrementando exponencialmente. Se estima para las siguientes décadas un mayor número de muertes asociadas a microorganismos multidrogo-resistentes, hasta alcanzar cifras alrededor de los diez millones de decesos mundiales, superando a enfermedades como el cáncer. En contraparte, la investigación y el desarrollo de nuevos medicamentos se ha estancado, por lo que resulta de vital interés la investigación de nuevas moléculas con actividad antibacteriana. Los lantipéptidos han llamado la atención dada su potencial actividad antibacteriana contra patógenos de interés clínico, sobre todo aquellos englobados en el grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp.). Estos son péptidos pequeños producidos ribosomalmente y modificados postraduccionalmente y su uso se visualiza como una estrategia prometedora contra la RAM. Los clústeres de genes biosintéticos (BGC) de lantipéptidos pueden ser aislados de diversos organismos vivos provenientes de distintas fuentes ecológicas; entre los que podemos mencionar a los endófitos, que son microorganismos que crecen en el interior de las plantas. El objetivo de este proyecto fue la identificación de un clúster de genes biosintético inédito productor de un lantipéptido en un microorganismo endófito aislado de la planta *Amphipterygium adstringens*. Se identificó un clúster de posibles genes biosintéticos de un lantipéptido clase II en el genoma del endófito *Embleya* sp. NF3, se realizó la caracterización bioinformática de los genes responsables de la producción del lantipéptido y se determinó que este BGC puede producir un péptido novedoso con potencial actividad antibacteriana. Se llevó a cabo la clonación del gen biosintético *lanA* y se probó su expresión en el hospedero heterólogo *Escherichia coli* mediante la técnica *cell-free*. En este proyecto se logró identificar un BGC novedoso a partir de un endófito no estudiado, además se realizó la clonación del gen que da origen al péptido precursor, y este servirá como base para futuros proyectos en los que se pruebe la actividad antibacteriana del lantipéptido maduro.

Marco teórico

I. Resistencia bacteriana a los antibióticos

Los antibióticos son sustancias químicas que impiden el desarrollo o favorecen la muerte de bacterias y se utilizan para tratar o prevenir infecciones en situaciones clínicas y veterinarias (Nelson *et al.*, 2019). El uso indiscriminado de estos medicamentos ha resultado en la aparición de resistencia a antibióticos, considerada como una crisis mundial y que se reconoce como un problema importante en el tratamiento de infecciones microbianas (Kapoor *et al.*, 2017). Este es un proceso en el que un agente antimicrobiano ya no es eficaz contra una bacteria, aunque previamente podía eliminarla (Nelson *et al.*, 2019). El costo de la resistencia es inmenso, tanto económicamente como para la salud y la vida de las personas. Se ha estimado que a nivel mundial aproximadamente 700 000 muertes se encuentran asociadas a la resistencia a los antibióticos y esto podría aumentar a 10 millones por año para 2050, con un costo de alrededor de £ 60 billones (O'Neill, 2016).

A los microorganismos que comúnmente muestran mecanismos de resistencia a por lo menos tres antibióticos se les conoce como multidrogo-resistentes (MDR). Dentro de esta clasificación se encuentra el grupo denominado ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp.). Este grupo se considera una de las amenazas más graves en el problema de resistencia bacteriana (Kon & Rai, 2016), y comúnmente se encuentran asociados a infecciones nosocomiales que conducen a un alto riesgo de muerte, así como un mayor costo económico (Yu-Huan *et al.*, 2019). En 2019, el Centro de Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC), publicó una lista de patógenos para los cuales es necesaria la investigación de nuevas terapias que sean efectivas para el tratamiento de infecciones provocadas por estos microorganismos, y dentro de la cual, ESKAPE es designado como una necesidad prioritaria. Además, la investigación y desarrollo de nuevos medicamentos que atiendan esta problemática ha ido disminuyendo. La FDA reportó la aprobación de tan sólo 9 fármacos antimicrobianos entre 2018 y 2019 (Figura 1; Andrei *et al.*, 2019) por lo que existe aún la necesidad inherente de desarrollar nuevas estrategias que ayuden a sobrellevar esta problemática.

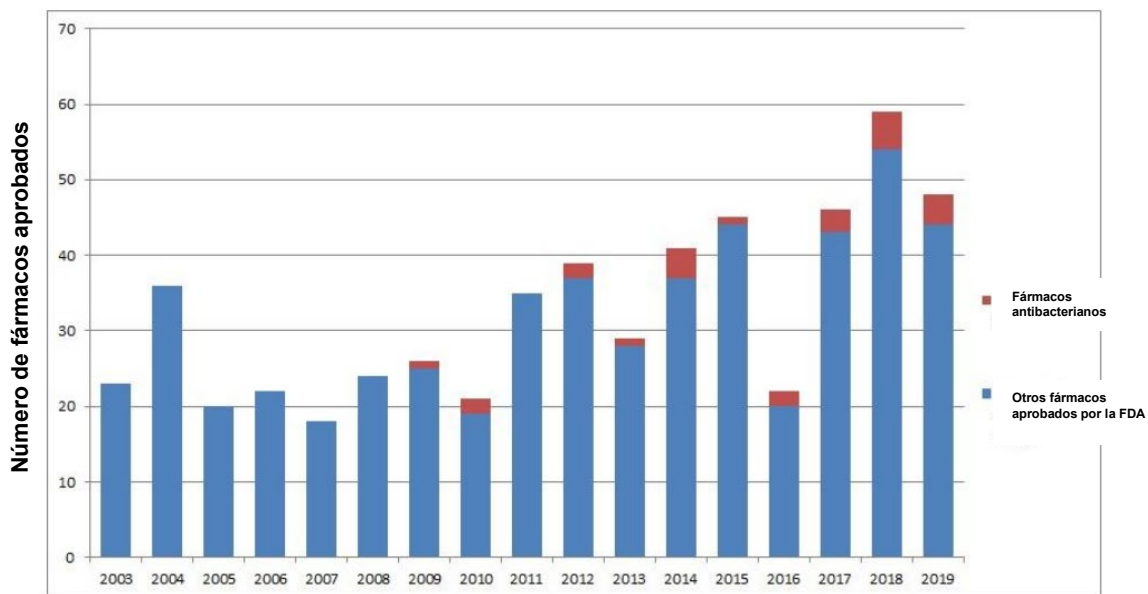


Figura 1. Fármacos aprobados por la FDA entre 2003-2019. Modificado de Andrei *et al.* (2019).

II. Actinobacterias: fuente de productos naturales

Un grupo de compuestos que han sido utilizados como el pilar del descubrimiento de moléculas bioactivas con importantes aplicaciones clínicas, han sido los productos naturales (PN). Estos son compuestos químicos producidos por organismos vivos como bacterias, hongos, plantas y algunos animales marinos, cuya variedad de actividades biológicas es consecuencia de su diversidad estructural (Sorokina & Steinbeck, 2020). Específicamente para el grupo de hongos y bacterias, a los PN comúnmente se les denomina metabolitos secundarios, debido a que son principalmente producidos en la fase estacionaria de su crecimiento. Se sabe que estos no son necesarios para el crecimiento del organismo productor en condiciones de laboratorio, pero que proveen ventajas adaptativas en su ambiente natural (Katz & Baltz, 2016). Más de 23,000 productos naturales han sido caracterizados, en donde alrededor del 40% fue identificado en actinobacterias y específicamente el género *Streptomyces* (Figura 2) ha sido el productor del 80% de los metabolitos aislados de este grupo microbiano (Bérdy, 2012).

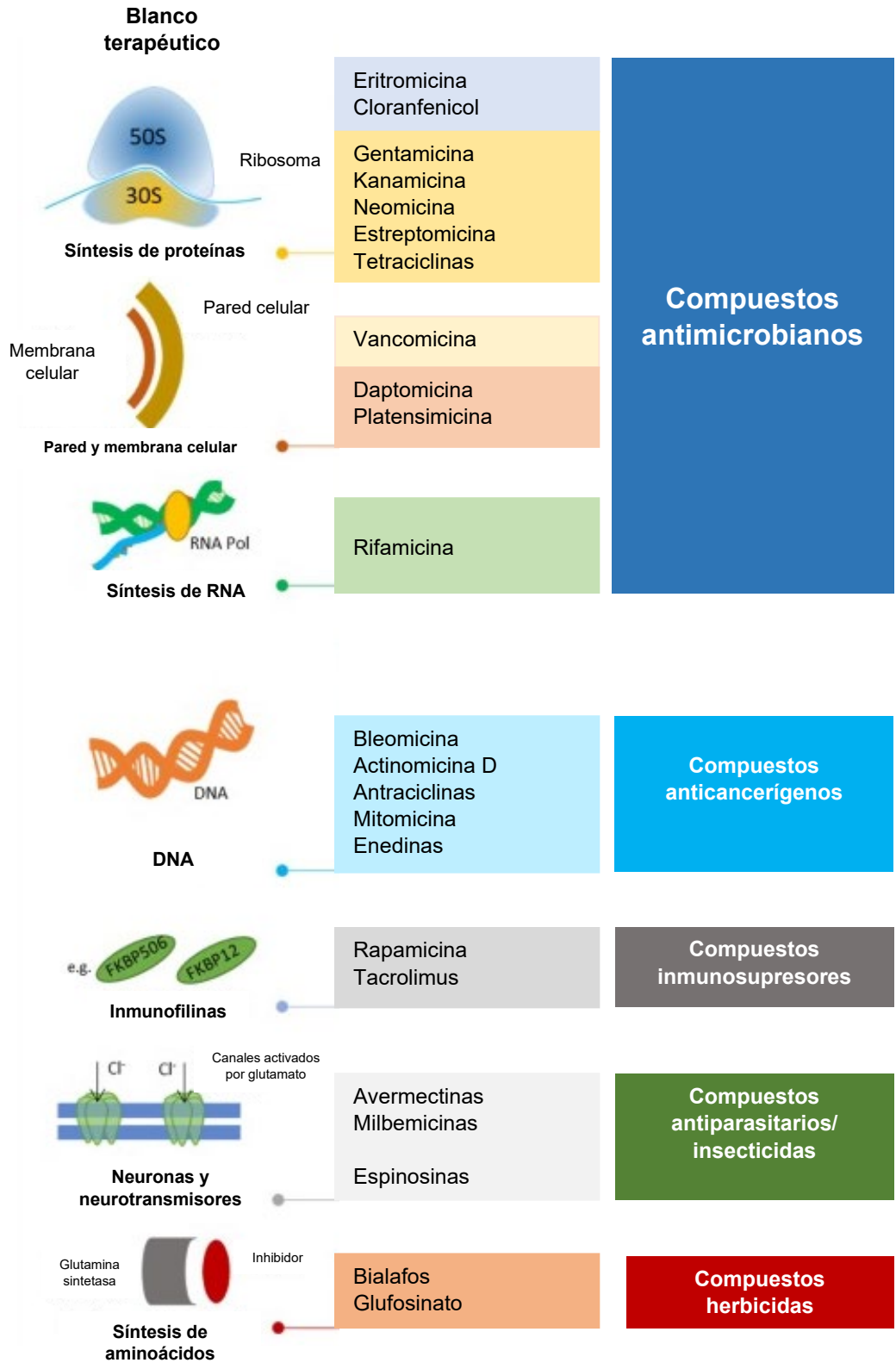


Figura 2. Algunos ejemplos de fármacos y compuestos aislados de *Streptomyces*, y sus blancos de acción. Modificado de Jose *et al.* (2021).

Estos compuestos interactúan con sus objetivos celulares con alta eficiencia y selectividad y, además, poseen características intrínsecas que les permiten penetrar barreras celulares bacterianas con facilidad (Wright, 2017). La actividad biológica más habitual relacionada a los PN es su actividad antimicrobiana (Katz & Baltz, 2016), aproximadamente 200 de los PN se han utilizado directamente como fármacos (Dan & Dai, 2020) lo que resalta el interés en el estudio de este grupo de compuestos.

Actualmente, se ha demostrado que cada cepa puede llegar a producir de 25 a 75 metabolitos secundarios, la mayoría de los cuales no han sido caracterizados (Belknap *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2020) lo que demuestra que este grupo todavía no ha sido aprovechado en su totalidad y que aún se pueden aislar compuestos con interesantes actividades biológicas.

II.I Microorganismos endófitos

En los últimos años se han aislado actinobacterias de fuentes distintas a su hábitat natural, específicamente llama la atención la interacción que este grupo bacteriano puede formar con organismos superiores como algunos animales marinos, insectos y plantas. Específicamente a estos últimos se les conoce como microorganismos endófitos, los cuales pueden crecer dentro de los tejidos vegetales y no causar ningún daño aparente a sus hospederos (Khare *et al.*, 2018).

La relación entre la planta huésped y el microorganismo endófito puede reflejar una interacción compleja en la que se comparten distintos mecanismos atribuibles a uno de los organismos (Figura 3). Se estima que las 300,000 especies de plantas que se han descrito en el planeta poseen al menos uno o más endófitos (Afzal *et al.*, 2019). En un estudio realizado por Yu *et al.* (2010) se realizó una comparación de los compuestos con actividad antimicrobiana aislados de distintas fuentes, donde se observa que las plantas medicinales son un excelente productor de estas sustancias bioactivas (Figura 4); aunque en dicho estudio se concentró el interés en los hongos endófitos, no se puede pasar de largo el rol que juegan estas plantas como fuente valiosa de compuestos bioactivos, ya que se conoce que los endófitos de plantas medicinales pueden estar involucrados en los efectos terapéuticos de su hospedero al poder participar en las vías metabólicas del mismo, lo que mejora su propia bioactividad o incluso, se adquieren genes para producir algún compuesto similar al del hospedero (Golinska *et al.*, 2015).

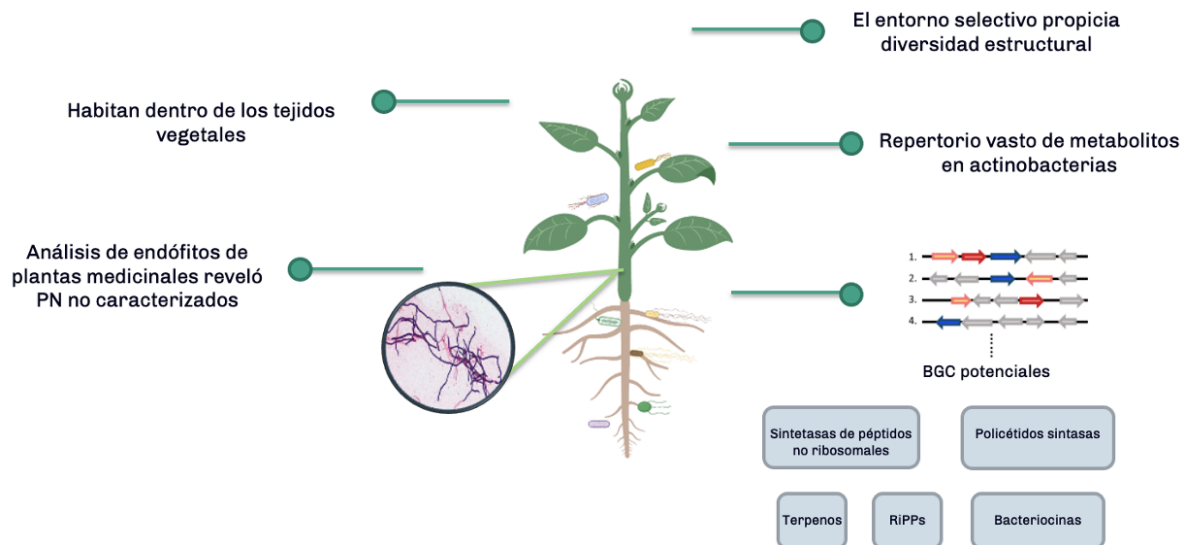


Figura 3. Los microorganismos endófitos como fuente prometedora de diversos compuestos bioactivos. Elaboración propia.

Además de estas cualidades, la asociación planta-microorganismo proporciona diversos efectos benéficos para la planta entre los que destaca la modulación indirecta del crecimiento del hospedero relacionado a la inhibición de fitopatógenos, al ser productores de algunas sustancias como toxinas, sideróforos, enzimas líticas y antimicrobianos (Afzal *et al.*, 2019). Estudios del genoma de algunos endófitos han demostrado la presencia de genes involucrados en la síntesis de compuestos antimicrobianos (Santoyo *et al.*, 2016), por lo que se considera que estos microorganismos también tienen el potencial de producir metabolitos especializados o compuestos con actividad biológica con capacidad de explotarse en la industria farmacéutica (Singh *et al.*, 2017).

Específicamente, las actinobacterias aisladas de plantas medicinales pueden llegar a albergar una gran diversidad de clústeres de genes biosintéticos debido a las adaptaciones naturales que genera el microambiente en donde se encuentra, lo que aumenta la posibilidad de obtener compuestos novedosos de este nicho ecológico (Golinska *et al.*, 2015).

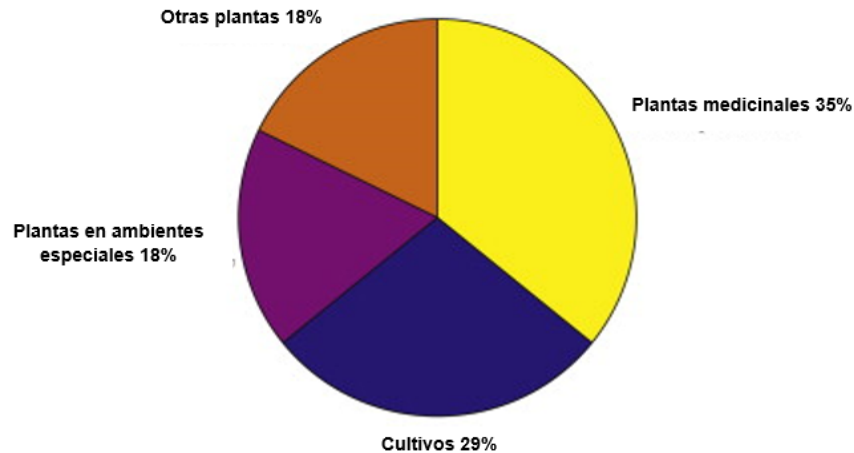


Figura 4. Proporción de compuestos con actividad antimicrobiana aislados de distintas fuentes vegetales. Modificado de Yu *et al.* (2010).

III. Bacteriocinas

En la actualidad se han descrito numerosas familias de PN, pero un grupo al que se ha mostrado especial interés son las bacteriocinas, pues de manera industrial se han utilizado bajo distintos enfoques, ya sea como bioconservantes naturales en la industria alimenticia, o como agentes antimicrobianos en el ámbito clínico (Fahim *et al.*, 2016). Estos son producidos por bacterias que viven en un entorno polimicrobiano competitivo y que son utilizadas para competir con otras especies de bacterias estrechamente relacionadas (Simons *et al.*, 2020). Este grupo está conformado por péptidos antimicrobianos sintetizados ribosomalmente. Debido a la gran diversidad que presentan las bacteriocinas, se suelen clasificar de acuerdo con el microorganismo productor ya sean Gram positivos, Gram negativos o arqueas. Las bacteriocinas producidas por microorganismos Gram positivos a su vez, se dividen de acuerdo con distintas características estructurales, funcionales y genéticas en cuatro clases principales (Simons *et al.*, 2020). En la clase I y II se engloba a aquellos péptidos pequeños con peso menor a 5 kDa; en la clase III se engloba a aquellas bacteriocinas con peso superior a 30 kDa, mientras que en la clase IV se clasifican aquellos péptidos cíclicos. La diferencia distintiva entre los péptidos de la clase I y II recae en las modificaciones postraduccionales presentes en las bacteriocinas de la clase I y ausentes en los representantes de la clase II.

III.I Lantipéptidos

Las modificaciones postraduccionales en las bacteriocinas de clase I hacen referencia al producto de dos procesos que se efectúan en los péptidos precursores de estas bacteriocinas (Figura 5), también es la razón por la que a esta clase de bacteriocinas se les clasifica también como péptidos producidos ribosomalmente y modificados postraduccionalmente (RiPPs). La primera modificación corresponde a una deshidratación de los aminoácidos serina (Ser) y treonina (Thr), lo que genera dehidroalanina (Dha) y dehidrobutirina (Dhb), respectivamente (Figura 5a). Posteriormente, sufren un ataque nucleofílico por el grupo tiol (-SH) de los residuos de cisteína (Cys) presentes en la secuencia aminoacídica del propio péptido (reacción de ciclación), dando origen a las estructuras de lantionina (Lan) y 3-metil-lantionina (MeLan) (Figura 5b), que son típicas de esta clase de bacteriocinas (Van der Donk & Nair, 2014). Debido a estas características estructurales, a los miembros de este grupo se les denomina comúnmente como lantipéptidos o lantibióticos, cuando presentan actividad antibacteriana. Las modificaciones postraduccionales generan un péptido reticulado que les confiere a estas moléculas resistencia a amplios rangos de pH, temperatura, oxidación y proteólisis (Ríos *et al.*, 2016).

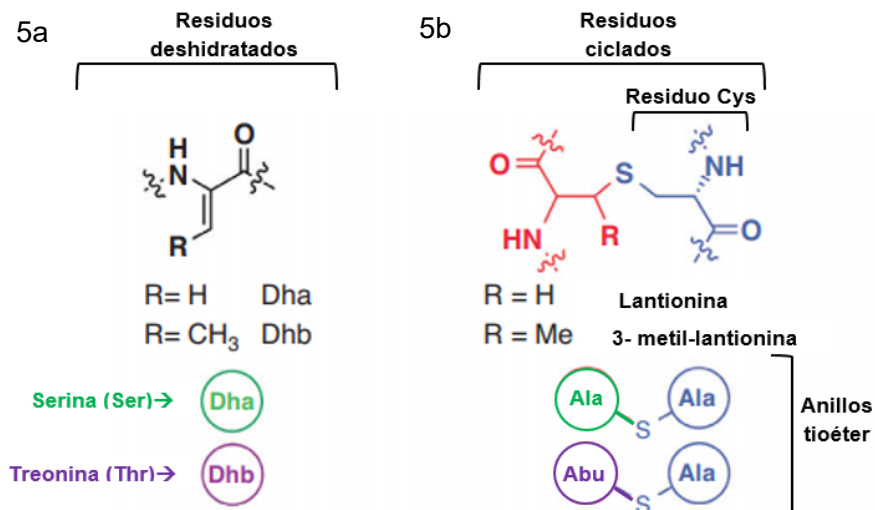


Figura 5. Estructura de las modificaciones postraduccionales características del grupo de los lantipéptidos. Modificado de Van der Donk & Nair, 2014.

Los lantipéptidos han sido objeto de estudio durante varias décadas. Dada sus características estructurales, representan una gran gama de oportunidad de investigación en la búsqueda de nuevos productos naturales con actividad antibacteriana.

III.I.1 Clasificación

Para que las modificaciones postraduccionales se efectúen en los péptidos precursores, se requiere de enzimas especializadas en los procesos de deshidratación y ciclación donde se forman los anillos de lantionina y metil-lantionina (en la siguiente sesión se analizarán a mayor detalle la biosíntesis). A estas enzimas se les conoce como deshidratasa y ciclasa, en función a la reacción que catalizan. Debido a la gran diversidad de lantipéptidos que se han descrito en la actualidad, se suelen subclasificar en cuatro clases de acuerdo con la maquinaria enzimática encargada de realizar las modificaciones al péptido precursor (LanA) como se muestra en la Figura 6.

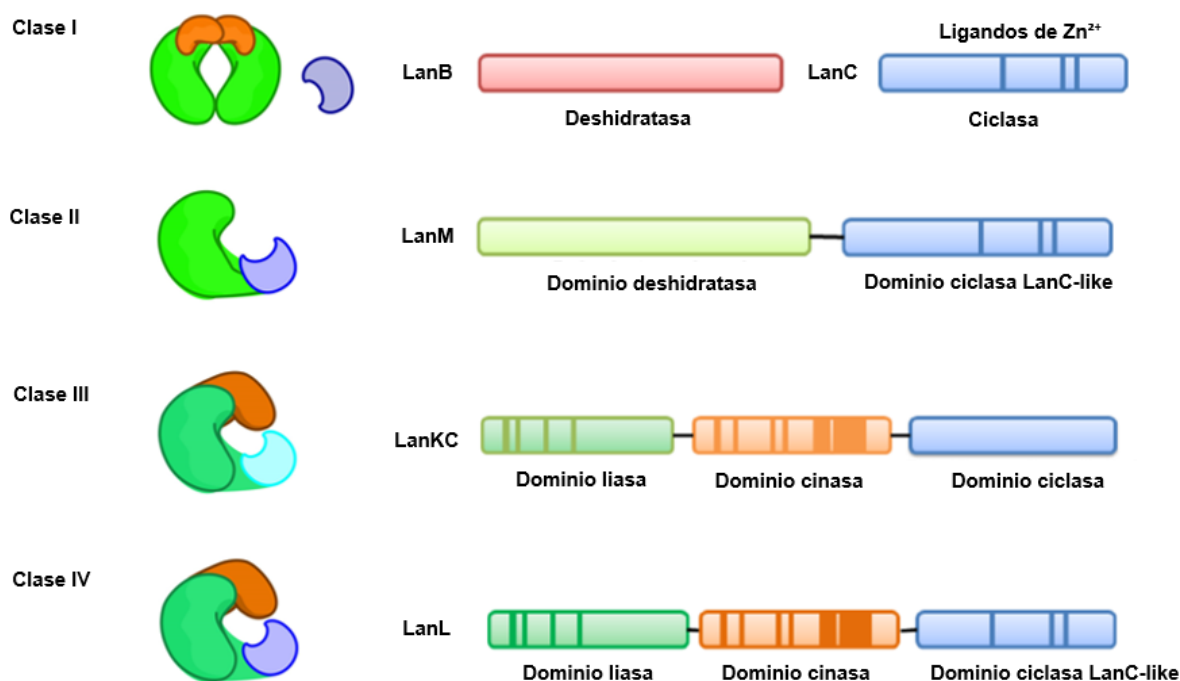


Figura 6. Clasificación de los lantipéptidos con base en la maquinaria enzimática. Modificado de Van der Donk & Nair, 2014 y Lagedroste *et al.*, 2020.

En los lantibióticos de clase I el paso de deshidratación es catalizado por la enzima LanB, mientras que la ciclación es efectuada por la enzima LanC, ambas con actividad individual. LanB es una proteína de la familia de las deshidratatas que muestra homología con las enzimas biosintéticas involucradas en la formación de otros RiPPs como los tiopéptidos y cuyo mecanismo de acción involucra la glutamilación de los residuos Ser y Thr del péptido precursor usando glutamil-tRNA (Montalbán *et al.*, 2017), para posteriormente extraer un protón α de la Ser/Thr glutamilada, lo que genera los aminoácidos deshidratados Dha y Dhb (Van der Donk & Nair, 2014). Por su parte, la enzima LanC es una proteína que une a ligandos de zinc, el cual es un ión catalíticamente importante para la reacción de ciclación, ya que se propone que activa los Cystioles en LanA para efectuar el ataque nucleofílico sobre los aminoácidos deshidratados, generando la estructura de tioéter (Li *et al.*, 2006; Van der Donk & Nair, 2014).

Para las otras clases de lantipéptidos, los procesos postraduccionales son catalizados por una única enzima: los lantipéptidos clase II son procesados por la enzima bifuncional denominada LanM, mientras que para los péptidos de clase III y IV este procesamiento es catalizado por las enzimas trifuncionales LanKC y LanL, respectivamente (Van der Donk *et al.*, 2012).

Las enzimas LanM presentan dos dominios estructurales responsables de la formación de las lantioninas y metil-lantioninas. Por un lado, en el extremo amino terminal se encuentran los motivos necesarios para la reacción de deshidratación mediante un mecanismo de fosforilación y desfosforilación de los aminoácidos Ser y Thr, que aún no es completamente elucidado (Ma *et al.* 2014); mientras que en el extremo carboxilo terminal se ubica el dominio ciclasa, el cual es homólogo a la enzima ciclasa LanC, responsable de ciclar a los lantipéptidos de clase I. Por otro lado, las enzimas LanKC y LanL presentan tres dominios de secuencia característicos: una región liasa fosfo-Ser/fosfo-Thr en el extremo amino terminal, una región cinasa en el centro de la secuencia y la región encargada de la ciclación en el extremo carboxilo terminal. Los dominios de liasa y cinasa son los responsables de la reacción de deshidratación en el péptido precursor: por un lado, el dominio de cinasa se encarga de fosforilar a los aminoácidos serina y treonina, mientras que el dominio de liasa se encarga de sustraer el grupo fosfato de estos aminoácidos, con la subsecuente pérdida de una molécula de agua al final del proceso (Goto *et al.*, 2010). La diferencia entre las enzimas LanKC y LanL radica en el dominio responsable de la ciclación. Para el caso de LanL, este dominio es homólogo a la enzima LanC de los lantipéptidos de clase I, y esta

modificación se realiza bajo el mismo mecanismo de acción descrito para esta clase de lantipéptidos. Por otro lado, el dominio de LanKC no muestra homología con LanC, y el mecanismo de ciclación es diferente al utilizado por esta clase proteínas.

III.I.2 Biosíntesis

Todas las modificaciones postraduccionales que dan lugar al lantipéptido maduro, son catalizadas sobre la secuencia aminoacídica del péptido precursor LanA. Durante la biosíntesis, el primer paso consiste en la producción de dicho péptido por parte del ribosoma bacteriano. Posteriormente, se lleva a cabo la deshidratación de los aminoácidos serina y treonina por la enzima deshidratasa LanB, o por el dominio de deshidratación, dependiendo de la clase de lantipéptido a la que se refiera. Este paso genera los aminoácidos deshidratados dehidroalanina (Dha) o dehidrobutirina (Dhb) como se observa en la Figura 7.

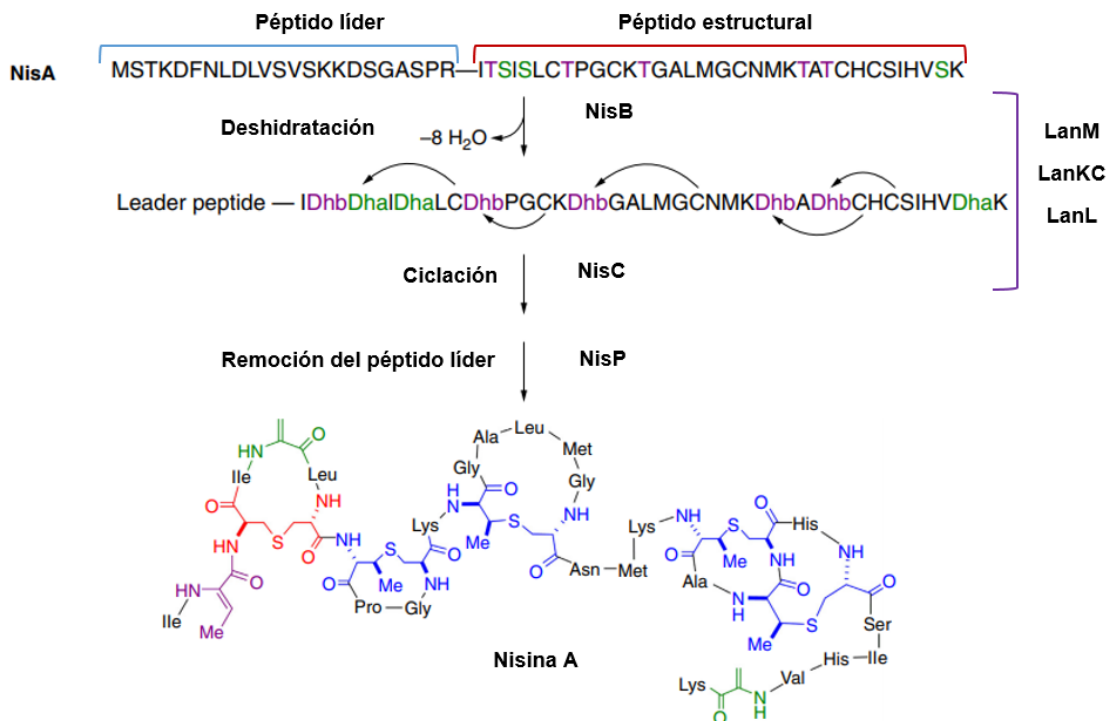


Figura 7. Ruta sintética para la producción de un lantipéptido de clase I. En los lantipéptidos de clase II, III y IV, el paso de deshidratación y ciclación es catalizado por una única enzima. Modificado de Van der Donk & Nair, 2014.

En seguida, se forman las lantioninas y las metil-lantioninas al catalizarse la reacción de ciclación por la enzima LanC, o el dominio de ciclación de las enzimas LanM, LanL o LanKC. El anillo se forma mediante un ataque nucleofílico de los grupos tioles de los residuos de cisteína (Cys) a los aminoácidos deshidratados, mediante una adición tipo Michael.

Algunos autores mencionan que las modificaciones de deshidratación y ciclación (para los lantipeptidos de clase I) son independientes entre sí; sin embargo, en investigaciones recientes se ha observado que esas reacciones se encuentran acopladas (Figura 8), y se ha llegado a sugerir que estas enzimas pueden interactuar entre sí (Chen & Kuipers, 2021). Para el caso de la enzima LanM, y haciendo un símil a los lantipeptidos de clase I, la reacción de deshidratación se lleva a cabo primero en el dominio amino terminal y posteriormente es llevada a cabo la reacción de ciclación en el otro extremo.

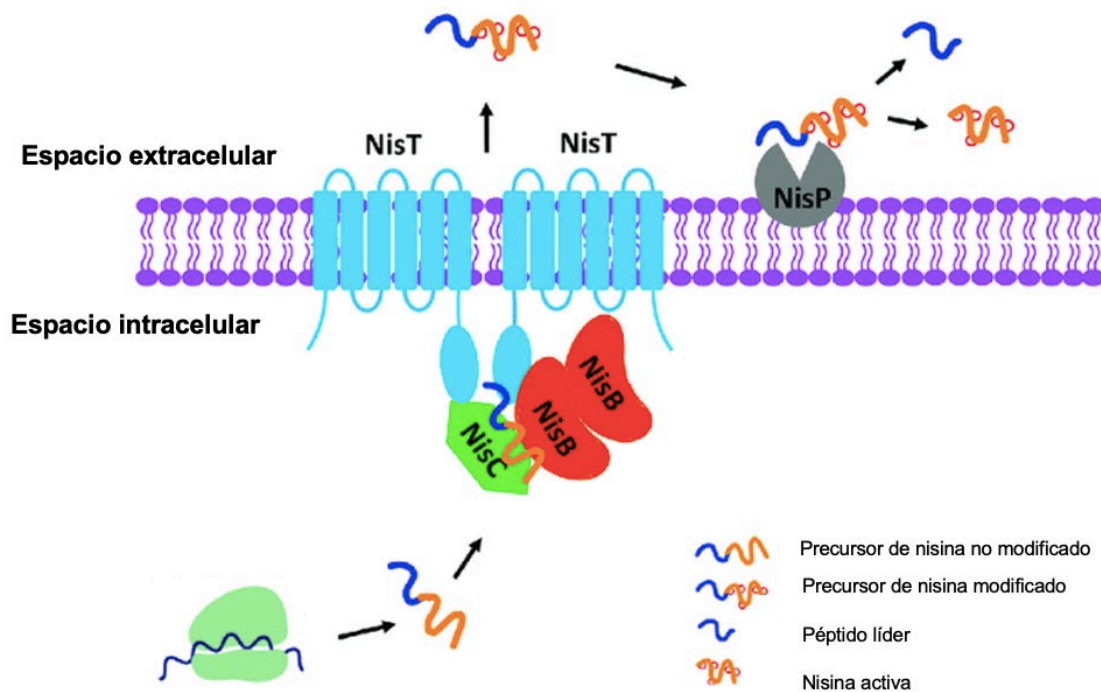


Figura 8. Ubicación de las enzimas biosintéticas en la formación de la nisina. NisB: deshidratasa; NisC: ciclasa; NisT: transportador; NisP: proteasa. Modificado de Chen & Kuipers, 2021.

Por su parte, las enzimas LanL y LanKC catalizan como primer paso la fosforilación de los aminoácidos Ser y Thr mediante su dominio central de cinasa; posteriormente, el dominio

liasa retira el grupo fosfato generando así los aminoácidos deshidratados Dha y Dhb. Por último, el dominio de ciclasa genera los anillos en LanA (Goto *et al.*, 2010; Iftime *et al.*, 2015)

Independientemente de la clase de lantipéptido del que estemos hablando y una vez que se llevó a cabo la formación de los anillos de lantionina y metil-lantionina, es necesario remover el péptido líder de LanA para que el lantipéptido modificado (sin péptido líder) presente bioactividad. Este proceso lo realiza una proteasa específica que reconoce determinados dominios en el péptido líder.

Para los lantipéptidos de clase I, el corte lo realiza la enzima LanP; en los lantipéptidos de clase II, la proteólisis del péptido líder la realiza un dominio de proteasa presente en la región amino terminal del transportador LanT. Este dominio reconoce un sitio de doble glicina en el extremo carboxilo del péptido líder. Actualmente, se ha descrito que este motivo puede ser Gly-Gly/Ala/Ser. En los lantipéptidos de clase III y IV no se ha descrito a una proteasa que realice este corte enzimático y, de forma esperada, generalmente en el BGC de estos RiPPs no se ubica alguna enzima con actividad proteolítica (Asaduzzaman *et al.*, 2011; Basi-Chipalu, 2016; Repka *et al.*, 2017)

Por último, es necesario realizar el transporte del lantipéptido al exterior de la célula mediante un transportador anclado a la membrana celular. Generalmente, los transportadores involucrados en este proceso de biosíntesis pertenecen a la familia de transportadores de casete dependientes de ATP (ABC) para las cuatro familias de lantipéptidos descritas hasta el momento (Repka *et al.*, 2017)

Es importante mencionar que el lantipéptido solo es activo hasta que el péptido líder sea removido de LanA, por tanto, los procesos de proteólisis y transporte de los lantipéptidos se encuentran mayormente relacionados para actuar simultáneamente o muy sincronizados (Figura 8). Para la clase I, LanP se localiza fuera de la membrana celular, y el proceso de transporte se realiza previo al corte del péptido líder. En la clase II, la proteólisis es seguida inmediatamente del transporte, y el dominio de proteasa de LanT se ubica en la región citoplasmática de la bacteria (Chen & Kuipers, 2021)

III.1.3 Otras modificaciones postraduccionales

Adicionalmente a la formación de los anillos de lantionina y metil-lantionina, se han descrito algunas otras modificaciones postraduccionales adicionales en los lantipéptidos (*Tailoring PTM*). Los genes encargados de realizar estas modificaciones comúnmente se encuentran agrupadas en los mismos BGC y le ofrecen al péptido algunas características adicionales como una mejora en la estabilidad al ataque de diversas enzimas proteolíticas (Knerr & Van der Donk, 2012). A continuación, en la Tabla 1 se muestran algunas de las modificaciones adicionales observadas en los lantipéptidos (Knerr & Van der Donk, 2012; Montalbán-López *et al.*, 2012; Mu, 2015).

Tabla 1. Modificaciones postraduccionales adicionales identificadas en lantipéptidos. Recopilado de Knerr & Van der Donk, 2012; Montalbán-López *et al.*, 2012; Mu, 2015.

Modificación	Enzima encargada	Clase en la que se ha observado	Ejemplo de lantipéptido
Generación de D-Ala	LtnJ	II	Lacticina 3147
Descarboxilación oxidativa: formación de aminovinilcisteínas (AviMeCys)	LanD	I & II	Epidermina Mersacidina
Formación de lisinoalanina	Cinorf7	II	Cinamicina
Hidroxilación de aspartato	CinX		
Halogenación: cloración del triptófano	LanH (MibH): halogenasa de triptófano dependiente de flavina	I	Microbisporicina

Hidroxilación de prolina	Citocromo P450		
Formación de D-lactato	ElxO: oxidorreductasa dependiente de NADPH	I	Epilacina 15X
Oxidación de tioéter	---	II	Actagardina A
Formación de sulfóxido	GarO: monooxigenasa tipo luciferasa	II	Deoxiactagardina B
Enlace disulfuro	Espontáneo	II	Bovicina HJ50, Péptido α de la Haloduracina y plantaricina W

III.I.4. Organización del clúster biosintético

A los genes involucrados en la producción de estos péptidos se les conoce genéricamente como *lan*, y comúnmente se encuentran agrupados en clústeres (BGC; Figura 9). Un clúster típico se encuentra compuesto principalmente por los genes del péptido precursor y las enzimas biosintéticas.

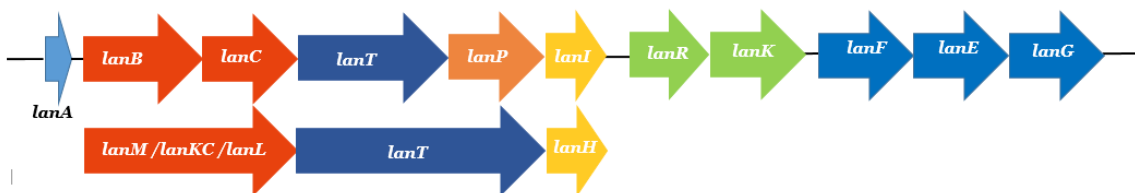


Figura 9. BGC típico asociado a la producción de un lantipéptido. *lanA*: péptido precursor; *lanB*: deshidratasa; *lanC*: ciclasa; *lanT*: transportador ABC; *lanP*, proteasa; *lanR* & *lanK*, *lanI*, *lanFEG* & *lanH*: genes de inmunidad. Elaboración propia.

El gen *lanA*, codifica al propéptido que se compone de dos partes: del péptido líder y el péptido estructural. Las enzimas que realizan las modificaciones postraduccionales se encuentran distribuidas en los genes *lanB* (deshidratasa) y *lanC* (ciclasa) para los lantipéptidos de clase I y en los genes *lanM*, *lanKC* y *lanL*, para las clases II, III y IV, respectivamente (Basi-Chipalu, 2016). En el clúster también se encuentra el gen *lanT* que codifica para un transportador ABC dedicado al transporte del péptido; el gen *lanP* que es el responsable de generar la proteasa encargada de escindir el péptido líder del lantipéptido inmaduro, y genes involucrados en la inmunidad del hospedero contra sus propias bacteriocinas (*lanFEG* y *lanI*), así como genes reguladores (*lanR* y *lanK*) (Van der Donk *et al.*, 2014). Adicionalmente, se pueden localizar otros genes que codifiquen para alguna enzima con una actividad específica sobre el lantipéptido, pero generalmente esto depende del lantipéptido en cuestión.

Específicamente en actinobacterias, se ha observado la presencia de diversos genes que codifican enzimas que realizan modificaciones postraduccionales no descritos en lantipéptidos de otros phyla (ver Tabla 1). Asimismo, se han observado algunos otros genes dentro del BGC involucrados en el procesamiento de metabolitos secundarios diferentes a los lantipéptidos. En un estudio bioinformático realizado por Zhang *et al.* (2015), se encontró que muchos de los clústeres asociados a producción de lantipéptidos presentan sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPS) y genes de policétidos sintasa, lo que sugiere que este phyla puede ser productor de una gran diversidad de productos naturales al entrecruzar vías de síntesis entre péptidos ribosomales y no ribosomales.

En este aspecto, es importante resaltar la enorme presencia de estos BGC en cepas pertenecientes al grupo de las actinobacterias. Recientemente, Belknap *et al.* (2020) analizaron el genoma de 1,110 cepas de *Streptomyces* y encontraron presencia de estos clústeres en 540 genomas (Figura 10), lo que los ubica dentro de los cinco BGC con mayor abundancia en este grupo bacteriano. En otro estudio enfocado en la búsqueda de RiPPs dentro del genoma de 629 actinobacterias, se encontró que los lantipéptidos de clase III representaban la clase con mayor abundancia dentro del genoma de las cepas, seguido por las clases I, II y IV lo que, sumado, demuestra que estos péptidos se ubican ampliamente distribuidos en las actinobacterias (Poorinmohammad, Bagheban & Hamedi, 2019), lo que hace aún más atractiva la investigación de estos BGC.

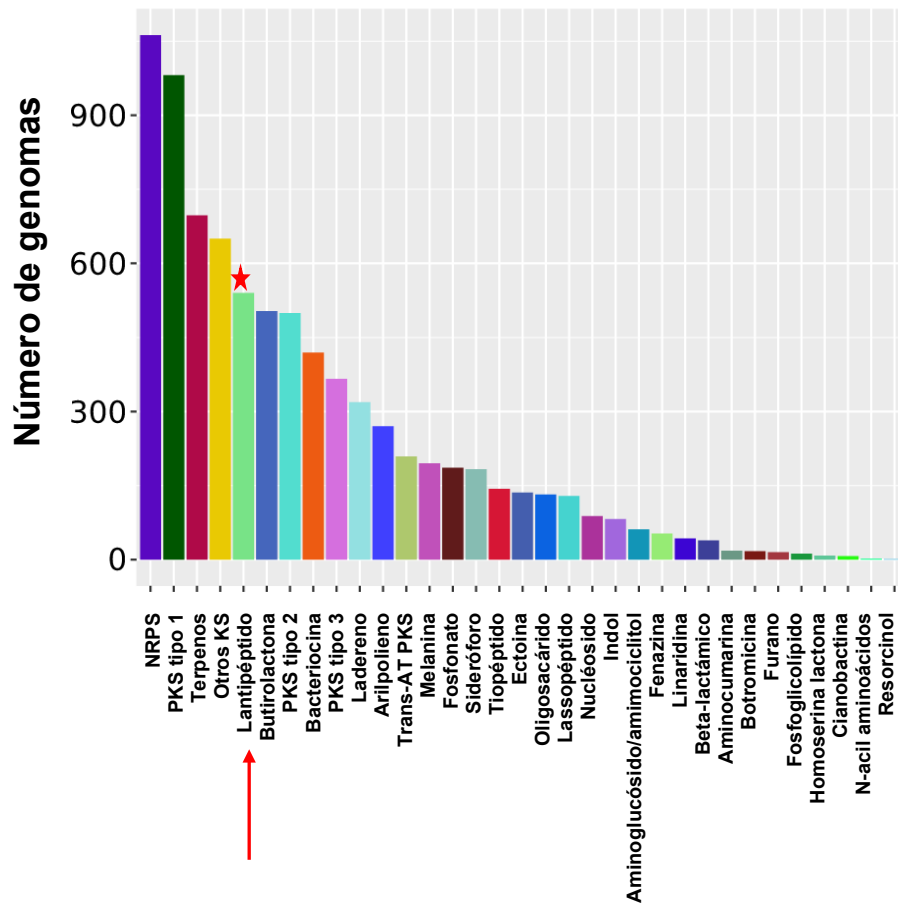


Figura 10. BGC comúnmente encontrados en el análisis de 1,110 genomas de cepas de *Streptomyces*. En la flecha roja se señala al grupo de lantipéptidos, y se puede observar que se encuentra dentro de los clústeres con mayor abundancia. Modificado de Belknap *et al.* (2020).

III.1.5. Mecanismo de acción antibacteriano

El mecanismo de acción antibacteriana de estos péptidos se basa en la desestabilización de la membrana plasmática sobre la que actúan. Los lantipéptidos de clase I se caracterizan por tener una estructura anfifílica, en donde la región catiónica (región N-terminal) se encarga de interactuar con la carga superficial negativa de la membrana, mientras que la región hidrofóbica (región C-terminal) se inserta en la capa lipídica, lo que genera poros celulares que provoca la disipación del potencial de membrana, lo que lleva a una baja producción de energía (Hécharad & Sahl, 2002) y a la consecuente salida de contenido

intracelular, generando así, la muerte del microorganismo (Figura 11). Estos lantipéptidos, así como los clasificados en la clase II, también actúan inhibiendo la biosíntesis de la pared celular, al unirse a la región pirofosfato del lípido II, el cual es una molécula indispensable para que ocurra la transglucosilación en el proceso de biosíntesis de la pared, por lo que, una vez impedido este proceso, la célula muere (Dischinger *et al.* 2014). Por otro lado, los lantipéptidos de clase III y IV caracterizados hasta el momento no han presentado actividad antibacteriana, y se ha propuesto su participación en la diferenciación morfológica del micelio.

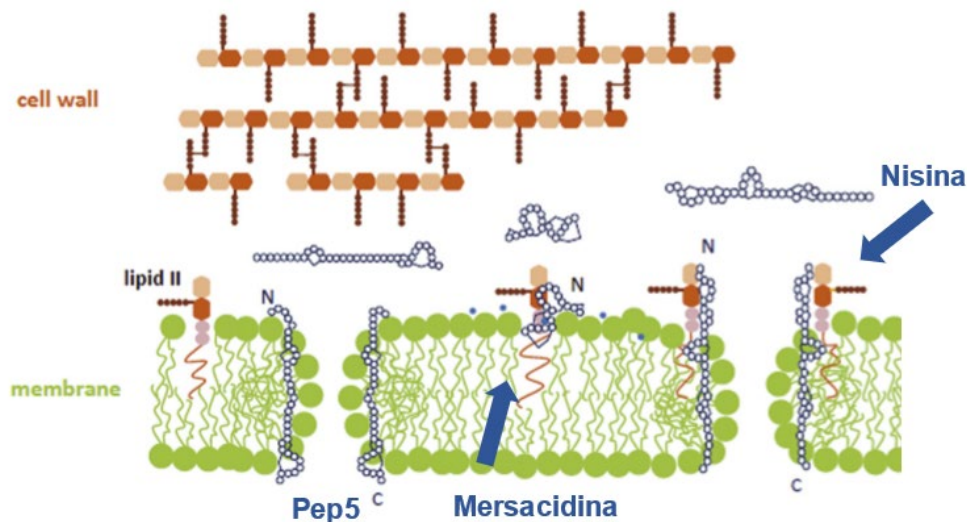


Figura 11. Mecanismos de acción clásicos de las bacteriocinas clase I (nisina & Pep5) y II (mersacidina). Modificado de Dischinger *et al.* (2014).

Se ha observado que los lantipéptidos presentan una potente actividad contra bacterias formadoras de biopelícula resistentes a antibióticos de uso clínico (Safder & Islam, 2017), además de actividad sobre bacterias causantes de infecciones nosocomiales, englobadas en el grupo ESKAPE. Para la nisina, un lantipéptido de clase I se ha aprobado su uso en animales para prevenir la mastitis bovina causada por *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* (Dischinger, *et al.* 2014). La nisina y la mersacidina (un lantibiótico de clase II) han probado ser efectivos contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) y enterococos resistentes a vancomicina (VRE) (Ríos *et al.*, 2016). La microbisporicina (NAI-107), un lantibiótico aislado de un actinomiceto, ha sido activa contra patógenos multidrogo-resistentes como MRSA, VRE y *Neisseria gonorrhoeae* y

Streptococcus pneumoniae resistentes a penicilina, así como contra cepas de *Staphylococcus aureus* formadores de biopelícula (Brutani *et al.*, 2017).

Además, en combinación con otros fármacos, estos péptidos incrementan la actividad de antibióticos convencionales con un gran efecto sinérgico (Shah & Chen, 2017). En un estudio realizado por Brumfitt (Brumfit *et al.*, 2002) se observó que la nisina en combinación con ramoplanina presentó un potente efecto sinérgico contra MRSA y VRE, asimismo, la microbisporicina presentó el mismo efecto al ser evaluada con polimixina contra *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* (Brutani *et al.*, 2017).

Se han observado distintos mecanismos que evitan que estas moléculas dañen al organismo productor. En el BGC de la nisina (lantipéptido de clase I) se encuentran los genes *lanFEG* que codifican un transportador tipo ABC cuya función es evitar el reingreso del lantipéptido a la célula; asimismo, se ha descrito una lipoproteína codificada en el gen *lanI*, que se une a las moléculas de nisina en el espacio extracelular, y cuya co-expresión con el transportador es necesario para la inmunidad, aunque estos mecanismos aún no se encuentran del todo elucidados (Hacker *et al.*, 2015). Por otro lado, se han descrito mecanismos que involucran la modificación de los lípidos de la membrana celular como mecanismo de inmunidad, tal es el caso de la cinamicina (lantipéptido de clase II), donde se produce una metil-transferasa (codificada en el BGC) que metila a los lípidos de membrana previo al inicio de la producción de cinamicina, lo que refleja un mecanismo de protección de la cepa productora (O'Rourke, Widdick & Mervyn, 2017).

III.1.6 Lantipéptidos utilizados comercialmente

Actualmente se han descrito varios lantipéptidos provenientes de distintas fuentes naturales, muchos de los cuales se encuentran en proceso de ser utilizados no sólo en el ambiente clínico, sino también en diversos ramos de la industria alimenticia y ganadera, dentro de los cuales podemos mencionar algunos ejemplos (Figura 12).

La nisina producida por *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, es el ejemplo más destacado de los lantipéptidos, ya que se utiliza desde hace más de 50 años en la industria alimenticia como bioconservante alimenticio dado su efectivo control contra la esporulación de bacterias

ácido-lácticas como *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Oenococcus* (Delves-Broughton, 2014) y de otros contaminantes de los alimentos de los géneros *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Clostridium*. Además, formulaciones de nisina (Mas Out® y Wipe Out®) son utilizados en el tratamiento de la mastitis bovina provocada por *Staphylococcus aureus* y otras especies relacionadas con esta patología como *Streptococcus agalactiae* (Field *et al.*, 2021; Dischinger *et al.*, 2014).

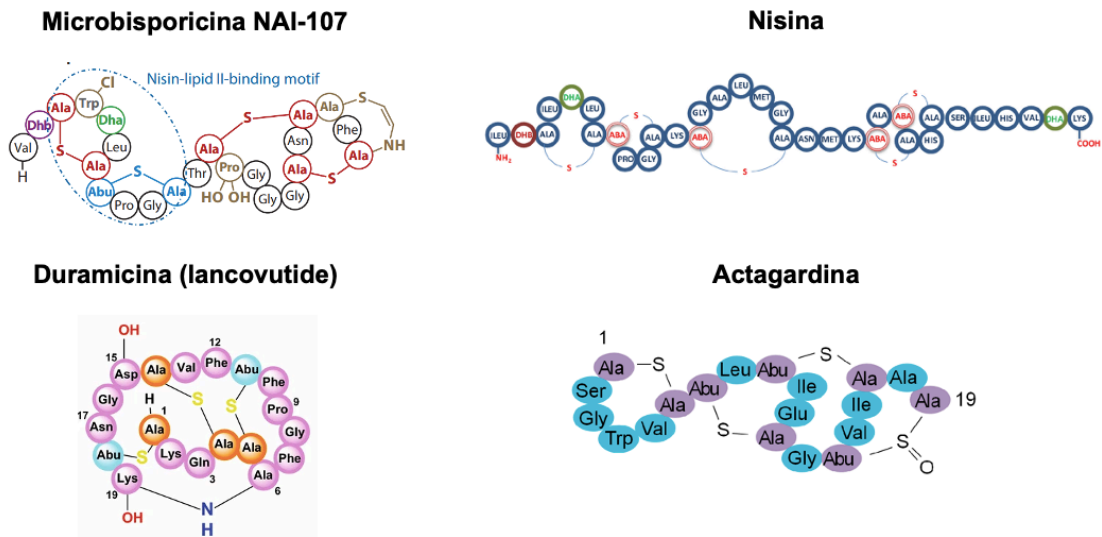


Figura 12. Estructuras de algunos lantipéptidos

Experimentalmente, se ha determinado la utilidad de los lantipéptidos contra diversos patógenos bacterianos, especialmente aquellos producidos por actinobacterias. Bajo el nombre comercial de NAI-107, la microbisporina, un lantipéptido de clase I producido por *Microbispora corallina*, actualmente se encuentra en fase preclínica para ser utilizado contra infecciones por patógenos MDR. Este lantipéptido en particular ha sido objeto de numerosas investigaciones en el ámbito de la bioingeniería de lantipéptidos, al adicionarle modificaciones que aumentan su actividad antibacteriana (Brutani *et al.*, 2017; Cruz *et al.*, 2015). El lantibiótico semisintético deoxi-actagardina B (NVB302), producido por *Actinoplanes liguriae* NCIMB41362, se encuentra en fase clínica como candidato a ser utilizado para el tratamiento de infecciones causadas por *Clostridium difficile* (Boakes & Dawson, 2014). El lantibiótico semisintético NVB333 (derivado de desoxiactagardina B) es un candidato para el tratamiento de infecciones nosocomiales como medicamento

inyectable, ya que se ha observado que inhibe el crecimiento de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) y *Enterococcus* spp. resistente a vancomicina, además que no ha mostrado resistencia cruzada y una baja propensión al desarrollo de resistencia bacteriana, en condiciones *in vitro* (Boakes *et al.*, 2016; Dischinger *et al.*, 2014). Con el nombre comercial Lancovutide (Moli1901), el lantipéptido duramicina, producido por *Streptovorticillium cinnamoneus*, actualmente se encuentra en ensayos clínicos fase II, para el tratamiento contra la fibrosis quística, dado su afinidad a moléculas de fosfatidiletanolamina en células epiteliales.

IV. Descubrimiento de nuevos productos naturales por minería genómica

Desde el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming, muchos fueron los antibióticos descritos mediante técnicas de fermentación en condiciones de laboratorio. Sin embargo, al pasar los años este método trajo distintas desventajas, como un redescubrimiento de moléculas ya identificadas previamente, por lo que de manera casi inmediata se perdió el interés en la búsqueda de nuevas moléculas producidas por organismos vivos, bajo este enfoque (Lewis, 2012; Brown & Wright, 2016).

Con la llegada del nuevo milenio y los avances en las técnicas de secuenciación, se observó que algunos organismos tienen el potencial de producir muchos más productos naturales de los que se habían descrito hasta el momento. Tal fue el caso de *Streptomyces coelicolor*, donde se describieron 18 nuevos BGC distintos a los ya identificados en esta cepa (Berdy, 2012), lo que contribuyó a demostrar que los genes responsables en la biosíntesis de PN se encuentran co-localizados en grupos de genes biosintéticos (Kenshole *et al.*, 2021). Este descubrimiento dio paso al desarrollo de distintas herramientas *in silico* que permiten la identificación de clústeres biosintéticos involucrados en la producción de metabolitos secundarios dentro de los genomas bacterianos (Lee *et al.*, 2020). A estas herramientas en conjunto se les identifica como minería de genomas o minería genómica (Figura 13). Entre algunas de estas plataformas encontramos a AntiSMASH (Blin *et al.*, 2019), BAGEL4 (Hell *et al.*, 2018), PRISM (Skinnider *et al.*, 2020) y RiPPMiner (Agrawal *et al.*, 2017).

Para poder obtener el producto final producido por el BGC identificado, es necesario expresar el clúster para poder identificar el PN, por lo que se pueden seguir dos enfoques:

por un lado, se puede producir la molécula en la cepa donde se identificó o es necesario clonar la BGC en un huésped heterólogo, siendo esta última, una de las más utilizadas al evitar problemas como una expresión en niveles bajos o un enmascaramiento de los PN, cuando se expresan en las cepas nativas, sin embargo, la expresión heteróloga puede tener ciertas limitaciones y no ser exitosa en todos los casos (Foulston, 2019).

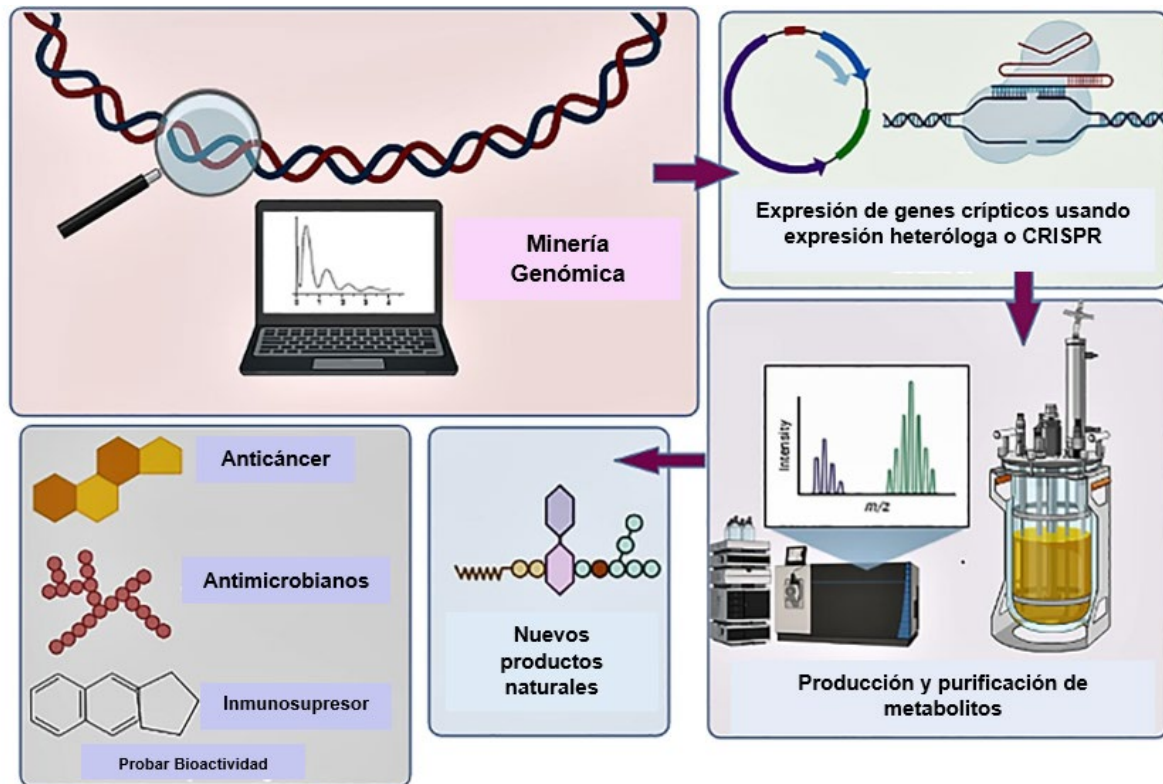


Figura 13. Esquema general de la identificación de nuevos productos naturales por minería genómica. Modificado de Arpit *et al.* (2021).

En cuanto a la obtención de lantipéptidos por métodos de clonación heteróloga, se han utilizado diversos organismos hospederos, uno de los más sobresalientes ha sido la clonación y expresión en sistemas en los que se involucra a *Escherichia coli*, donde se expresa el lantipéptido sin la remoción del péptido líder, lo que implica que este no presente actividad. Son numerosos los estudios en los que se ha demostrado que es posible producir bacteriocinas de este tipo, a partir de secuencias provenientes de actinobacterias (O'Rourke *et al.*, 2017; Widdick *et al.*, 2003; Singh & Sareen, 2018). Específicamente, la

adición de marcadores de identificación en el péptido precursor, han demostrado que no interfieren con las modificaciones postraduccionales realizadas por las enzimas modificadoras (Ma *et al.*, 2014)

Dada la amplia variedad de bacteriocinas que se han documentado a la fecha y considerando su especificidad de mecanismo antimicrobiano, así como el potencial de uso sinérgico con otros fármacos (Simons *et al.*, 2020), resulta interesante considerar su potencial aplicación contra la lucha hacia la resistencia antimicrobiana, por lo que este proyecto plantea la obtención de un lantipéptido con potencial actividad antimicrobiana inicialmente buscado a partir del análisis del genoma de un actinomiceto endófito.

Justificación del proyecto

El creciente aumento de la resistencia microbiana a los antibióticos en los últimos años hace necesaria la búsqueda de compuestos innovadores con potencial antimicrobiano. Los lantipéptidos son moléculas que han demostrado ser eficaces contra una amplia variedad de microorganismos que, sumado a las ventajas que ofrecen sus características estructurales, se visualizan como una estrategia prometedora ante tal problemática. La búsqueda de estos péptidos en actinomicetos endófitos que aún no han sido explorados abre la posibilidad de encontrar un compuesto inédito con actividad antimicrobiana potencial.

Hipótesis

Los microorganismos endófitos han demostrado ser fuente novedosa de compuestos antimicrobianos, por ello, la búsqueda bioinformática en el genoma de estos microorganismos resultará en la identificación de un clúster inédito de un lantipéptido que dará origen a un compuesto novedoso con potencial actividad antimicrobiana.

Objetivo general

Identificar y caracterizar mediante programas bioinformáticos un clúster biosintético inédito productor de un lantipéptido antimicrobiano, así como clonar el gen precursor a partir del genoma de un actinomiceto endófito.

Objetivos particulares

- Identificar un clúster biosintético asociado a la producción de un lantipéptido antimicrobiano mediante minería de genomas de los actinomicetos aislados de *Amphipterygium adstringens*
- Analizar el clúster biosintético mediante programas bioinformáticos para observar si se trata de un producto novedoso
- Realizar la clonación del gen precursor de un lantipéptido en un hospedero heterólogo
- Realizar ensayos de expresión del gen clonado

Metodología

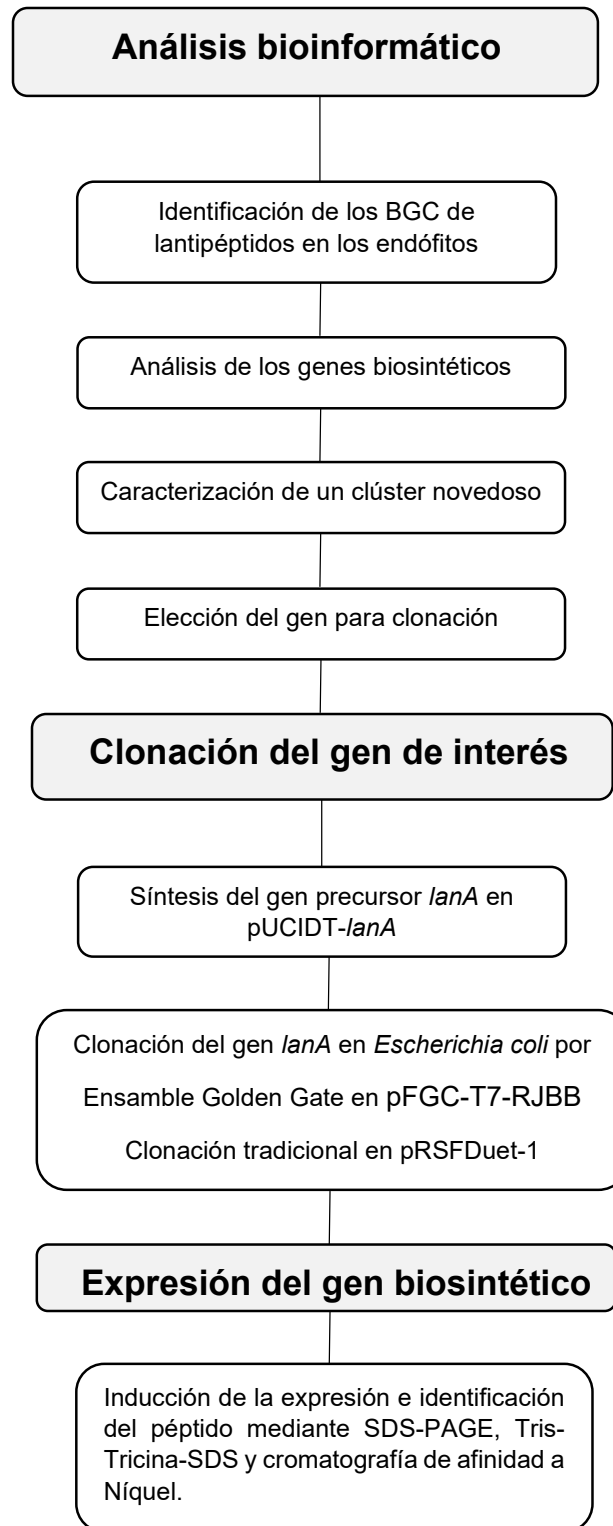


Figura 14. Metodología del proyecto

Metodología

○ Minería genómica

Los enfoques en minería genómica han revelado clústeres de genes biosintéticos (BGC) de metabolitos secundarios que aún no se han caracterizado. Estos BGC contienen las vías para la biosíntesis, ensamblaje, modificación, resistencia y regulación de su producto (Lee *et al.*, 2020). Es por ello por lo que, mediante minería genómica, se planteó la búsqueda de BGCs asociados a la producción de lantipéptidos. Se utilizaron las plataformas bioinformáticas antiSMASH 6.1.1, BAGEL4, PRISM, RiPPMiner y DeepRiPP.

AntiSMASH (**Ant**ibiotics and **S**econdary **M**etabolites **A**nalysis **S**hell) (Blin *et al.*, 2019) es una plataforma de predicción *in silico* de BGC mediante el empleo de modelos ocultos de Markov (HMMs) de los motivos proteicos de las enzimas biosintéticas (Blin *et al.*, 2014). Para el caso específico de lantipéptidos, este programa predice la clase a la que pertenecen, el peso molecular del péptido deshidratado, el sitio de corte del péptido líder y modificaciones adicionales en la secuencia.

BAGEL4 (**BA**cteriocin **GE**nome mining **T**ool) es una plataforma especializada en la identificación de grupos de genes implicados en la síntesis de péptidos ribosomalmente producidos y postraducionalmente modificados (RiPPs) y bacteriocinas sin modificar, mediante el empleo de bases de datos de péptidos centrales y/o mediante modelos ocultos de Markov (HMMs) que se encuentran asociados en genes de contexto (Hell *et al.*, 2018).

PRISM se compone de un conjunto de herramientas de análisis de genomas, para predecir las estructuras químicas de péptidos no ribosomales y policétidos sintasas mediante la conexión de genes biosintéticos con las reacciones que catalizan. Actualmente cuenta con una extensión para predecir genes de péptidos producidos ribosomalmente y modificados postraducionalmente (RiPP) (Skinnider *et al.*, 2020).

RiPPMiner es un servidor web de aprendizaje automático para la predicción de estructuras químicas de RiPPs, además de una predicción del sitio de escisión del péptido líder y de la clasificación del péptido de entrada (Agrawal *et al.*, 2017).

DeepRiPP es una plataforma que identifica metabolitos mediante un análisis metabolómico y genómico comparativo a gran escala, que integra el aprendizaje automático para

automatizar el descubrimiento selectivo y el aislamiento de nuevos RiPPs (Merwin *et al.*, 2019).

- **Análisis bioinformático**

Una vez que se identificaron los BGC involucrados en la síntesis de un lantipéptido, se procedió al análisis de los principales genes mediante diversas herramientas bioinformáticas.

Se sabe que los metabolitos secundarios presentan una gran diversidad estructural, pero las maquinarias biosintéticas pertenecen a las mismas familias de enzimas altamente conservadas (Lee *et al.*, 2020), por lo que, para verificar la presencia de dichas enzimas, se utilizaron las plataformas UniProt (European Bioinformatics Institute EMBL-EBI), InterPro (Blum *et al.*, 2020) y Pfam (El-Gebali *et al.*, 2019).

Adicionalmente se realizaron alineamientos de secuencias múltiple en la plataforma MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation) (Madeira *et al.*, 2019) con el objetivo de identificar residuos de aminoácidos catalíticamente importantes para la función de las enzimas.

- **Clonación de los genes de interés**

Se planteó clonar y expresar el gen *lanA* (Péptido precursor A) para obtener el lantipéptido clase II. Dada la complejidad que representa clonar genes con alto contenido de GC en su secuencia, se decidió sintetizar una versión optimizada de la secuencia en el vector pUCIDT para, posteriormente, ser clonado en el vector de expresión que se utilizó para los subsecuentes experimentos. Dicha secuencia fue optimizada para mejorar el uso de codones y facilitar su expresión en *E. coli*. Se redujo el porcentaje de GC de la secuencia de 67.2% a 53.9%. Al mismo tiempo, se modificaron los codones necesarios para generar el sitio reconocido por la proteasa Factor Xa que será la encargada de escindir el péptido líder del péptido inmaduro. El sitio de corte se encuentre en el extremo carboxilo terminal posterior a la secuencia -IDGR, por lo que, haciendo estas modificaciones, la nueva secuencia LanA se muestra en la Figura 15.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen *lanA*. Se muestra también el amplicón obtenido.

Gen	Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Longitud (nt)
<i>lanA</i>	Forward	ttgggtctcgaATGCGGACTGCATCC	25
<i>lanA</i>	Reverse	ttgggtctcgaagcTCAGCAACAGGCACG	28

En rojo se muestra en sitio de reconocimiento de *Bsa*I; en azul se muestran los sitios de fusión y en mayúsculas se observa la secuencia del gen *lanA*. En el Anexo 3 se muestra la secuencia del amplicón.

Los oligonucleótidos fueron sintetizados por el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Una vez reconstituidos y utilizando el vector pUCIDT-*lanA*, se realizó la prueba del barrido de temperatura para cada gen, en el cual se pretendía determinar la temperatura de amplificación en la que se obtendría mejor y mayor cantidad de producto mediante la técnica de PCR de punto final (Anexo 2). Para la amplificación del gen *lanA* se utilizó la enzima *Platinum Taq DNA Polymerase*, a temperaturas de alineamiento de 55 a 65 grados Celsius, con una concentración de 5% de DMSO. Se decidió utilizar esta enzima para los siguientes procedimientos de amplificación a una temperatura de 57°C.

- **Purificación de los productos de PCR y DNA proveniente de digestiones**

Todas las amplificaciones con PCR del gen *lanA*, como las digestiones con las enzimas de restricción del vector fueron purificadas con el kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up* (Promega), siguiendo las indicaciones del proveedor.

Clonación del gen *lanA* en pRSFDuet-1

El gen *lanA* se clonó en el vector de expresión pRSFDuet-1 (Figura 17) flanqueado por las enzimas de restricción clase II: *Eco*RI en el extremo 5' y *Hind*III en el extremo 3'. Este vector adiciona una etiqueta de histidinas (His-Tag) en el extremo amino terminal. Se ha observado que la adición de secuencias adicionales en el extremo amino no interfiere con las modificaciones realizadas al core del péptido precursor.

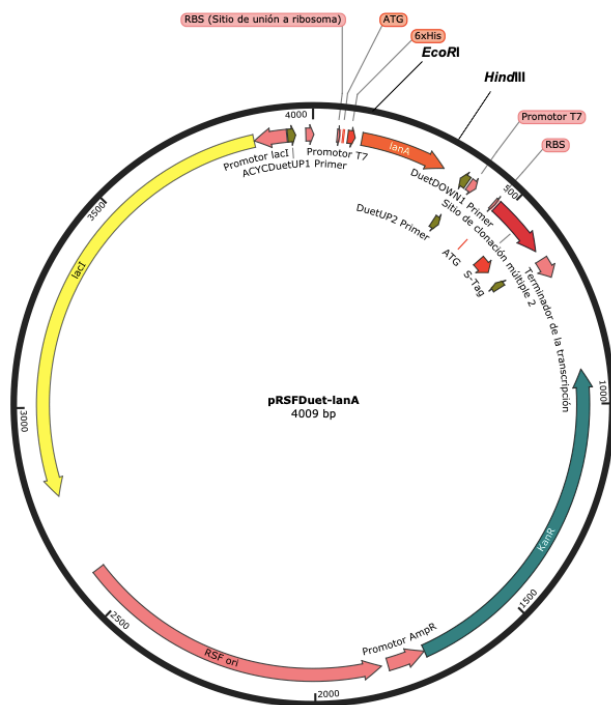


Figura 17. Construcción pRSFD-*lanA*, donde se observa la inserción del gen *lanA* que codifica para el péptido precursor.

○ **Digestión y ligación del gen *lanA* en pRSFDuet-1**

Se realizó PCR de punto final a una temperatura de alineamiento de 57 °C en un volumen final de 150 µL y 25 ciclos de amplificación. Se purificó el amplicón y se determinó la concentración en un equipo Nanodrop. Al mismo tiempo, se extrajo el plásmido pRSFDuet-1 de transformantes de *E. coli* DH5-α, de acuerdo con el método de lisis alcalina (Anexo 6). Posteriormente, se digirieron el vector y el inserto, con la enzima *EcoRI* buffer del proveedor *New England Biolabs* (Tabla 3) durante 3 horas y media a 37 °C.

Tabla 3. Componentes de la reacción de digestión con *EcoRI*

Reactivo	Cantidad (pRSFDuet-1)	Cantidad (pUCIDT- <i>lanA</i>)
DNA*	1000 ηg	20 000 ηg
Buffer <i>EcoRI</i> 10X	1X	
<i>EcoRI</i>	20 U (1 µL)	45 U (2.5 µL)
H ₂ O MQ estéril	cbp 100 µL	cbp 50 µL
Volumen final	100 µL	50 µL

**lanA* o pRSFDuet-1.

En seguida, los plásmidos fueron incubados con la enzima *HindIII* en el buffer de reacción 2 del proveedor *New England Biolabs* (Tabla 4), durante toda la noche (O/N) a 37 °C.

Tabla 4. Componentes de la reacción de digestión con *HindIII*

Reactivo	Cantidad (pRSFDuet-1)	Cantidad (pUCIDT- <i>lanA</i>)
DNA	1000 ηg	20 000 ηg
Buffer 2 10X	1X	
<i>HindIII</i>	10 U (1 μL)	25 U (2.5 μL)
H₂O MQ estéril	cbp 100 μL	
Volumen final	100 μL	

Después de cada digestión, las muestras fueron purificadas con el kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up* (Promega) pero, en esta ocasión, se realizó un gel de agarosa 0.8% (m/v) para la separación del inserto y del vector digerido del resto de la secuencia.

Una vez corroborada la presencia del inserto y del vector, se colocó una reacción de ligación con la enzima ligasa T4 del proveedor *New England Biolabs* (NEB), a una relación de ligación 3:1 de *lanA* y pRSFDuet-1 (Tabla 5), respectivamente, durante 3 horas a 23 °C y a 4 °C O/N.

Tabla 5. Componentes de la reacción de ligación

Reactivo	Cantidad
<i>lanA</i>	17.4 ηg
pRSFDuet-1	100 ηg
Buffer T4 ligase 10X	1X
T4 ligase	1 μL
H₂O MQ estéril	cbp 10 μL
Volumen final	10 μL

Clonación del gen *lanA* por ensamble Golden Gate

A la par de la clonación tradicional, se implementó un ensamble Golden Gate del gen *lanA* en el vector pFGC-T7-RJBB, para lo cual se preparó una mezcla de reacción mostrada en la Tabla 6.

Tabla 6. Componentes de la reacción de ensamble Golden Gate

Reactivo	Cantidad
pFGC-T7-RJBB	10 fmol
<i>lanA</i>	20 fmol
Buffer T4 ligase 10X	1X
T4 DNA ligasa	3 U
<i>Bsal</i> (<i>FastDigest</i>)	5 U
H ₂ O	cbp 15 µL
	15 µL

Tanto el vector, como el inserto amplificado, presentan sitios de reconocimiento de la enzima de restricción *Bsal*. Por tanto, el proceso de digestión y ensamble de vector-inserto se planteó en una sola reacción cíclica. En la Tabla 7 se muestran las condiciones de reacción.

Tabla 7. Condiciones de la reacción de ensamble Golden Gate

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	No. ciclos
Restricción inicial	37	4:00	1
Restricción	37	2:00	33
Ligación	16	3:00	
Restricción final	37	4:00	1
Inactivación por calor	80	10:00	1
Storage	12	∞	1

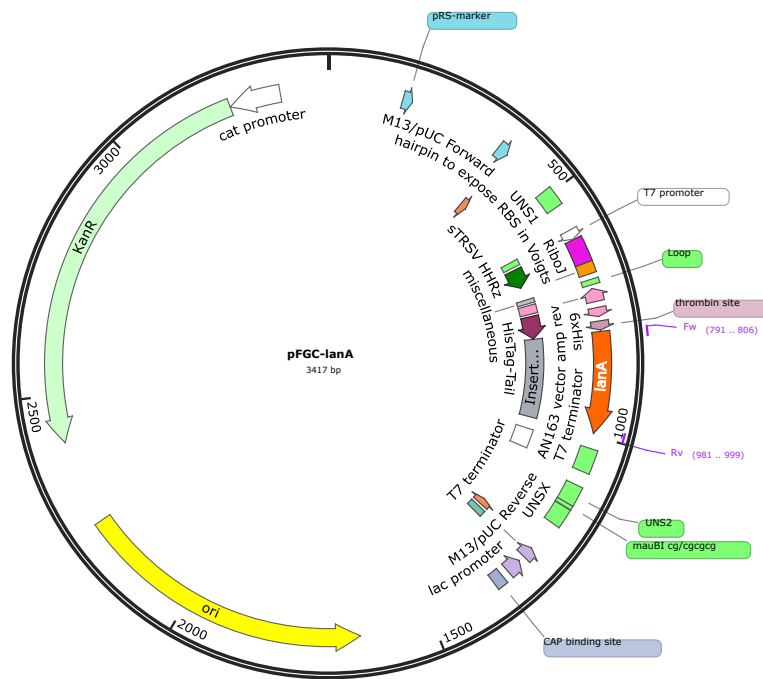


Figura 18. Construcción pFGC-*lanA*, donde se observa la inserción del gen *lanA* que codifica para el péptido precursor.

○ **Transformación de *Escherichia coli* DH5- α**

Las construcciones obtenidas tanto por el método de clonación tradicional y el ensamble Golden Gate, fueron transformadas mediante el método de choque térmico (Anexo 8).

Para la clonación tradicional, se tomaron los 20 μ L de la ligación y se colocaron en un alícuota de 200 μ L de células quimiocompetentes con cloruro de calcio 0.1 M. Esta mezcla fue incubada en hielo por 10 minutos y posteriormente se le dio un choque térmico a 42 °C durante 2 minutos, finalmente el tubo con las células fue incubado 5 minutos más en hielo. Posteriormente, se agregó 1 mL de medio LB e inmediatamente las células fueron incubadas durante 1 h a agitación constante de 180 rpm a 37 °C. En seguida, se inocularon cajas de medio LB más kanamicina y se incubaron por 20 horas a 37 °C.

Todas las colonias transformantes fueron incubadas mediante picadura en 5 mL de medio LB con kanamicina a 37 °C durante 20 horas a 180 rpm.

En el ensamble Golden Gate, se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente, pero se le agregaron 15.0 y 5.0 μL de la ligación, a 2 distintas muestras de células quimio-competentes. Se utilizaron cajas de LB con kanamicina/ X-gal/ IPTG.

- **Verificación de las construcciones del gen *lanA***

Para la verificación del éxito de la construcción, se aisló el plásmido mediante el método de lisis alcalina (Bimboim & Doly, 1979) y todas las construcciones se analizaron mediante el patrón de digestión, utilizando las enzimas previstas para la ligación: *EcoRI* y *HindIII*, para el caso de la clonación tradicional; mientras que para el ensamble Golden Gate se utilizó la enzima *BpiI*. En ambos casos se realizó PCR de colonia de las transformantes, como control negativo se utilizó el plásmido pFGC-T7-RJBB y pRSFDuet-1; el control positivo corresponde a la construcción pUCIDT-*lanA*. Después de este primer screening, las construcciones candidatas fueron secuenciadas en la unidad de secuenciación del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, para verificar la integridad de los genes de interés, y proseguir con los subsecuentes ensayos. Los plásmidos secuenciados fueron extraídos con el kit comercial *Monarch Plasmid Miniprep Kit* de NEB, de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

- **Conservación de las colonias transformantes**

Las construcciones positivas del gen *lanA* fueron inoculadas en 5 mL de LB más kanamicina a 37 °C durante 20 horas a 180 rpm. Posteriormente, se centrifugó 1 mL del medio crecido a 10 000 rpm por 1 min a temperatura ambiente, y al pellet celular se le realizaron 2 lavados con SSI, se agitaron en vortex y se centrifugaron bajo las mismas condiciones anteriores. Finalmente, se resuspendió el pellet en 1 mL de glicerol 20% (v/v), y las alícuotas se guardaron a -70 °C.

- **Expresión y purificación del péptido precursor**

Se realizó la expresión del gen biosintético mediante un sistema libre de células (*cell-free*). El sistema en particular utilizado fue proporcionado por el Dr. Fernando Guzmán Chávez y se encuentra disponible en el laboratorio de Microbiología Industrial del Dr. Sergio Sánchez. Las condiciones de la mezcla de reacción se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Condiciones de la reacción para la expresión libre de células (*cell-free*)

Reactivo	Vol (µL)
Extracto celular	4
4X Wizard mix	3
DNA (20 nM)	3
40% PEG-8000	0.6
Agua MQ	1.4
Volumen final	12

Se colocaron 20 reacciones de la construcción pFGC-*lanA* durante 18 horas a 29 °C en microtubos Eppendorf de 1.5 mL.

- **Purificación de las reacciones de *Cell-free* mediante columnas de afinidad a Níquel**

La mezcla de las 20 reacciones fue purificada mediante columnas de afinidad a níquel. Se utilizó la columna comercial Ni-NTA Spin Kit Handbook de Qiagen. Se siguieron las indicaciones del proveedor para realizar la purificación. La solución de lavado fue ajustada a 80 mM de imidazol, de acuerdo con los resultados obtenidos en los gels de poliacrilamida.

- **Verificación de la expresión del péptido *lanA***

Para verificar la expresión del péptido precursor *lanA*, se usó una electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Adicionalmente, dado el tamaño del péptido precursor, se consideró necesario la implementación de electroforesis desnaturizante en geles de Tris-Tricina para mejorar la resolución de los péptidos pequeños resultantes de la expresión, ya que se ha reportado que estos geles son idóneos para su observación. Sin embargo, dado que dichos geles no han sido implementados en el laboratorio, también se probó estandarizar la técnica. Las concentraciones utilizadas en la preparación de los geles SDS-PAGE y Tris-Tricina-PAGE, se muestran en los anexos 9 y 10.

Resultados y discusión

I. Análisis bioinformático

I.i Búsqueda de BGC de lantipéptidos

Actualmente, en el laboratorio de microbiología industrial se cuenta con tres microorganismos endófitos secuenciados *Embleya* sp. NF3, *Streptomyces* sp. L06 y *Actinoplanes* sp. TCF3, aislados de *Amphipterygium adstringes*, una planta nativa de México conocida popularmente como cuachalalate, recolectada en el municipio de Tlaltizapan, en el estado de Morelos (Rodríguez-Peña *et al.*, 2018).

Inicialmente se investigaron las características del genoma de las 3 cepas de interés. Los datos se muestran en la Tabla 9. El contenido de guanina/citosina es consistente con las características propias de las actinobacterias (Barka *et al.*, 2015)

Tabla 9. Características de los genomas de las cepas de interés

Endófito	Tamaño del genoma (pb)	%GC
<i>Embleya</i> sp. NF3*	10 968 352	71.61
<i>Streptomyces</i> sp. L06*	6 887 193	73.05
<i>Actinoplanes</i> sp. TCF3	6 546 651	69.25

*Vázquez-Hernández, 2017.

Como ya se había mencionado, se mostró interés por la búsqueda de BGC's putativos para la síntesis de lantipéptidos, por lo que se realizó la búsqueda utilizando las plataformas de búsqueda antiSMASH 6.1.1, BAGEL4 y PRISM (Tablas 10, 11 y 12).

Tabla 10. Clústeres asociados a la producción de bacteriocinas y lantipéptidos identificados en antiSMASH 6.1.1

Microorganismo endófito	No. Clústeres	No. clústeres asociados a bacteriocinas	No. clústeres asociados a lantipéptidos
<i>Embleya</i> sp. NF3	48	13	6
<i>Streptomyces</i> sp. L06	17	5	0
<i>Actinoplanes</i> sp. TCF3	39	1	0

Tabla 11. Clústeres asociados a la producción de bacteriocinas y lantipéptidos identificados en BAGEL4

Microorganismo	No. clústeres asociados a bacteriocinas	No. clústeres asociados a lantipéptidos
<i>Embleya</i> sp. NF3	8	5
<i>Streptomyces</i> sp. L06	3	1
<i>Actinoplanes</i> sp. TCF3	0	0

Tabla 12. Clústeres asociados a la producción de bacteriocinas y lantipéptidos identificados en PRISM4.4.4

Microorganismo	No. Clústeres	No. clústeres asociados a bacteriocinas	No. clústeres asociados a lantipéptidos
<i>Embleya</i> sp. NF3	30	8	7
<i>Streptomyces</i> sp. L06	18	6	1
<i>Actinoplanes</i> sp. TCF3	17	0	0

BAGEL4 es una plataforma especializada para la búsqueda de bacteriocinas y péptidos producidos ribosomalmente y modificados postraduccionalmente (RiPPs) (Van Heel *et al.*, 2018), mientras que PRISM se especializa en la predicción de estructuras de péptidos no ribosomales y policétidos y, aunque la identificación de metabolitos ya se ha extendido a RiPPs, la cobertura sigue siendo incompleta (Skinnider *et al.*, 2020), lo que explica las diferencias encontradas en la predicción de BGC totales y específicos para bacteriocinas entre ambas plataformas. Cabe destacar que, en las tres plataformas, el número de BGC asociados a lantipéptidos fue similar, por lo que se decidió comenzar con el análisis de los clústeres comunes identificados.

Además, como se observa en los resultados anteriores, *Embleya* sp. NF3 es el endófito con mayor capacidad biosintética de bacteriocinas, por lo que los análisis posteriores se centraron en esta cepa. Se prestó especial interés por los lantipéptidos de clase II y IV, debido a la utilización de una única enzima para la realización de las modificaciones postraduccionales (Van Der Donk *et al.*, 2014), por lo que la búsqueda se centró en estas clases de BGC.

En antiSMASH 6.1.1, la asignación de la clase de lantipéptido se encuentra en función de los dominios presentes en las enzimas biosintéticas (Blin, *et al.*, 2014). De los 7 BGC asociados a lantipéptidos, los clústeres 4 y 40 se clasificaron como lantipéptidos clase I; el clúster 3 se identificó como clase II; el clúster 9 como clase III y los clústeres 10, 11 y 21 se clasificaron como clase IV. El clúster 3 se identificó como un híbrido NRPS/lantipéptido (Figura 19).

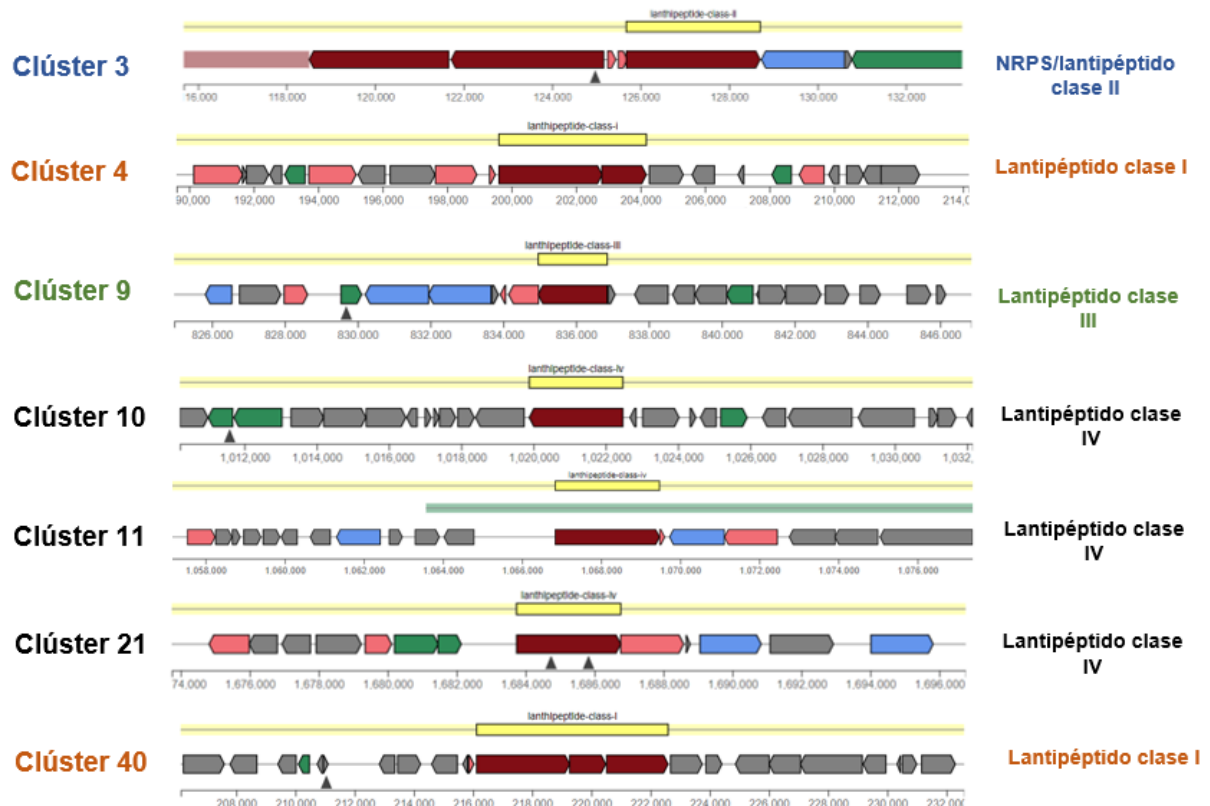


Figura 19. BGC asociados a la producción de lantipéptidos en *Embleya* sp. NF3

I.ii Análisis de un BGC de lantipéptido clase IV

Se comenzó con el análisis de BGC's de los lantipéptidos clasificados como clase IV, para lo cual se realizó BLASTp a cada uno de los genes que componen el clúster, así también las secuencias fueron analizadas en Uniprot e InterPro para identificar posibles familias de cada gen. El primer clúster analizado fue el número 21 (Figura 20), los resultados del análisis se encuentran en la Tabla 13.

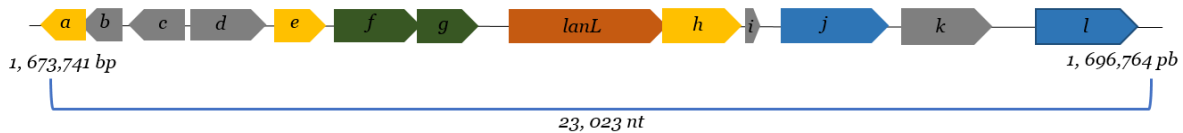


Figura 20. Clúster 21: BGC asociado a la producción de un lantipéptido clase IV en *Embleya sp. NF3*

Tabla 13. Funciones putativas identificadas para los genes codificados en el clúster 21. En color gris se señalan aquellos genes considerados esenciales para la producción del péptido

Gen*	Tamaño (nt)	Función putativa
a	1167	Fosfoglicerato mutasa
b	816	Proteína hipotética
c	828	Proteína hexamérica de centro de metal dinuclear similar a Nif3
d	1305	Proteína con dominio PASTA
e	765	Deshidrogenasa/reductasa de cadena corta
f	1266	Sensor histidin-cinasa
g	672	Regulador de unión a DNA de la familia LuxR
lanL	3024	Proteín-cinasa de Ser/Thr con dominio tipo LanC
h	1827	Peptidasa de tipo serina
i	117	Proteína putativa (posible <i>lanA</i>)
j	1776	Transportador de tipo ABC
k	1836	Proteína putativa
l	1806	Transportador de tipo ABC

*La asignación del nombre del gen se realizó únicamente por su localización en el clúster, a excepción del gen putativo involucrado en las modificaciones de deshidratación y ciclación, cuyo nombre se señaló como *lan*.

Debido a la importancia de la enzima LanL dentro de la producción de los lantipéptidos de clase IV (Goto *et al.*, 2010), se decidió realizar Protein BLAST de la secuencia de aminoácidos de la enzima putativa LanL con las 2 enzimas modelo reportadas hasta el momento, involucradas en la producción de estreptocolina (StcL) (Iftime *et al.*, 2015) y venezualina (VenL) (Goto *et al.*, 2010) (Tabla 14).

Tabla 14. Resultados de los alineamientos de la enzima putativa LanL (clúster 21)

No. acceso: StcL (AGS73699.1) /VenL (AEA03262.1)

Secuencia de análisis	%Identidad	%Similitud	%Cobertura
StcL (<i>Streptomyces collinus</i> Tu 365)	39.41%	49%	97%
VenL (<i>Streptomyces venezuelae</i> ATCC 10712)	41.61%	54%	82%

Adicionalmente se realizaron alineamientos globales de las secuencias con la herramienta EMBOSS Needle. Se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 15.

Tabla 15. Resultados de los alineamientos de la enzima putativa LanL con una cobertura del 100% (clúster 21)

No. acceso: StcL (AGS73699.1) /VenL (AEA03262.1)

Secuencia de análisis	%Identidad	%Similitud	Score
StcL (<i>Streptomyces collinus</i> Tu 365)	38.9%	48.5%	1614.0
VenL (<i>Streptomyces venezuelae</i> ATCC 10712)	36.8%	45.7%	1560.5

StcL y VenL muestran un porcentaje de similitud de 74% al alinear su secuencia de aminoácidos (Iftime *et al.*, 2015), por lo que los resultados obtenidos al compararlos con la putativa LanL de este clúster, es bajo comparado con ese dato. Hasta el momento solo se han reportado estas dos secuencias involucradas en la producción de un lantipéptido clase IV, por lo que aún no existe un consenso del porcentaje de similitud adecuado para considerar a alguna enzima putativa como miembro de esta familia, razón por la cual no se descartó su funcionalidad. El análisis de la secuencia de estas enzimas demostró que contienen tres dominios catalíticos responsables de las modificaciones postraduccionales al péptido precursor: un dominio de liasa de fosfoserina/treonina en el extremo N-terminal, dominio de cinasa en la región central y dominio de ciclasa tipo LanC en el extremo C-terminal (Goto, *et al.*, 2010). Los dominios de liasa y cinasa conservan los residuos de aminoácidos involucrados en la catálisis que se han descrito en otras familias de enzimas (no lantipéptidos) con la misma función, mientras que el dominio de ciclasa muestra homología con otras enzimas LanC (Iftime *et al.*, 2015). Se decidió realizar el análisis mediante alineación de secuencias múltiples, para detectar la presencia de los aminoácidos conservados en los tres dominios a los que se les adjudica la función de deshidratación y ciclación para esta clase de enzimas (Figura 21, 22 y 23)

LanL	39	REQGTGRAAADAWDVRSDDFWCTVVRPPGHAARAQ	GWKIHVS	ARTGDASHVLGRVCDVLLP
VenL	26	R-----WAVEADEMWCRTVTPGAGTRRDQ	GWKLHLS	SATAASAPAVLEKALGVLLR
StcL	26	R-----WTVDAGEVWCRLTPACGMRLRQ	GWKLHVS	SATSVSAPQVLVRLDVLGG

LanL	RRVA	FRFAC	DLERLRMLNSLEADRASAGKFI	TVY	PDDDEQFMELVDALDEVTRELTGPGI
VenL	EESP	FKFARSLDQVSALNSRATPLGSSGKFI	TVY	PRSDAGAARLAHELHGATAGLAGPRI	
StcL	EESG	FKFVRSLEQVSALNSRATPRGSAGKFI	TVY	PPSDEAAARVALALHRAATAGLAGPRI	

LanL	LSDR	PCRP	GSVVHYRYGGF	GRAVLGNDGGYRAVPTDPGGS	AVDDAREAWFTPPSWAPDP	218
VenL	LSDQ	PYAV	NSLVHYRYGSF	VGRRRLSDDGLLVWFIEDPDGNPVEDQRTGRY	APPPWAVCP	194
StcL	LSDQ	PYAP	QSLVHYRYGAF	VGRRRVSEQGLLVWFIEDPDGNPVEDKRTGQY	CPPPWAVSP	194

Figura 21. Alineamiento del dominio de liasa de fosfotreonina/serina de la enzima putativa LanL contra las enzimas StcL y VenL. Los residuos conservados se sombrearon en amarillo, los residuos catalíticos se señalan con una estrella negra y aquellos residuos no conservados en similitud, se muestran en sombreado rojo. Alineamiento realizado con MUSCLE (Madeira *et al.*, 2019).

LanL	239	-----EVLIG	GRFAV	TSA	IRH	AKG	GVFLGKDTTDDAD	VVVK	QARAHIEVDRSGR
VenL	214	GSREARGAGAPVLLG	GRFAV	REAIRHT	NKGG	VYRGS	SDVRTGAL	VVIKE	ARPHVEADASGH
StcL	212	-----PVLLG	GRFAV	REAIRHT	NKGG	VYRGT	DVTTTAP	VVIKE	ARPHVEGDMAGS

LanL	DACAAL	LRHEAVLMRRL	LEHTG	TPRPI	ALLEEAETI	FLA	QERVPGEPLRAWV	VRHAADPDV
VenL	DVRDWL	LRTEARTLERLR	RGTL	LAPEPLAL	FEHGGHL	FLA	QQEVPGVALRTWV	AEHFRDAGA
StcL	DVRDWL	LRAEARILEK	LKHTGL	LAPEPLAV	FEIGGHV	FLA	QEEVPGVPLRTWV	AERFRDVGA

LanL	P--	WALARPLVED	LVGL	VVR	VH	GEGLV	LRD	SPTNV	LVGPDGALR	LDLE	SAAEIGAPAG
VenL	ERYR	VDARAQVGR	LVEL	VAAAH	AHGC	VRD	FTPG	NMVR	PDGELR	LDLE	LAVLEGDAAR
StcL	ARYR	VEALAQVER	LVDL	VAAAH	ACGC	VRD	FTPG	NMVR	PDGELR	LDLE	LAVLTDEVML

LanL	AA--	GTPG	YRAPE	QRP	GV	DGSHRAHPSAD	LYSLG	GLFF	LLATGADPALPEDVGTTRDTVE	
VenL	PTRV	GTPG	FSAPER	RLTGAP	----	VSPTG	DYSLG	ATAC	FVL	LAGKVPNLLPEEPATRAPEQ
StcL	PTRV	GTPG	FSAPER	RLKDAA	----	VCPTA	DYSLG	ATVCF	VLAGKVPQLLPEEPDTTAAEE	

LanL	RI	GAWLELAARHGATARRL	LAPAIRGL	LWHGDP	AQR	RWSA	ERVSS	FFV---	AGLGGGVGADAVH	521
VenL	RL	AAWLSACAGPLRL	PDGLAEMV	LGLMKD	APAE	RWD	PARAREAL	RRA-----		496
StcL	RI	EQWLAACAPRLRL	PGGLQDMI	LNLMKDD	PGAR	RWD	PD	RAREALH	RALPPAGAILPPLGT	497

Figura 22. Alineamiento del dominio de cinasa de treonina/serina del putativo LanL contra las enzimas StcL y VenL. Los residuos conservados se sombrearon en amarillo, los residuos catalíticos se señalan con una estrella negra, los residuos no conservados en LanL, pero que presentan características similares se sombrearon en verde y aquellos residuos no conservados en similitud, se muestran en sombreado rojo. Los números romanos señalan los subdominios conservados en la familia de cinasas Ser/Thr. Alineamiento realizado con MUSCLE (Madeira *et al.*, 2019).

LanL	780	DT---	LLGAARQAGGLTLWPVPKDFDSRLAGAAHLGFA	★	HG	VAGVGTFLLEAALATGREGY
VenL	716	DR---	LTAAGRDRSGVGPVPAEAAASPEGGTGYLGFA		HG	TAGIGCFLLAAAASVGRPEH
StcL	798	DR---	LAAAAQAEPGVSWPVPAEAVSQEAGKRYLGFA		HG	SAGIGSFLAAADVSRPEH
LanL			LDGARAA-AHSLARSVRVDGDGAWWPQGPDPAGV	★	WCS	SAGVGTFLIRLWRADHD
VenL			LDLAVEA-GEHLRDQAVLTGEAAHWPARSADPP--		WCHG	AAGIGTFLVRLWQATGD
StcL			LELAVAA-GEHLVAHAVRVGEAVQWPAQATDPP--		WCHG	SAGIGSFLIRLWQRTGD
LanL			PLHRDLAERAGAAVHRARWHSQT-TA	★★	CHGL	LAGNGDFLLDLA--EASGEPIHRARAAELA-952
VenL			DRFGELARRATHAVTERASRAAL-AQ		CHGL	LAGNGDFLLDMA--DATGDPVHRATAEDLA-886
StcL			GRYADLARGAAHAVMERASRAAV-AQ		CHGL	LAGNGDFLLDMA--EATGESAYHAMAEEEA-968

Figura 23. Alineamiento del dominio de ciclasa del putativo LanL contra las enzimas StcL y VenL. Los residuos conservados se sombreadon en amarillo y los residuos catalíticos se señalan con estrellas negras. Alineamiento realizado con MUSCLE (Madeira *et al.*, 2019).

La familia de las proteínas cinasas de serina/treonina muestra doce dominios conservados, que son reconocidos como invariables entre los miembros de esta superfamilia y en los cuales se encuentran residuos altamente conservados (Hanks & Hunter, 1995) responsables de la función. En la secuencia de la enzima putativa LanL no se encuentran completos por lo menos dos de estos dominios, lo que puede significar una pérdida de la función de cinasa (Figura 22). Ahora bien, en el dominio de liasa de fosfotreonina/serina, se ha reportado que son imprescindibles los aminoácidos lisina (Lys51), histidina (His53), arginina (Arg83) y tirosina (Tyr108) (posiciones respecto a la secuencia de VenL) para que se lleve a cabo la deshidratación de Ser y Thr una vez que estos han sido fosforilados por el dominio de cinasa (Iftime, *et al.*, 2015). Para LanL se alinearon los residuos Lys75, His77 y Tyr132, pero no así la Arg que se encuentra sustituida por una glicina (Gly107) en la secuencia. La función de este aminoácido básico (Arg) es de actuar como base catalítica para extraer un α -protón de la fosfotreonina (previamente fosforilada), lo que trae como consecuencia la eliminación del fosfato generando los aminoácidos deshidratados (Primera modificación postraducciona del péptido) (Goto *et al.*, 2010). Esta función catalítica no puede ser suplida por la Gly107 de la enzima LanL, por lo que suponemos que la función de liasa se verá seriamente afectada.

Como ambos dominios (liasa y cinasa) se encuentran comprometidos por aminoácidos catalíticos no conservados, es posible que el paso de deshidratación no se pueda llevar a cabo, lo que ocasione una baja o nula producción del péptido modificado. Es por ello por lo

que se decidió no continuar con el análisis del resto de los genes y descartar la utilización de este clúster para los fines del proyecto.

El siguiente clúster para analizar fue el clúster 10, sin embargo, haciendo una búsqueda exhaustiva de posibles similitudes con lantipéptidos ya descritos, se encontró que el propéptido LanA era clasificado como un lantipéptido clase IV familia Sfla, que fue recientemente reportada como una nueva familia de lantipéptidos (Ren *et al.*, 2020), sin embargo, esta familia no mostró actividad antimicrobiana, que es el principal objetivo del proyecto, por lo que la utilización de este clúster también fue descartado.

I.iii Análisis del BGC de lantipéptido clase II

Siguiendo con el interés de un lantipéptido con una única enzima postraduccional, se prosiguió con el análisis del clúster 3, putativo BGC de lantipéptido clase II (Figura 24).

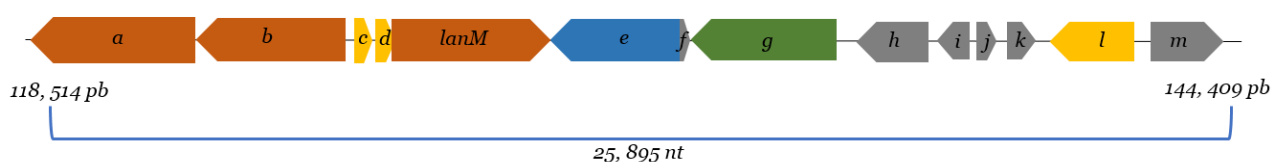


Figura 24. Clúster 3: BGC asociado a la producción de un lantipéptido clase II en *Embleya* sp. NF3

Se realizó el análisis de todos los genes que componen el BGC y utilizando las mismas plataformas bioinformáticas, se predijo su posible función. Se centró el análisis en los genes con la función putativa de lantionina sintetasa, péptidos precursores y transportador.

Tabla 16. Funciones putativas identificadas para los genes codificados en el clúster 3. En color gris se señalan aquellos genes considerados esenciales para la producción del péptido

Gen*	Tamaño (nt)	Función putativa
a	3156	Sintasa de péptido no ribosomal (NRPS)
b	3447	Sintetasa y ligasa dependiente de AMP

c	189	Proteína putativa (posible <i>lanA</i>)
d	204	Proteína putativa (posible <i>lanA</i>)
<i>lanM</i>	3030	Lantionina sintetasa de la familia LanM
e	1890	Transportador ABC
f	168	Proteína putativa
g	2844	Regulador transcripcional de la familia LuxR
h	861	Quitosanasa
i	321	Proteína putativa
j	216	Proteína putativa
k	168	Proteína putativa
l	1124	Citocromo P450
m	558	Proteína putativa

*La asignación del nombre del gen se realizó únicamente por su localización en el clúster, a excepción del gen putativo involucrado en las modificaciones de deshidratación y ciclación, cuyo nombre se señaló como *lan*.

A los genes *f*, *i*, *j*, *k* y *m* no se les asignó función ni se agruparon a alguna familia de proteínas en ninguna de las plataformas utilizadas, por lo que no se considerarán para análisis posteriores. El gen *a* y *b* codifican enzimas asociadas a la producción de péptidos no ribosomales (NRPS), las cuales son enzimas modulares que codifican péptidos a partir de sustratos como aminoácidos estándar o no proteinogénicos (Miller & Gulick, 2017), por lo que no se encuentran relacionadas a la biosíntesis de lantipéptidos. El producto del gen *m* se clasificó como parte de la familia de los citocromos P450, cuyas funciones oxidativas muchas veces se relacionan a la producción de compuestos bioactivos como esteroides, antibióticos o moléculas de señalización (Anzai *et al.*, 2012). Es importante recordar que este clúster se traslapa con un clúster putativo para NRPS, por lo que es posible que este citocromo actúe en conjunto con las sintetasas para formar el péptido no ribosomal, y que no se encuentre relacionado a la producción del lantipéptido de interés, por lo que por el momento no se considerará como parte de las enzimas biosintéticas. El gen *h* codifica para una enzima llamada quitosanasa, cuya función es catalizar la hidrólisis del enlace β -1,4-glicosídico del quitosano (Fukamizo & Brzezinski, 1997). Hasta el momento no se ha reportado alguna función de esta enzima en la biosíntesis de lantipéptidos. El gen *g* se asoció a la familia de reguladores transcripcionales LuxR, cuya función es regular la expresión de genes como factores de virulencia o biosíntesis de antibióticos (Chen & Xie, 2011) aunque para fines del proyecto no se profundizará más en esta proteína reguladora. Finalmente, los genes a los que se les realizó un análisis más profundo son el *c*, *d*, *e* y el putativo gen *lanM*, al encontrarse más relacionados a las vías biosintéticas reportadas de los lantipéptidos.

I.iii.1 Análisis de la secuencia *lanM*

En primer lugar, se comenzó el análisis de la enzima putativa LanM. Al igual que con LanL, se realizó Protein BLAST de la secuencia de aminoácidos contra 4 secuencias de enzimas modificadoras de lantipéptidos de clase II con actividad antimicrobiana: lacticina 481 (Xie, *et al.*, 2004), mersacidina (Altena *et al.*, 2000), citolisina (Van Tyne *et al.*, 2013) y cinamicina (Widdick *et al.*, 2003). Se obtuvieron los resultados de la Tabla 17 y 18.

Tabla 17. Resultados de los alineamientos de la enzima putativa LanM (clúster 3)

Secuencia	% Identidad	% Similitud	% Cobertura
LctM (<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>)	21.56	39	85
MrsM (<i>Bacillus velezensis</i>)	26.50	44	93
CyIM (<i>Enterococcus faecalis</i>)	21.79	39	88
CinM (<i>Streptomyces cinnamoneus</i>)	27.88	39	83

No. acceso: LctM (AAC72258.1)/MrsM (KFI15807.1)/CyIM (AAK67266.1)/CinM (CAD60521.1)

Tabla 18. Resultados de los alineamientos de la enzima putativa LanM con una cobertura del 100% (clúster 3)

Secuencia	% Identidad	% Similitud	Score
LctM (<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>)	19.0	35.1	337.5
MrsM (<i>Bacillus velezensis</i>)	23.5	39.6	698.0
CyIM (<i>Enterococcus faecalis</i>)	20.7	37.7	363.5
CinM (<i>Streptomyces cinnamoneus</i>)	23.9	34.0	564.5

No. acceso: LctM (AAC72258.1)/MrsM (KFI15807.1)/CyIM (AAK67266.1)/CinM (CAD60521.1)

Se ha reportado que las enzimas LanM comparten alrededor de 30% de identidad en sus secuencias (Ma *et al.*, 2014), por lo que los resultados de la Tabla 17 y 18, son bastante aceptables bajo este criterio, lo que nos lleva a pensar que el producto del gen *lanM*, efectivamente se trata de una lantionina sintetasa de dicha familia.

Se ha identificado que la familia de enzimas LanM presentan en su estructura un dominio de deshidratación y un dominio de ciclación. El primero esta estructuralmente relacionado a cinasas de lípidos y cataliza las reacciones de fosforilación y eliminación sobre los residuos Ser y Thr para generar las deshidrataciones (diferente al mecanismo adoptado por las enzimas LanL), mientras que el dominio de ciclación es del tipo LanC, que conserva la triada de residuos Cys-Cys-His, encargados de coordinar al ión Zn^{2+} que resulta indispensable para la reacción (Montalbán-López *et al.*, 2017, Okeley *et al.*, 2003, Goto *et al.*, 2010). Por tanto, para asegurar que la enzima pueda ser funcional, se decidió realizar los alineamientos e identificar los residuos catalíticos conservados en ambos dominios (Figura 25 y 26):

CylM	-----FNFRGFGHG	IYSYVHLLSKFNRIDKANSLLHKIKESY-FEEE---PK
LctM	A---CWFPRNGVQLSYASYAHG	NSGIMTALLIGYILTKNEKYLSTFKAWNYEKIL--RN
LanM	GRRTARWPTVLFDPDGIGGFAHG	AAGIAWALTRLGLAASRPKWFELADLAWAFQEALYDPK
MrsM	G-----WKVPANPTPASGFAHG	ASGIIWALYEIYAITKQTVFKEVAEKALEFERTLFIPE
CylM	NNSW-----	CKGTVGELLAT--IE-----LYDDNI-----S
LctM	ENGWTDLR---KSKNSSPY---	WCHGSAGILISRTQWLTLNKEYSIFKQDQLEEIFKEI
LanM	VRGWLD-----GRQRDEVLF	LDSWCHGSTGIGLAG--WD-----LYRRTGAPEQLDRA
MrsM	KNNWADIKLENGQFRNDNFV--	AWCNGAAGIGLSR--IL-----ILPHNQNELIKDEA
CylM	NIDINKTIEYK--NKDCL	LCHGNAGTLEGLIQLAKKDP-ETYQYKKNKLISYMLKYFEKN
LctM	DIALNSIIQKGLKINNFS	LCHGVMGSLVAINNYIKEFPNKELELLVRRRTMLNVCEYGLKY
LanM	LRAAAATWRTGFG-WDYTL	LCHGDLGSWELLDTLRLGAP-EQLRSHLRNAPTRELRDALLL
MrsM	HVAINTTLKYGFE-HDQSL	LCHGDLGNLDILMYAAENFN-KKLSVNVTELSHKILNDIKLR

Figura 25. Alineamiento del dominio de ciclasa de la enzima putativa LanM. Los residuos conservados se sombrearon en amarillo, los residuos catalíticos se señalan con una estrella negra. Alineamiento realizado con MUSCLE (Madeira *et al.*, 2019).

CylM	MRYFLDNTKQMLIRVTEDELPSIQNCF--NIQSSSELNSISESQG-- DS HSRSGKTVSTLTF
LctM	LLAYFDELKEIKSNLKDIDKDLIRKII--VSKNATISNISFKGD----FHLNKAVALVSVF
LanM	IRNRCTALLTLARRIAAD-RDRLTDLL--GTRGELVEIGTDAG-- DS HRRGRTVALLR
MrsM	TMWYIQNTSDLLVRFHQD-KGILESEFSNGQKLGKIIISIDTSGSVS DT HNGKKTVAILLNF
CylM	SDGKKIVY K PK-INSENKLRDFFEFNLN-KELEAD--IYIVKVVTRNTYFYEEYIDNIEIN
LctM	DNNEKVLVY K PKQLTNEILVNDFISQMN-DFSKGEVNTNKTLSILNRQTYGWVEYIEHKPLK
LanM	EAG-RVVY K PRALDVDVALATTVDTLL-AHVPREERIAVPRVLLGGGEYGWAEYVEHRYCA
MrsM	ETGIKIVY K PRSLIEDVKFNKFFVNYLNGKNLSFD--LKTVHTLNKKSYGWTQFISYKECQ
CylM	NIEEVKKY Y ERYGKLIIGIAFLFNVTDL HY ENI I AHGEYPV I DN E TTFFQON--IPIEFGN
LctM	TIEEAREY Y YRLGTLTAVSYILGLSD M HFEN S ISYGSYPIFV D E V LFSNN-LVNLFLL
LanM	DAAERSR F YRGLGEWMCVVQLLGGTDL H SENV I ACGPV P WVV D C E TLFSP E RVGASGLG
MrsM	EELQIGK F YWRIGSYLA I L I YAMNAV D FM Q N L IADGEY P IL V D L E S LFHNN---STYD T
CylM	SATVDAKYK Y LDSIMV T GL V PYLAMKDKSDSKDEGVNLSALNFKEQSV-PFKILKIKNTF
LctM	DSTQIINDEITNS I IATGL L P---IKDKNSM-FNG---DTSGFMGGTF-QTTRRELVNSN
LanM	DAFDTAAASVRRTV L RTGL L P---MRLG Q LA-LQGVDMASAVGALPDQQPRV P V P ITGAG
MrsM	SAFSRAQ E HIERSV L RIG L LP---RKINSKAG F EGIDLSALGAQ E GVSPHK T STIVDRD
CylM	TDEMRFEYQ T HIMDTAK N TPIMNNEKISFISY E KYIV T G M K S ILMKA--KDSKKKILAYI
LctM	RDDIKFVRK S VRIKQTKHLPDYRGTEILPTDY I PSIK S G F E F Y I KI--KEQIKYVENFV
LanM	TDLARLTMEPADVAGSAN L P---APDADPLAHQDDIV H G Y RD L RARLDGRDAAGRLRPML
MrsM	KD T VRIEEK N FP I PVSQHRPMLHGQ I INTVAYEG N I K G E E T Y F LF--MKYQ D MLEQ I
CylM	NNNLQNL I V R NVIR P T Q RYADM L EFSYHPNCFSN-----A I EREK V LHN M WAY P Y---KN
LctM	LSKA E AT Q T R VLLR N T M EY S TLL S TIK S PR I Q K -----R S V L LE K L R N F S K --D R E
LanM	D V -FAG C E L R V V L R P T Q V Y VE I AR M L W HPAS L HE E GP A VER A RD V L R Q A K A L H G- A P D T
MrsM	D S -F K G V T V R Q I L R G T S R Y AN L L K I S L H P D F M R D -----G L D R E M I L D K L W L D T K L N P R L
CylM	K K V V H Y E F S D L I D G D I P I F Y NN I S K T S L I A S D G C L V E D F Y Q E S A L N R C L N K I N D L C D E D I
LctM	L P F V E S E I H Q L K S L S I P Y F Q Q K F N E K S I T D G Q D N T I A-L S K I S P K K I F L K L N K L S E F D L
LanM	P E V V G A E V A D L L D G D I P F F G V R P E R G R M T G P R G T E W G D -----P A H L I D E S L D R W R A G D P
MrsM	N Q V V N S E K E G L F L G D I P Y F T S K P E S T N M W D S S G R K I N N F F K T S A L N E T K E K I N E M N E S D C
CylM	S I Q T V W L E I A L N I Y N P Y K I N D L K N Q N S N K Y I Y T G L E L N G K I I Q A -C Q K I E K K I F K R A I F
LctM	N N Q L S M I D F T L Q S M E N L R Q N S K K P -----F N E F D S F K E I L N T A I T S L K K L V E H A V F
LanM	E F E V M I R S S L L G V--Y R D R S A M P E G E R H R E V R V R H D E R R R A L A E A A R D L C A R A V V
MrsM	H E Q V S F I K T A I L V I K D S Y R K H K V F D I N P R L H V F N P K D F Q E A I K I G D F L A S R A I E G Q L D

Figura 26. Alineamiento del dominio de deshidratasa de la enzima putativa LanM. Los residuos conservados se sombrearon en amarillo, los residuos catalíticos se señalan con una estrella negra y aquellos residuos no conservados en similitud, se muestran en sombreado rojo. Alineamiento realizado con MUSCLE (Madeira *et al.*, 2019).

Podemos observar que se encuentra la totalidad de los residuos catalíticos indispensables para la coordinación del ión zinc (Zn^{2+}) en el dominio de ciclasa, lo que asegura su función (Figura 26), sin embargo, para el dominio de deshidratasa se observó un cambio de aminoácido en la posición 495, donde se conserva un residuo de glutamina (Q) en otras enzimas de la misma familia y, en su lugar, la secuencia se alineó con un residuo de ácido glutámico (E).

En un estudio previo, se realizaron mutaciones por el método de sustitución de alanina a varios residuos con putativa función catalítica en enzimas LanM y, se determinó que la glutamina conservada (Q495), era una de las responsables de la liberación del péptido del

dominio de deshidratación, una vez que este había sido procesado, y que un cambio de este aminoácido por alanina disminuía la rapidez de la reacción al observarse que el péptido modificado se produjo en un tiempo más prolongado de incubación (2 horas), respecto al tiempo que le tomó a la enzima *wild type* (wt) (15 minutos) generar las deshidrataciones, sin embargo, la actividad se mantuvo aún después de la mutación (Ma, *et al.*, 2014). Por lo que, tomando este antecedente como base y considerando las diferencias de las propiedades fisicoquímicas del ácido glutámico respecto a la glutamina, se espera que este cambio no afecte la funcionalidad de la enzima más allá del tiempo de procesamiento, por lo que se decidió seguir adelante con el análisis del resto del clúster.

Al mismo tiempo se obtuvo, el moldeado por homología de la enzima LanM mediante el uso del software Phyre2 y I-TASSER, cuyo modelo generado usó como templatado la estructura cristalina de la lantipéptido sintetasa CyIM de clase II en complejo con AMP de *Enterococcus faecalis* (Dong, *et al.*, 2015). 782 residuos de la secuencia de LanM (78%) se moldearon con un 100% de confianza en relación con la sintetasa. Esta enzima se encuentra involucrada en la biosíntesis de la citolisina, un lantipéptido de clase II (Van Tyne *et al.*, 2013). Adicionalmente, se predijeron los posibles cofactores de la enzima LanM mediante la herramienta 3D ligand (Figura 27). En esta predicción, se constató la presencia del ión Zn^{2+} coordinado en el dominio de ciclase.

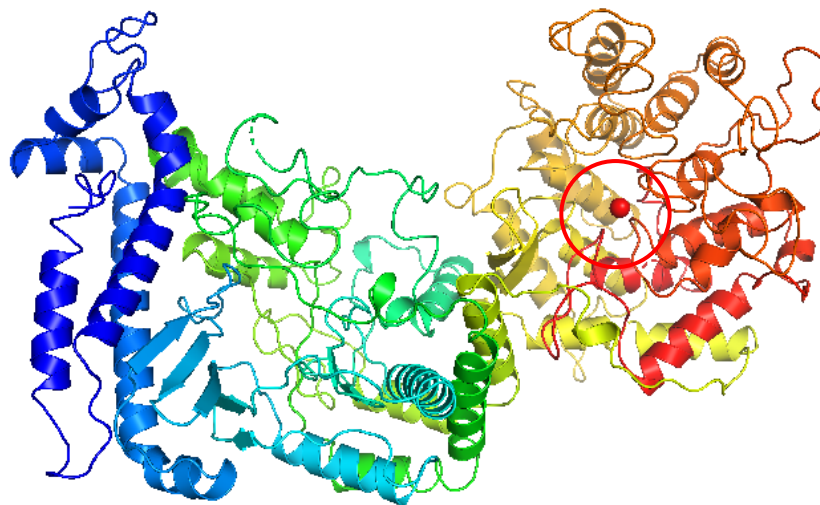


Figura 27. Modelo tridimensional de la enzima LanM. 782 residuos (78%) se moldearon con un 100% de confianza en relación con el templatado CyIM, que corresponde a la lantipéptido sintetasa de clase II en complejo con AMP de *Enterococcus faecalis*. círculo rojo se muestran los iones Zn^{2+} coordinados.

Con estos resultados, podemos concluir que el gen *lanM* putativamente codifica una enzima perteneciente a la familia de lantioninas sintetasas de clase II (LanM), y que presenta las características de secuencia indispensables para la bioactividad. Sin embargo, es necesaria la clonación y expresión de este gen, para corroborar la función asignada a la proteína.

I.iii.2 Análisis del gen transportador (*lanT*)

Posteriormente, se continuó con el análisis del gen que codifica para el transportador putativo de tipo ABC: LanT. Específicamente, se mostró interés en la búsqueda del dominio de peptidasa. Se sabe que en los lantipéptidos de clase II, el transportador LanT presenta un dominio de peptidasa en la región N-terminal, que es el responsable de escindir el péptido líder del resto de la estructura (Van Der Donk *et al.*, 2012).

Desafortunadamente, ninguna de las plataformas utilizadas reconoció algún dominio de peptidasa, por lo que se decidió alinear la región N-terminal con otras enzimas de la misma familia (Figura 28).

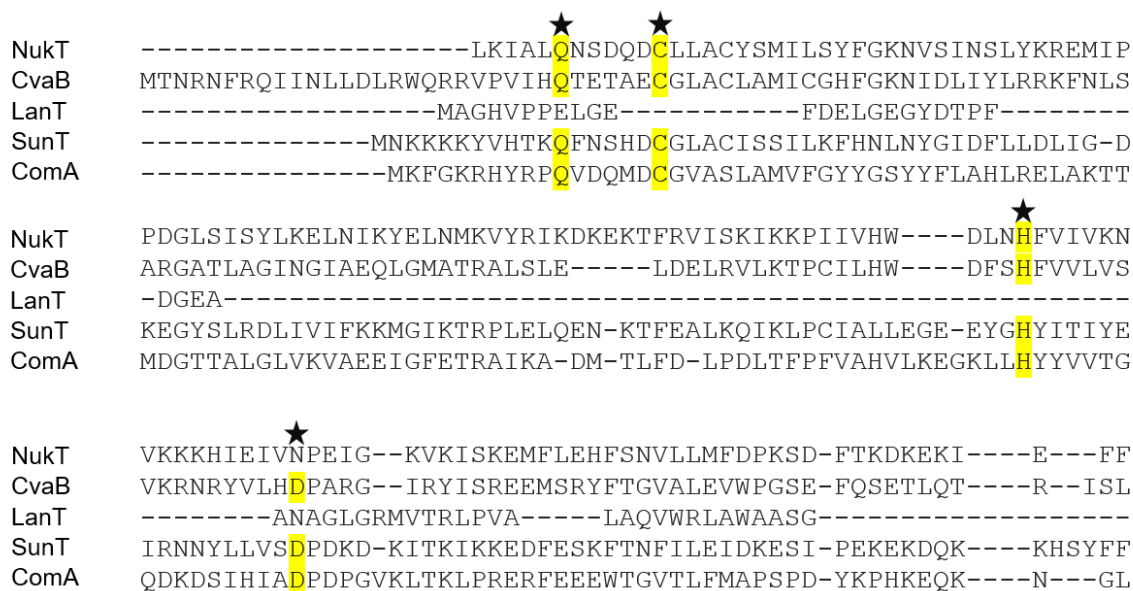


Figura 28. Alineamiento del dominio N-terminal de la enzima putativa LanT. Los residuos conservados se sombrearon en amarillo, los residuos catalíticos se señalan con una estrella negra. Alineamiento realizado con MUSCLE. NukT (BADO1009.2), CvaB (AAS50165.1), SunT (AAC63532.1) y ComA (ERL65892.1)

Se ha reportado que los miembros de esta familia de transportadores se engloban en las proteasas de cisteína similares a papaína y que cortan el péptido líder a través de los residuos conservados de Cys, His y Asp (Nishie *et al.*, 2011). En contraste, ninguno de estos residuos catalíticos se encuentra presentes en la región N-terminal del putativo LanT, lo que nos indica que esta proteína únicamente se dedica al transporte del péptido, pero no a la escisión del péptido líder.

Este resultado ya se ha observado en otros lantipéptidos provenientes específicamente de actinomicetos. El clúster biosintético de la cinamicina, un lantipéptido de clase II de *Streptomyces cinnamoneus* DSM 40005, así como sus análogos estructurales duramicina B y C, no presentan un gen que codifique una peptidasa, e incluso, tampoco muestran el dominio de doble glicina reconocido por la familia de transportadores LanT, sino que en su lugar, muestran un motivo AXA en el péptido líder de su precursor LanA, que ahora se sabe, es reconocida por las peptidasas tipo I de la vía secretora general (sec), que finalmente son las encargadas de generar el péptido maduro (Okesli *et al.*, 2011), lo que sugiere que los lantipéptidos no son excretados únicamente por transportadores de tipo ABC, ni son escindidos por una peptidasa codificada en el mismo clúster biosintético.

I.iii.3 Análisis del gen *lanA*

Siguiendo con el análisis del clúster, el siguiente paso fue analizar la secuencia que da origen al péptido precursor LanA. La plataforma PRISM no identificó ningún gen precursor; BAGEL4 por su parte, identificó una secuencia, pero AntiSMASH 6.1.1 identificó 2 posibles secuencias *lanA*, por lo que se decidió analizar más detalladamente ambos genes. Para fines prácticos, se le nombró como propéptido A, a la secuencia reconocida tanto por antiSMASH 6.1.0 como por BAGEL4, y propéptido B a la secuencia reconocida solo por antiSMASH (Figura 29).

mencionadas anteriormente, se analizó la secuencia del péptido líder del propéptido A y se alineó con secuencias de lantipéptidos ya caracterizados (Figura 30).

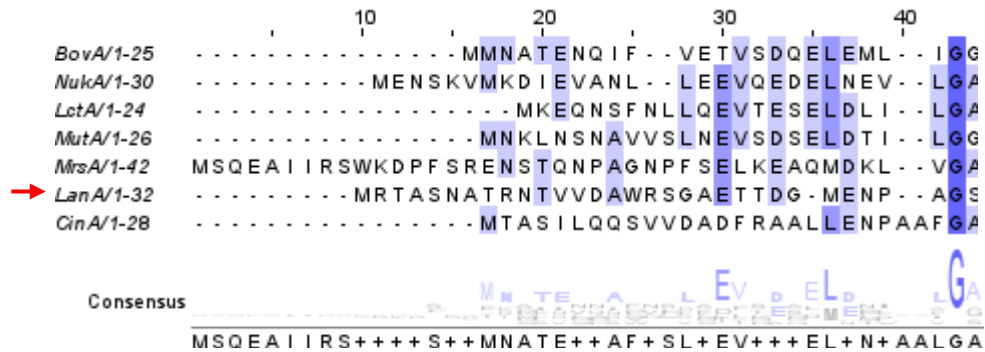


Figura 30. Alineamiento del péptido líder del Propéptido A contra diversos PL de clase II. La tonalidad de azul muestra la identidad entre cada uno de los residuos. Abajo se muestra la secuencia consenso. BovA: Bovicina HJ50 (AAP23217.1); NukA: Nukacina (Q9KWM4.1); LctA: Lacticina 481 (O87237.1); MutA: Mutacina II (AAC38144.1); MrsA: Mersacidina (CAA87640.1); CinA: cinamicina (P29827.1). La flecha roja señala la secuencia del putativo LanA. Alineamiento realizado con MUSCLE (Madeira *et al.*, 2019) y editado con Jalview.

En el resultado de la alineación se observó la conservación de algunos de los aminoácidos preservados en otros PL de bacterias ácido-lácticas, principalmente el sitio de doble glicina característico de este grupo, sin embargo, se mostraron ligeras diferencias. Para obtener un mejor análisis, se optó por alinear la secuencia únicamente con el péptido líder de la cinamicina (Figura 31).



Figura 31. Alineamiento del péptido líder LanA contra el péptido líder de los lantipéptidos tipo cinamicina. La tonalidad de azul muestra la identidad entre cada uno de los residuos. Abajo se muestra la secuencia consenso. CinA: cinamicina (P29827.1). La flecha roja señala la secuencia del putativo LanA.

Claramente, se observó mayor similitud entre la secuencia del PL de la cinamicina y del Propéptido A, lo cual era de esperarse al estar más relacionados filogenéticamente, sin embargo, en el PL del Propéptido A no se observó el motivo reconocido por el sistema sec

En ambas representaciones se observó claramente la distribución de los residuos en dos caras o polos. Por un lado, se muestra una cara polar (por la predominancia de residuos polares), y por otro una cara polar mixta, resultado bastante similar a lo que ya se ha reportado para otras estructuras secundarias de péptidos líder (Nagao *et al.*, 2009).

Ahora bien, una vez que se corroboró que el PL cumplía con las características atribuidas para que se lleve a cabo el procesamiento postraducciona, se procedió a analizar si la secuencia estructural del propéptido mostraba similitud con alguna secuencia ya reportada en la base de datos y, de esta manera evitar el análisis de una estructura ya conocida. Se utilizó la plataforma bioinformática DeepRipp (Merwin *et al.*, 2019). Esta plataforma también asigna una probabilidad a la secuencia del PL de pertenecer a una clase de RiPP en específico. La secuencia del Propéptido A fue clasificada como un precursor de un lantipéptido clase II, con una probabilidad del 97.88%, asimismo, se predijeron 3 alineamientos del péptido estructural con secuencias de propéptidos ya conocidos (Tabla 19).

Tabla 19. Puntuación dada a los alineamientos del péptido estructural A, con secuencias de lantipéptidos ya reportadas.

Péptido	Score
Ruminoccina A (<i>Ruminococcus gnavus</i>)	-0.09
Subtilomicina (<i>Bacillus subtilis</i>)	-0.19
Flvbeta.c (<i>Ruminococcus flavefaciens</i>)	-0.19

Como se puede observar en la Tabla 19, la puntuación para cada alineamiento es baja, por lo que tomando en cuenta los resultados anteriores, podemos concluir que la secuencia del propéptido A se puede clasificar como precursor de un lantipéptido novedoso de clase II.

El programa antiSMASH 6.1.1 también muestra los pesos previstos para el lantipéptido (Tabla 20), en función del número de deshidrataciones que se realicen en la secuencia y los residuos que pueden ser procesados por la maquinaria biosintética LanM (Figura 35).

Para el caso de la secuencia del propéptido B, no se obtuvieron alineamientos significativos entre su PL y los PL de otros lantipéptidos ya reportados, tanto de bacterias ácido-lácticas como de aquellos provenientes de actinobacterias. Tampoco se observaron las características deseables para que PL sea reconocido por la maquinaria enzimática LanM, y el programa bioinformático DeepRiPP no lo clasificó como un putativo péptido modificado postraducionalmente.

No podemos descartar la posibilidad de que el producto pueda cumplir con alguna otra actividad biológica o que pertenezca a otra familia de bacteriocinas, pero, para fines de este trabajo, por el momento no se considerará su clonación, y únicamente se continuará con el propéptido A (LanA).

I.iii.4 Análisis del gen regulador

Como ya se ha mencionado, el clúster involucrado en la producción del lantipéptido de clase II presenta una secuencia que codifica un regulador transcripcional de la familia LuxR. Mediante un análisis en BLAST, se identificó a la proteína con un motivo hélice-giro-hélice. En la plataforma BAGEL4 se identificó a esta proteína como parte de los reguladores transcripcionales de tipo LiaR, la cual fue identificada por primera vez en *Bacillus subtilis* y que forma parte de un regulador de dos componentes involucrado en la respuesta a fármacos que interfieren con el ciclo de lípido II en la membrana citoplasmática, como vancomicina, bacitracina, ramoplanina y nisina (un lantibiótico de clase I), lo que genera un estrés en la célula (Jordan *et al.*, 2006). Esta similitud de secuencia corresponde a la región carboxilo terminal del regulador identificado en el clúster 3 (Figura 37) sin embargo, esta respuesta de estrés ya descrita ampliamente en firmicutes, requiere de un complejo de proteínas que no se observan en el clúster analizado. No se descarta la posibilidad de que este regulador esté actuando sobre otra región del genoma generando una respuesta distinta a la descrita para el sistema LiaR, no obstante, llama la atención que se encuentre el motivo conservado en el clúster y que precisamente esté involucrado en un proceso de estrés por antibióticos que actúan sobre el lípido II, que se propone es el mecanismo de acción que putativamente ejerce el lantipéptido clase II sobre el que gira este proyecto. Entonces, aunque es arriesgado considerarlo, se puede intuir que este regulador esté mayormente encargado de la resistencia del organismo productor, al lantipéptido o los

lantipéptidos que produce, aunque es necesario realizar un análisis más profundo para asegurar esta hipótesis.

```

LuxR      TALAQRVRETAERLRRAVPLRDAVDAMVRRGRLAGSAAAPAEVTLTAREREVLELLARGL 899
LiaR      -----LSRLRHSGENALPHE--SLTKRELEILCLIAEGK 165
           : * * : * . * * : : ** ** * : * * : * *

LuxR      SNRQIGEEELFISAKTASVHVSNIMAKVGASRRTEAVALARRGGLIPD 945
LiaR      TNKEIGEEELFITIKTVKTHITNILSKLDVSDRTQAAVYAHRNHLVN- 210
           : * . : ***** : ** . . * : * * : * : . . * ** : * . . * . * . * :

```

Figura 37. Alineamiento del dominio C-terminal del putativo LuxR contra el regulador LiaR. Los residuos conservados se señalan en asterisco. Alineamiento realizado con MUSCLE (Madeira *et al.*, 2019). LiaR (NP_391188.1).

Se ha observado previamente que en los clústeres de lantipéptidos producidos por miembros del grupo de las actinobacterias (cinamicina y microbisporicina) presentan una estructura de talla-bucle formada por la secuencia del transcrito entre el final del gen *lanA* y el inicio de la primera enzima biosintética *lanM* o *lanB* (Fulston & Bibb, 2010; O'Rourke, *et al.*, 2017), el cual funciona como un putativo atenuador transcripcional. Por tal motivo, nos dimos a la tarea de investigar si se encontraba alguna estructura similar entre la región no codificante entre *lanA* y *lanM* del clúster de interés. Mediante la plataforma *RNAfold WebServer* (Gruber *et al.*, 2008) y *RNAstructure* (Reuter & Mathews, 2010) se predijo una estructura de tallo-bucle entre la región 125,705 – 125,777, con una energía libre mínima de $\Delta G = -52.20 \text{ kcal mol}^{-1}$ ($-218.196 \text{ kJ mol}^{-1}$) (Figura 38). Se ha propuesto que esta estructura funciona como otro mecanismo de regulación, asegurando una estequiometría apropiada entre el péptido precursor del lantipéptido y las enzimas modificadoras (O'Rourke *et al.*, 2017) o un sitio de procesamiento de transcritos, por lo que esta estructura estaría ejerciendo la misma función en el clúster 3 de *Embleya* sp. NF3. Cabe destacar que esta aseveración es una predicción putativa, por lo que es necesario comprobar que el mecanismo de atenuación sucede mediante ensayos experimentales. Para fines de este proyecto, no se profundizará más en esta estructura. Algo que también es interesante es el hecho de que esta secuencia de *tallo-bucle* fue ubicada en la región amino terminal del gen *lanM*, que inicia con un codón de inicio GTG (común en *Streptomyces*) y no con ATG, que finalmente se encuentra al término de la estructura secundaria predicha para el transcrito.

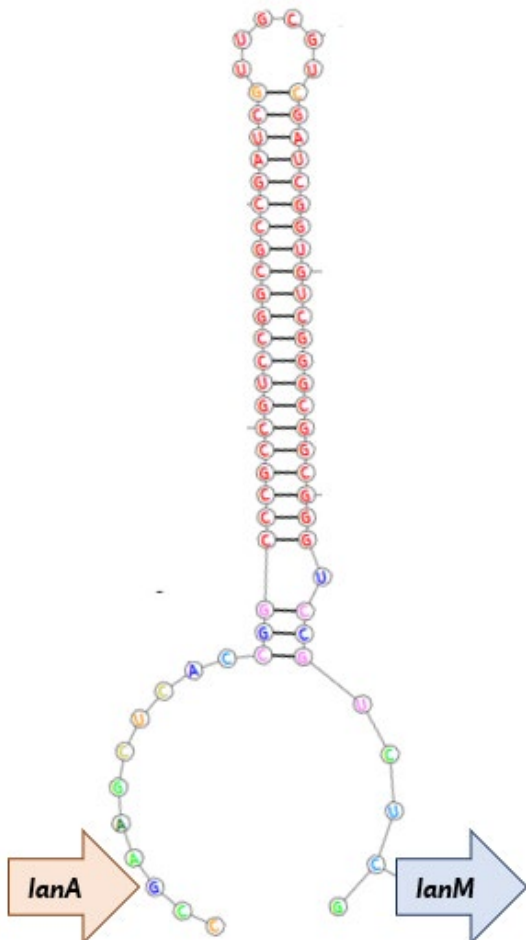


Figura 38. Estructura de tallo-bucle identificada entre la región espaciadora del gen *lanA* y *lanM*. $\Delta G = -52.20$ kcal mol⁻¹. Predicción realizada con el servidor RNAfold WebServer (Gruber *et al.*, 2008).

II. Clonación heteróloga en *Escherichia coli*

La clonación del gen *lanA* se realizó mediante dos ensayos: ensamble Golden Gate y clonación tradicional. Adicionalmente, se realizaron ensayos de clonación del gen *lanM*, sin embargo, se obtuvieron distintos obstáculos en la obtención de esta construcción, como se menciona en la siguiente sección.

II.i Clonación del gen *lanM*

Recapitulando, la clonación y expresión del gen *lanM* es importante para la producción de la enzima biosintética LanM, necesaria para la generación del lantipéptido modificado, que es el PN con actividad antibacteriana potencial. Una vez realizado el análisis bioinformático,

se planteó la posibilidad de clonar y expresar este gen en *E. coli*. La estrategia a seguir consistía en la amplificación por PCR del gen a partir del genoma de *Embleya* sp. NF3; posteriormente clonarlo en el vector pCR-Blunt II-TOPO, e inmediatamente subclonarlo en el vector de expresión pET-22b(+). Finalmente, se realizaría la expresión para la obtención de la proteína recombinante.

Se realizaron varios ensayos de clonación tanto en el vector pET-22b(+), como en el vector pCR-Blunt II-TOPO (resultados no mostrados), en los que se tenían numerosas colonias transformantes, sin embargo, al momento de realizar la verificación de la construcción TOPO-*lanM* o pET22-*lanM*, se observaron patrones de digestión distintos a lo predicho mediante algunas plataformas de análisis bioinformático, e incluso, los vectores perdían parte de su secuencia, lo que se veía reflejado en un patrón de digestión muy diferente al observado con el plásmido sin transformar.

Lo anterior nos hizo considerar un posible evento de recombinación entre el genoma de *E. coli* y las construcciones con el gen *lanM* dado su alto contenido de GC (73.6%) y las altas secuencias palindrómicas presentes en los vectores de expresión utilizadas. No obstante, este evento podría ser poco probable por diversas razones. En primer lugar, se reporta que los vectores del sistema pET son estables en las condiciones trabajadas en el laboratorio sin embargo, también se ha reportado que en algunas ocasiones pueden surgir problemas de inestabilidad cuando un gen codifica para producto tóxico para la célula al expresarse en bajas concentraciones (sobre todo al clonarse en hospederos que contengan el gen de la RNA polimerasa T7), lo cual tampoco sería posible, ya que no se usaron dichas cepas para clonar, lo que nos lleva a nuestro segundo punto.

Las cepas utilizadas para la clonación se encuentran deletadas de recombinasa y endonucleasa A (*recA* & *endA*) lo que debería proveer de una alta eficiencia de transformación y evitaría eventos tales como los que se observaron en los experimentos. Ahora bien, en caso de que alguna de estas cepas estuviera expresando alguna recombinasa, se ha reportado que en condiciones *in vitro*, secuencias ricas en GC generan una exclusión para la recombinación en *E. coli*, incluso cuando estas son altamente conservadas (Gruss *et al.*, 1991). En contraparte, también se ha reportado que en *E. coli* ocurren reordenamientos entre repeticiones cortas independientemente de la recombinación homóloga mediada por *recA* e incluso, estas supresiones se observan a

frecuencias más altas en secuencias repetidas largas (Lovett *et al*, 1994) como el caso de nuestras secuencias de interés, por tanto, un evento de esta magnitud podría ser posible.

Pese a los esfuerzos innumerables de obtener con éxito la construcción con el gen *lanM*, lamentablemente no fue posible clonar este gen mediante técnicas tradicionales, razón por la cual, no se presentan resultados en esta sección.

Ahora bien, se planteó la posibilidad de clonar este gen mediante una técnica de clonación distinta a la utilizada en este proyecto, como ensamble de Gibson o ensamble Golden Gate en *E. coli* o en su lugar, realizar ensayos de clonación en alguna cepa de *Streptomyces*, ya que se encuentra filogenéticamente más cercana a *Embleya*, al ser miembro de la familia *Streptomycetaceae* (Kokami *et al.*, 2020), lo que a su vez podría ayudar a lograr una expresión exitosa de la proteína LanM al evitar posibles problemas de insolubilidad o una traducción ineficaz reportada para el hospedero *E. coli* (Nakashima *et al.*, 2005) al aumentar la disponibilidad de codones típicos para actinomicetos. Sin embargo, la clonación de *lanM* se encontraba fuera de los objetivos de este proyecto y del tiempo destinado del programa de posgrado, por lo que queda como perspectiva para futuros proyectos.

II.ii Clonación del gen *lanA* por ensamble Golden Gate

El ensamble Golden Gate es una metodología de clonación que emplea endonucleasas tipo IIS, cuyo funcionamiento es cortar fuera de los sitios de reconocimiento de su secuencia de reconocimiento, generando así extremos cohesivos de alrededor de 4 pares de bases (también conocidos como sitios de fusión), que indican el orden en el que se ensamblan las secuencias de interés (Andreou & Nakayama, 2018; Hamedirad *et al.*, 2019)

Para la realización de esta técnica es necesario tener optimizado un vector destino (*backbone*) con los sitios de reconocimiento de la enzima de restricción. En este proyecto se usó el plásmido pFGC-T7-RJBB (Guzmán *et al.*, 2022). Este vector presenta sitios de reconocimiento de la enzima *BsaI*, mismos que flanquean la secuencia de la beta galactosidasa (*lacZ*) que permite discriminar las colonias con la construcción deseada mediante un sistema blanco/azul; adicionalmente, la inducción de la proteína de interés se encuentra bajo el promotor T7 y, además, se adiciona una etiqueta de histidinas (His-Tag) en el extremo amino terminal de la proteína recombinante.

También es necesario que en el gen a insertar se encuentren los sitios de reconocimiento de la endonucleasa. Para este proyecto se utilizó la enzima *Bsa*I. Estos sitios fueron colocados en la secuencia del gen *lanA* mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para lo cual fue necesaria la síntesis de oligonucleótidos que incluyeran esta secuencia y, además, se adicionaron los sitios de fusión complementarios a los sitios generados en pFGC-T7-RJBB. En el anexo 4 se muestra un esquema general del ensamble Golden Gate entre el vector pFGC-T7-RJBB y el gen *lanA*.

Se comenzaron los ensayos de clonación del gen *lanA* en el vector de expresión pFGC-T7-RJBB. Las cantidades para agregar a la mezcla de reacción fueron determinadas de acuerdo con la concentración del inserto y del vector determinadas en un equipo nanodrop. Para la verificación del éxito de la construcción se realizó PCR de colonia de 5 transformantes. Se verificó la presencia del amplicón en las colonias 1, 2, 3 y 5. Como primer control negativo se utilizó una colonia transformante color azul y como segundo control negativo el plásmido pFGC-T7-RJBB; el control positivo corresponde a la construcción pUCIDT-*lanA* (Figura 39).

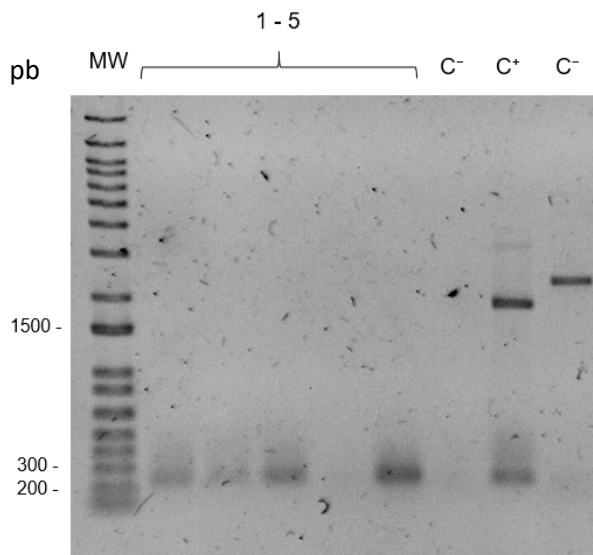
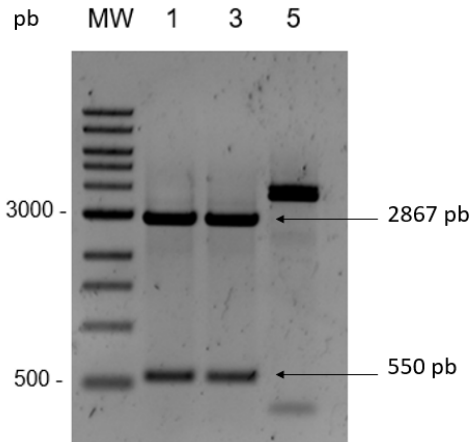


Figura 39. PCR de los plásmidos para la la identificación del gen *lanA* en gel de agarosa 0.8%. C+: control positivo; C-: control negativo. pb = pares de bases. MW = marcador de peso molecular.

Posteriormente, era necesario verificar el éxito de la construcción mediante una digestión con enzimas de restricción; sin embargo, es importante recordar que mediante el sistema de ensamble Golden Gate, los sitios de ensamble (*Bsa*I) se pierden, por tanto, fue necesario la búsqueda de otra enzima que mostrara un patrón de digestión específico. Con ayuda de la plataforma *Snappene*, se seleccionó la enzima *Bpi*I. Se extrajo el plásmido de las colonias 1, 3 y 5. El plásmido de las colonias fue incubado con *Bpi*I durante 2 horas a 37 °C.



En los plásmidos de las colonias 1 y 3 se observó el patrón de bandas esperado para la construcción pFGC-*lanA* (Figura 40), por lo que ambos plásmidos aislados fueron mandados a secuenciar a la unidad de secuenciación del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Figura 40. Verificación del patrón de bandas de la construcción pFGC-*lanA*, en gel de agarosa 0.8% (m/v). Se observan las bandas esperadas en el plásmido 1 y 3. pb = pares de bases. MW = marcador de peso molecular.

Los resultados de la secuenciación mostraron resultados de muy buena calidad y la presencia del inserto *lanA* en el vector (Figura 41). Esta secuencia no presenta mutaciones, por lo que la verificación de la construcción fue realizada con éxito.

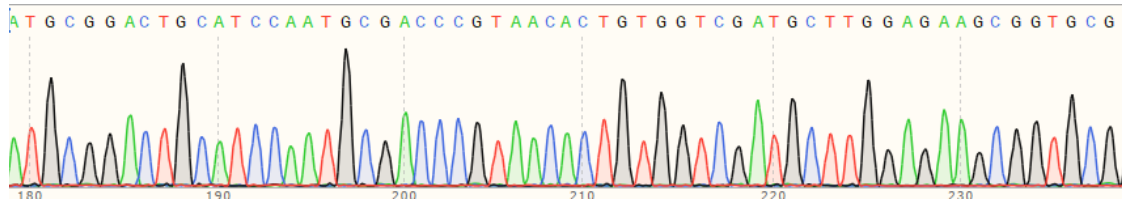


Figura 41. Resultados de la secuenciación de la construcción pFGC-*lanA*.

II.iii Clonación del gen *lanA* en pRSFDuet-1

Adicionalmente, el gen *lanA* fue clonado en el vector de expresión pRSFDuet-1. En primer lugar, se extrajo el plásmido pUCIDT-*lanA* y el plásmido pRSFDuet-1 de transformantes de

E. coli DH5- α , para posteriormente ser digeridos y ligados de acuerdo con los procedimientos descritos en la sección de metodología.

Se realizó un ensayo de transformación por choque térmico de células de *E. coli* DH5- α en el que se obtuvieron 8 colonias transformantes. Se extrajo el plásmido de las 8 colonias y se observó el patrón de bandeo y se prosiguió con el análisis de dos colonias (Figura 42).

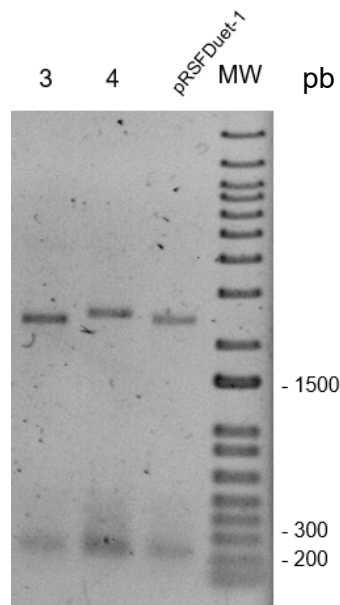


Figura 42. PCR de los plásmidos para la identificación del gen *lanA* en gel de agarosa 0.8% (m/v). Se observa una banda correspondiente al tamaño esperado del amplicón de 227 pb en los 3 casos. pb = pares de bases. MW = marcador de peso molecular.

Para la verificación del éxito de la construcción se realizó PCR de los plásmidos. Se verificó la presencia del amplicón en la colonia 4. Es importante observar que dicha banda se observaba también en el control negativo, en el que se colocó como molde al plásmido pRSFDuet-1; sin embargo, la banda obtenida con la transformante 4, era aún más intensa, por lo que para verificar que en este plásmido se encontraba el inserto *lanA*, se realizó una digestión con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*. Se incubaron ambas enzimas a 37°C por cuatro horas, en el buffer de reacción 2 de New England Biolabs.

En la Figura 43 se puede observar la presencia de una banda en el peso esperado para el inserto *lanA*, por lo que presuntivamente la construcción fue exitosa. Este plásmido fue

mandado a secuenciar a la unidad de secuenciación del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

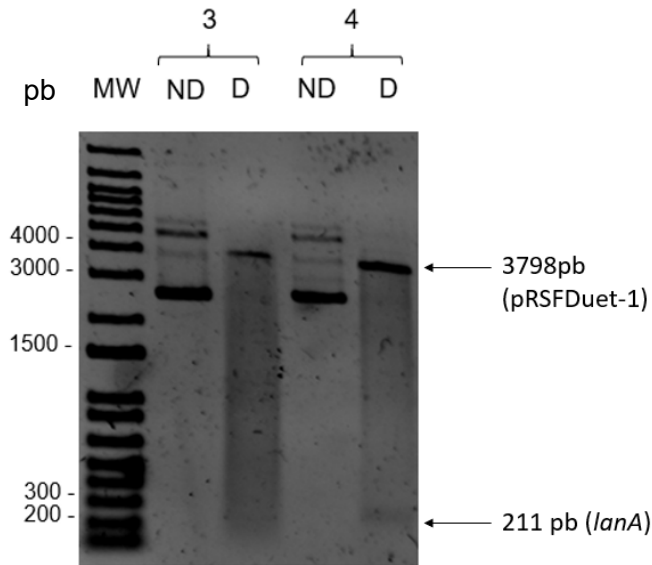


Figura 43. Verificación la liberación del inserto de la construcción pRSFDuet-*lanA*, en gel de agarosa 0.8% (m/v). Se observan las bandas correspondientes al inserto y al vector en el plásmido 4. ND: no digerido; D: digerido. pb = pares de bases. MW = marcador de peso molecular.

Los resultados de la secuenciación mostraron la presencia del inserto *lanA* en el vector (Figura 44). Esta secuencia no presentó mutaciones, por lo que la verificación de la construcción fue realizada con éxito.

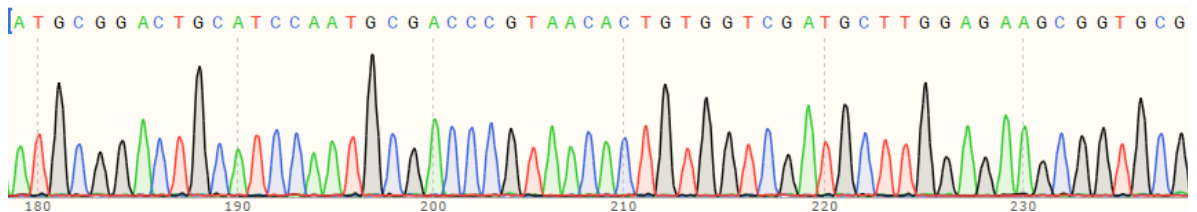


Figura 44. Resultados de la secuenciación de la construcción pRSFDuet-*lanA*.

III. Inducción de la expresión mediante el sistema *Cell-Free*

Después de corroborar que ambas construcciones estuvieran correctas: pFGC-*lanA* y pRSFDuet-1, se decidió implementar el sistema de expresión libre de células (*Cell-free*), dada la facilidad que presenta este sistema y a los buenos resultados que ha mostrado tanto para la producción de lantipéptidos como de otras proteínas (Liu *et al.*, 2020; Guzmán *et al.*, 2022;). Los sistemas libres de células o CFPS (*cell-free protein synthesis*) son sistemas para la producción de proteínas recombinantes independientes del crecimiento celular (Liu *et al.*, 2020). Estos contienen todos los componentes necesarios para la traducción *in vitro* de los RNAs presentes en la reacción (Bergquist, Siddiqui & Sunna, 2020), generalmente se utilizan extractos crudos derivados de bacterias, adicionados con aminoácidos esenciales y sustratos energéticos que son utilizados como fuente de energía para polimerizar aminoácidos a cadenas polipeptídicas (Hodgman & Jewett, 2011). Dado el alto nivel en la síntesis de proteína y a la relación costo-beneficio, la CFPS con *E. coli* ha sido uno de los principales sistemas utilizados.

Específicamente, el sistema a utilizar en este proyecto fue propuesto por Guzmán y colaboradores y actualmente los componentes de la reacción se encuentran disponibles en el laboratorio de Microbiología Industrial y contiene a grandes rasgos, los siguientes componentes:

- 33.33% (v/v) de extracto celular: proviene de la inducción con IPTG de un cultivo de *E. coli* BL21, misma que se encuentra escindida de proteasas y optimizada para la expresión de proteínas recombinantes.
- Wizard Mix: Glutamato de potasio 175 mM, glutamato de amonio 10 mM, oxalato de potasio 2.7 mM, putrescina 1 mM, espermidina 1.5 mM, 0.33 mM NAD, 1.2 mM ATP, 0.86 mM CTP, GTP and UTP, 0.27 mM CoA, 0.172 mg/mL of MRE600 *E. coli* tRNA, ácido fólico 0.07 mM, 33 mM PEP, 2 mM de cada uno de los 19 aminoácidos (excepto glutamato), glutamato de magnesio 10 mM.
- 5 nM de DNA plasmídico o lineal.
- 2% (p/v) de polietilenglicol 8000 (PEG-8000) como agente de hacinamiento.
- H₂O MilliQ estéril

Ahora bien, en ambas construcciones se utilizó una secuencia del péptido *lanA* optimizada para su expresión en *E. coli*, pues recordando, fue extraída de la construcción sintética

pUCIDT-*lanA*, por lo tanto, la expresión del péptido *lanA* mediante este sistema puede ser exitosa.

En primer lugar, ambas construcciones fueron extraídas y diluidas a una concentración 20 nM. Para la conversión de la concentración en masa a molar, se empleó la plataforma *Bioline calculator* (https://www.bioline.com/media/calculator/01_07.html). Este plásmido debe de estar purificado por columna de purificación de DNA o, en su defecto, debe de tener índices de pureza 260/280 y 260/230 recomendados para secuenciación.

Posteriormente, se colocaron 20 reacciones con el vector pFGC-*lanA* (Figura 45), de acuerdo con la composición mostrada en la Tabla 8. En seguida, todas las reacciones fueron purificadas mediante columnas de afinidad a níquel. Para la observación de la presencia de pequeños péptidos, se utilizaron como controles una reacción de *cell-free* sin plásmido, y como control positivo se utilizó un plásmido productor de la proteína mScarlet. Las reacciones fueron incubadas durante 14 horas a 29 °C.

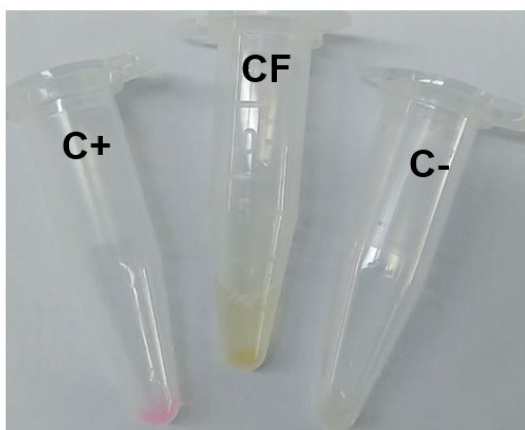


Figura 45. Visualización de las reacciones de cell-free. C+: CFPS con el plásmido mScarlet. C-: control negativo de la reacción. CF: CFPS con la construcción pFGC-*lanA*.

Se realizó un gel de Tris-Tricina a una concentración de 16% (m/v) de poliacrilamida a una concentración de 46.5/3% (m/v) de acrilamida/bis-acrilamida, de acuerdo con Schägger (2016). En el gel se cargaron 15 μ L de muestra. En este ensayo se comparó la proteína de los controles positivo, negativo, las dos eluciones resultantes de la purificación por afinidad, los 3 lavados realizados a la columna y la fracción no unida a la misma (Figura 46).

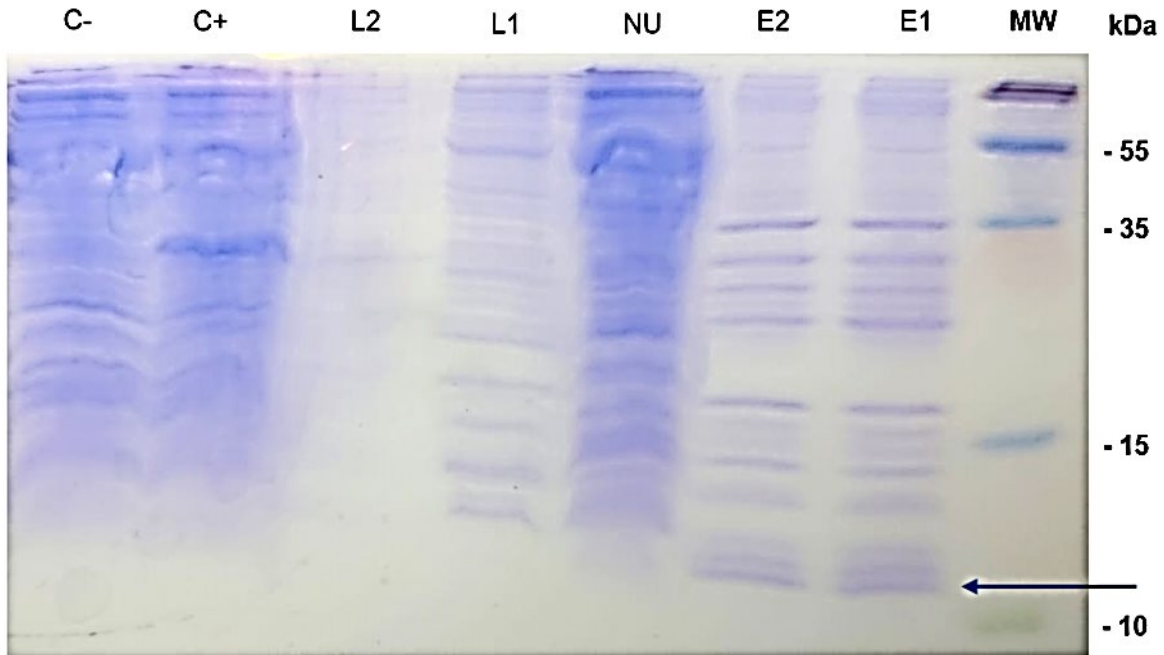


Figura 46. Separación y visualización de las proteínas presentes en la reacción CFPS de la construcción pFGC-*lanA* en gel de Tris-Tricina-SDS al 16% (m/v) de poliacrilamida. Se observan péptidos presentes en las eluciones de las columnas de afinidad con un peso superior a 10 kDa. E1: Primera elución con 500 mM de imidazol. E2: Segunda elución con 500 mM de imidazol. NU: fracción no unida a las columnas de afinidad a níquel. L1: Primer lavado con 20 mM de imidazol. L2: Segundo lavado con 20 mM de imidazol. C+: CFPS con el plásmido mScarlet. C-: control negativo de la reacción.

En la Figura 46 se observa la presencia de bandas de proteínas en un peso alrededor de los 10 kDa, lo que podría corresponder al péptido LanA. En la Tabla 21 se muestran las características de los péptidos expresados. Muchas veces se ha observado que en estos geles algunas proteínas no muestran el peso teórico esperado por diversas razones. Una de las más comunes es que estas proteínas recombinantes pueden formar oligómeros, lo que representa que el peso sea diferente al esperado, por tanto, no se descarta la posibilidad de que LanA forme oligómeros y que esta diferencia de bandas, no observada en los controles, corresponda a la proteína esperada.

Tabla 21. Pesos esperados de las construcciones con el gen *lanA*

Construcción	Peso esperado con PL	Peso del PL	Peso del core
pFGC-<i>lanA</i>	9215.10 Da (87 aa)	5638.06 Da (52 aa)	3595.05 (35 aa)
pRSFDuet-<i>lanA</i>	8874.63 Da (83 aa)	52971.59 Da (48 aa)	

PL: péptido líder; aa: aminoácidos

Otro punto que fue notable es la presencia de múltiples bandas de proteínas en las eluciones de la purificación, éstas pueden corresponder a proteínas con secuencias de histidinas en su secuencia, mismas que han quedado adheridas a la membrana con imidazol y que, por tanto, pueden considerarse como contaminantes en la purificación. Para solucionar este problema se realizaron lavados más astringentes mediante el aumento de la concentración de imidazol en la solución de lavado a 80 mM, repitiendo dos veces este paso.

Nuevamente se realizaron geles de tris-tricina para observar el péptido LanA; sin embargo, no se obtuvo éxito al realizar estos geles, ya que no se observaba una buena resolución en ninguno de los carriles (geles no mostrados). Se realizaron varios ensayos en los que se cambiaban distintas condiciones de la electroforesis, pero desafortunadamente no se obtuvieron resultados positivos en ninguno de los casos.

Dados los problemas anteriores se decidió continuar realizando geles de poliacrilamida SDS-PAGE (Figuras 47 y 48) para observar la presencia del péptido de interés mediante una tinción con azul de Coomassie para la visualización de las bandas de proteínas.

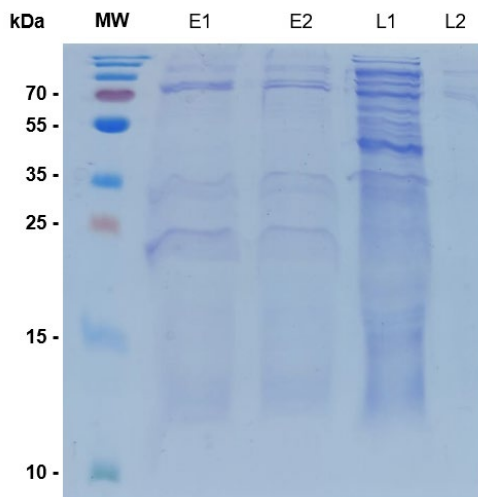


Figura 47. Separación y visualización de las proteínas presentes en la reacción CFPS de la construcción pFGC-*lanA* en gel de SDS-PAGE al 16% (m/v) de poliacrilamida. No se observan péptidos presentes en las eluciones de las columnas de afinidad con un peso alrededor de 10 kDa. E1: Primera elución con 500 mM de imidazol. E2: Segunda elución con 500 mM de imidazol. NU: fracción no unida a las columnas de afinidad a níquel. L1: Primer lavado con 80 mM de imidazol. L2: Segundo lavado con 80 mM de imidazol. Se cargaron 10 μ L de las muestras.

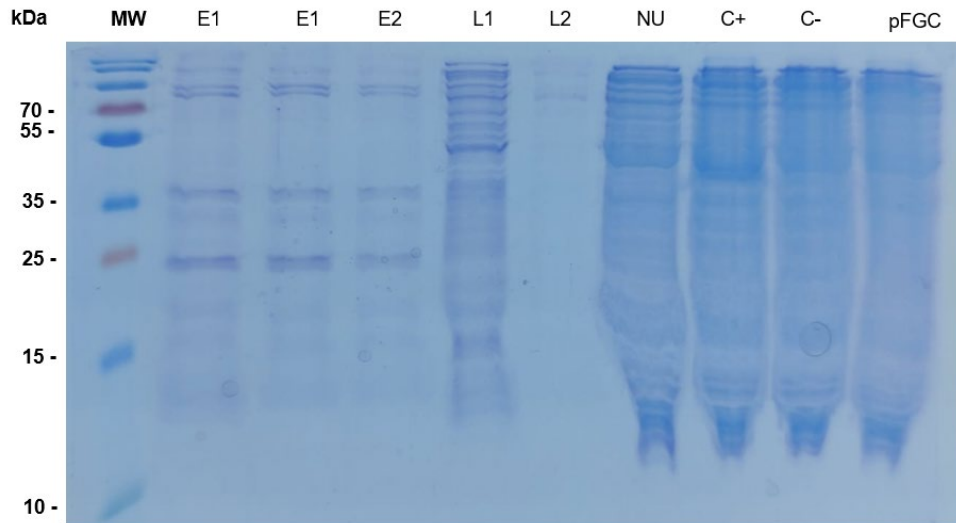


Figura 48. Separación y visualización de las proteínas presentes en la reacción CFPS de la construcción pFGC-*lanA* en gel de SDS-PAGE al 16% (m/v) de poliacrilamida. No se observan péptidos presentes en las eluciones de las columnas de afinidad con un peso alrededor de 10 kDa. E1: Primera elución con 500 mM de imidazol. E2: Segunda elución con 500 mM de imidazol. NU: fracción no unida a las columnas de afinidad a níquel. L1: Primer lavado con 80 mM de imidazol. L2: Segundo lavado con 80 mM de imidazol. C+: CFPS con el plásmido mScarlet. C-: control negativo de la reacción. pFGC: CFPS con el vector vacío. Se cargaron 8 μ L de las eluciones y lavados y 6 μ L de los controles.

Se observa en las Figuras anteriores (Fig. 47 y 48) que aumentar la concentración de imidazol en los lavados, efectivamente disminuye la cantidad de proteína presente en las eluciones e incluso, en el segundo lavado ya no se encuentra gran cantidad de proteína. Sin embargo, con los geles SDS-PAGE no se han logrado definir bandas del peso esperado del péptido LanA, incluso utilizando concentraciones elevadas de poliacrilamida.

No se descarta la posibilidad del éxito de la expresión mediante el sistema *cell-free*, dado la funcionalidad que ha demostrado este sistema anteriormente, sin embargo, se requiere de otras metodologías más sensibles que permitan la identificación adecuada de péptidos pequeños.

En contraparte, se ha cumplido con los objetivos centrales del proyecto de investigación, por lo que se propone como perspectiva proseguir con los ensayos de expresión del péptido precursor LanA.

En la búsqueda de un producto natural novedoso, en este trabajo se logró evidenciar mediante minería genómica la presencia de clústeres que codifican lantipéptidos de distintas clases en el genoma de algunos actinomicetos endófitos. En el genoma de *Actinoplanes* sp. TCF3 no se identificaron BGC de lantipéptidos; en *Streptomyces* sp. L06 se identificó un BGC de lantipéptido de clase III; mientras que en *Embleya* sp. NF3 se identificaron dos clústeres de clase I, uno de clase II, uno de clase III y tres de clase IV. Se analizó la secuencia de la putativa enzima biosintética LanL del clúster 21, y se identificó la ausencia de distintos aminoácidos en la secuencia, cuya presencia para la actividad catalítica ha sido determinada experimentalmente, por lo que putativamente se infiere que podría no ser funcional; sin embargo, esto se debe corroborar experimentalmente.

Por otro lado, en el genoma de *Embleya* sp. NF3 se identificó un BGC único productor de un lantipéptido de clase II. Mediante herramientas bioinformáticas, se pudo realizar el análisis de la secuencia de la enzima biosintética LanM, donde se determinó que esta presentaba los dominios indispensables para la funcionalidad de la proteína, como se ha observado en otros estudios. Adicionalmente, también se realizó el modelado de la proteína tomando como molde a la estructura de CylM, enzima encargada del procesamiento de la citolisina, un lantipéptido de clase II producido por *Enterococcus faecalis*. Sobre este modelo se predijo como ligando al ión Zn^{2+} y al AMP, que se ha observado, también son importantes para la funcionalidad de la enzima. En contraparte, se realizó el análisis de la secuencia del gen transportador LanT, donde también fue notable la ausencia del dominio de proteasa, que se ha descrito, es útil para la remoción del péptido líder del péptido maduro, aunque como se mencionó, este resultado se ha observado en numerosos BGC identificados en actinobacterias.

Asímismo, el análisis del gen regulador evidenció que éste codifica para una proteína que pertenece a la familia del regulador LiaR (de *Bacillus subtilis*), que se activa con moléculas que atacan el lípido II. En suma, también se identificó una estructura tallo-bucle entre el final del gen *lanA* y el inicio del gen *lanM*, y se infiere que puede funcionar como atenuador transcripcional.

Mediante un análisis exhaustivo de la proteína codificada en el gen *lanA* se identificaron aminoácidos conservados en el péptido líder, así como una estructura secundaria de alfa hélice, que se ha visto que son necesarios para que éste puede ser modificado por la maquinaria biosintética. Se ubicó más de un gen *lanA* en el BGC, de los cuales sólo uno

presentaba las características idóneas para ser modificado postraduccionalmente, sin embargo, no se descarta la posibilidad de que otros péptidos puedan ser modificados por LanM.

Adicionalmente, se asignaron otras funciones a los genes adicionales que se encontraban en el BGC 3 de *Embleya* sp. NF3, los cuales, de acuerdo con la literatura, no estarían participando en la producción de un lantipéptido de clase II.

La relevancia de este BGC no sólo radica en que la secuencia del péptido no ha sido descrita con anterioridad, si no que, además, se ha reportado que la familia a la que pertenece este PN puede presentar otras actividades biológicas adicionales a la antimicrobiana, lo que confirma la importancia que puede adquirir la caracterización experimental del lantipéptido.

Por tanto, y de acuerdo con la identificación y caracterización bioinformática realizada en este proyecto, se concluyó que para la producción del lantipéptido de clase II es necesario e indispensable la clonación y expresión de los genes *lanM* y *lanA*.

En un primer ensayo, se seleccionó a *Escherichia coli* como hospedero heterólogo para la expresión de ambos genes. Se realizaron diversos ensayos para la clonación del gen *lanM* utilizando distintos vectores de clonación; sin embargo, no fue posible obtener esta construcción siguiendo los métodos ya descritos, por lo que queda como perspectiva utilizar otro hospedero mayormente relacionado a la cepa nativa.

Por otro lado, se obtuvo con éxito la construcción con el gen *lanA* utilizando estrategias de clonación tradicional, así como con ensamble Golden Gate en *E. coli*. Asimismo, se probó la expresión del péptido mediante un sistema libre de células (*cell-free*), donde presuntivamente pudimos observar la presencia de LanA. Aunado a ello, queda como perspectiva realizar más ensayos para determinar la presencia del péptido. No obstante, no es menos preciso afirmar que esta metodología es novedosa en cuanto a la obtención de lantipéptidos, por tanto, este proyecto es pieza clave para seguir implementando estas técnicas en el laboratorio y que más adelante se pueda perfeccionar la obtención de péptidos pequeños.

Es importante realizar en futuros proyectos la clonación y expresión del gen *lanM* para obtener la enzima biosintética necesaria para la generación del lantipéptido maduro LanA

y, posteriormente, realizar ensayos de difusión en agar contra diversas cepas bacterianas para la determinación de la actividad antimicrobiana.

En resumen, utilizando un enfoque de minería genómica, logramos hacer visible la presencia de un BGC novedoso productor de un lantipéptido de clase II, se realizó su caracterización bioinformática y se contribuyó a la clonación del gen *lanA* en un hospedero heterólogo, culminando así con los objetivos planteados en este proyecto de investigación.

Conclusiones

Utilizando herramientas de minería genómica se identificaron 7 clústeres involucrados en la producción de lantipéptidos en el genoma de *Embleya* sp. NF3 y un BGC en *Streptomyces* sp. L06. *Actinoplanes* sp. TCF3 no presentan clústeres involucrados en la producción de lantipéptidos.

El clúster 21 de *Embleya* sp. NF3 no presenta los dominios indispensables en la secuencia de LanL, para la biosíntesis de un lantipéptido de clase IV.

El clúster 3 de *Embleya* sp. NF3 presenta la enzima modificadora LanM completa, así como el péptido precursor idóneo para la producción de un lantipéptido clase II; la regulación de su producción puede estar mediada por un putativo atenuador transcripcional localizado entre el gen *lanA* y el *lanM*.

Se obtuvo con éxito la construcción pFGC-*lanA* por ensamble Golden Gate y la construcción pRSFDuet-*lanA* mediante clonación tradicional y presuntivamente, utilizando la plataforma *cell-free* se puede obtener la expresión del péptido LanA.

Perspectivas

Realizar la clonación y expresión del gen *lanM* mediante técnicas de clonación distintas a las utilizadas en este proyecto o utilizando otro hospedero heterólogo disponible en el laboratorio.

Obtener el lantipéptido maduro LanA mediante la incubación de la enzima LanM con el péptido LanA inmaduro.

Realizar ensayos de antibiosis por difusión en agar con el lantipéptido de clase II.

Identificar la estructura del lantipéptido modificado.

Producir el lantipéptido de clase IV codificado en el clúster 21 de *Embleya* sp. NF3, para comprobar la funcionalidad de la enzima LanL.

Referencias bibliográficas

- Adnani, N., Rajsiki, S. R. & Bugni, T. S. (2017) *Symbiosis-inspired approaches to antibiotic Discovery*. Natural Products Reports 34(7): 784-814.
- Afzal, I., Shinwari, Z. K., Sikandarm, S. & Shahzad, S. (2019) *Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants*. Microbiological Research 221: 36-49.
- 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 3(45): W80-W88.
- Altena, K., Guder, A., Cramer, C. & Bierbaum, G. (2000) *Biosynthesis of the Lantibiotic Mersacidin: Organization of a Type B Lantibiotic Gene Cluster*. Applied and environmental Microbiology 66(6): 2565-2571.
- Andrei, S., Droc, G. & Stefan, G. (2019) *FDA approved antibacterial drugs: 2018-2019*. Discoveries 7(4): e102.
- Andreou, A. I., & Nakayama, N. (2018). *Mobius Assembly: A versatile Golden-Gate framework towards universal DNA assembly*. PLOS ONE, 13(1), e0189892.
- Anzai, Y., Tsukada, S., Sakai, A., et al. (2012) *Function of Cytochrome P450 Enzymes MycCl and MycG in Micromonospora griseorubida, a Producer of the Macrolide Antibiotic Mycinamicin*. Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy 56(7): 3648-3656.
- Arpit, T., Kumar, A., Jajoo, A., Bhasin, S., Kumar, V., Hashem, A., Alqarawi, A. & Fathi, E. (2021). *Tapping into Actinobacterial Genomes for Natural Product discovery*. Frontiers in Microbiology 12: 655620.
- Asaduzzaman, S., Al-Mahin, A., Bashar, T., & Noor, R. (1970). *Lantibiotics: A Candidate for Future Generation of Antibiotics*. Stamford Journal of Microbiology, 1(1), 1–12.
- Basi-Chipalu, S. (2016) *A review: Lantibiotics, a promising Antimicrobial Agent*. Journal of Institute of Science and Technology 21(1): 119-128.
- Belknap, K.C., Park, C.J., Barth, B.M. et al. *Genome mining of biosynthetic and chemotherapeutic gene clusters in Streptomyces bacteria*. Sci Rep 10, 2003 (2020).
- Bérdy, J. (2012) *Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading*. The Journal of Antibiotics 65: 385-395.
- Bergquist, P. L., Siddiqui, S., & Sunna, A. (2020). *Cell-Free Biocatalysis for the Production of Platform Chemicals*. Frontiers in Energy Research, 8: 193.
- Bimboim, H.C. and Doly, J. 1979. *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid*. DNA. Nucleic Acids Research. Vo. 17 no. 6 pp 1513-1524g.
- Blin, K., Kazempour, D., Wohlleben, W. & Weber, T. (2014) *Improved Lanthipeptide Detection and Prediction for antiSMASH*. Plos One 9(2): e89420.
- Blin, K., Shaw, S., Steinke, K., Villebro, R., Ziemert, N., Sang, Y. L., medema, M. H., Weber, T. (2019) *antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite denome mining pipeline*. Nucleid Acid Research 47: W81-W87.

- Blum, *et al.* (2020) *The InterPro protein families and domains database: 20 years on*. *Nucleic Acids Research* 49(D1): D344-D354.
- Boakes, S., & Dawson, M. J. (2014). *Discovery and Development of NVB302, a Semisynthetic Antibiotic for Treatment of Clostridium difficile Infection*. *Natural Products*, 455–468.
- Boakes, S., Weiss, W. J., Vinson, M., Wadman, S., & Dawson, M. J. (2016). *Antibacterial activity of the novel semisynthetic lantibiotic NVB333 in vitro and in experimental infection models*. *The Journal of Antibiotics*, 69(12), 850–857.
- Bobeica, S. C., *et al.* (2019) *Insights into AMS/PCAT transporters from biochemical and structural characterization of a double Glycine motif protease*. *Biochemistry and Chemical Biology* 8: e42305.
- Brown, E., Wright, G. *Antibacterial drug discovery in the resistance era*. *Nature* **529**, 336–343 (2016).
- Brumfitt, W., Salton, M., & Hamilton, J. (2002) *Nisin, alone and combined with peptidoglycan-modulating antibiotics: activity against methicillin-resistant Staphylococcus aureus and vancomycin-resistant enterococci*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 50: 731-734.
- Brutani, C., *et al.* (2018) *Expanding the potential of NAI-107 for treating serious ESKAPE pathogens: synergistic combinations against Gram-negatives and bactericidal activity against non-dividing cells*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 73(2): 414-424.
- Chatterjee, C., Paul, M., Xie, L. & Van der Donk (2005) *Biosynthesis and Mode of Action of Lantibiotics*. *Chemical Reviews* 105(2): 633-684.
- Chen, J. & Kuipers, O. (2021). *Isolation and Analysis of the Nisin Biosynthesis Complex NisBTC: further Insights into Their Cooperative Action*. *Bacteriology* 12(5): e02585-21.
- Chen, J. & Xie, J. (2011) *Role and regulation of bacterial LuxR-like regulators*. *Journal of Cellular Biochemistry* 112(10): 2694-2702 .
- Cruz, J. C. S., Iorio, M., Monciardini, P., Simone, M., Brunati, C., Gaspari, E. Donadio, S. (2015). *Brominated Variant of the Lantibiotic NAI-107 with Enhanced Antibacterial Potency*. *Journal of Natural Products*, 78(11), 2642–2647.
- Dan, W. & Dai, J. (2020) *Recent developments of chalcones as potential antibacterial agents in medicinal chemistry*. *European Journal of Medicinal Chemistry* 187: 111980.
- Dischinger, J., Chipalu, A. B. & Bierbaum, G. (2014) *Lantibiotics: Promising candidates for future applications in health care*. *International Journal of Medical Microbiology* 304: 51-62.
- Dong, S. H., Tang, W., Luckk, T., Yu, Y., Nair, S.K., Van der Donk, W. A. (2015) *The enterococcal cytolysin synthetase has an unanticipated lipid kinase fold*. *Elife* 30(4): e07607.
- Engler, C., Kandzia, R., & Marillonnet, S. (2008). *A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Throughput Capability*. *PLoS ONE*, 3(11), e3647.
- Engler, C., & Marillonnet, S. (2013). *Golden Gate Cloning*. *Methods in Molecular Biology*, 119–131.

- El-Gebali, S., et al. (2019) *The Pfam protein families database in 2019*. Nucleic Acids Research 47(D1): D427-D432.
- Foulston, L. & Bibb, M. (2010) *Microbisporicin gene cluster reveals unusual features of lantibiotic biosynthesis in actinomycetes*. PNAS 107(30): 13461-13466.
- Foulston, L. (2019). *Genome mining and prospects for antibiotic discovery*. Current Opinion in Microbiology, 51: 1–8.
- Golinska, P., et al. (2015) *Endophytic actinobacteria of medicinal plants: diversity and bioactivity*. Antonie Van Leeuwenhoek 108(2): 267-289.
- Goto, Y., Li, B., Claesen, J., Shi., Y., Bibb, M. & Van der Donk, W. A. (2010) *Discovery of Unique Lanthionine Synthetases Reveals New Mechanistic and Evolutionary Insights*. Plos Biology 8(3): e1000339
- Gruss, A., Moretto, V., Dusko, S., Duwat, P. & Dabert, P. (1991) *GC-rich DNA Sequences Block Homologous Recombination in Vitro*. The Journal of Biological Chemistry 266(11): 6667-6669.
- Guzmán-Chávez et al. (2022) *Constructing Cell-Free Expression Systems for Low-Cost Access*. ACS Synth. Biol. 11(3): 1114–1128.
- Hacker, C., Christ, N. A., Duchardt-Ferner, E., Korn, S., Göbl, C., Berninger, L., ... Wöhnert, J. (2015). *The Solution Structure of the Lantibiotic Immunity Protein NisI and Its Interactions with Nisin*. Journal of Biological Chemistry, 290(48), 28869–28886.
- Hamedirad, M., Weisberg, S., Chao, R., Lian, J., & Zhao, H. (2019). *Highly Efficient Single-pot Scar-less Golden Gate Assembly*. ACS Synthetic Biology 8(5):1047-1054.
- Hanks, S. & Hunter, T. (1995) *The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification*. The FASEB Journal 9: 576-597.
- Héchard, Y. & Sahl, H.G. (2002) *Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria*. Biochimie 84: 545-557.
- Hodgman, E. & Jewett, M. (2012) *Cell-free synthetic biology: Thinking outside the cell*. Metabolic Engineering 14: 261-269.
- Huang, J., et al. (2005) *Cross-regulation among disparate antibiotic biosynthetic pathways of Streptomyces coelicolor*. Molecular Microbiology 58(5): 1276-1287
- Iftime, D., et al. (2015) *Streptocollin, a Type IV Lanthipeptide Produced by Streptomyces collinus Ti 365*. Chembiochem 16: 2615-2623.
- Jose, P. A., Maharshi, A., & Jha, B. (2021). *Actinobacteria in natural products research: Progress and prospects*. Microbiological Research 246: 126708.
- Kapoor, G., Saigal, S. & Elongavan, A. (2017) *Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians*. Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology 33(3): 300-305
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C., Wass, M. & Sternberg, M. (2015) *The PyMol web portal for protein modeling, prediction and analysis*. Nature Protocols 10: 845-858.
- Kenshole, E., Herisse, M., Michael, M., & Pidot, S. J. (2021). *Natural product discovery through microbial genome mining*. Current Opinion in Chemical Biology, 60, 47–54.

- Khare, E., Mishra, J. & Arorsa, N. K. (2018) *Multifaceted Interactions Between Endophytes and Plant: Developments and Prospects*. *Frontiers in Microbiology* 9: 2732.
- Knerr, P. J. & Van der Donk, W. (2012) *Discovery, Biosynthesis and Engineering of Lantipeptides*. *Annual Review of Biochemistry* 81: 479-505.
- Komaki, H., Hosoyama, A., et al. (2020) *Classification of Streptomyces hyalinum Hamada nad Yokoyama as Embleya hyalina sp. nov, the second species in the genus Embleya, and emendation of the genus Embleya*. *International Journal of Systematic and Evolutionary* 70(3): 1591-1595.
- Kon, K. & Rai, M. (2016) *Antibiotic Resistance: Mechanisms and New Antimicrobial Approaches*. London: Elsevier. 397 p.
- Lagedroste, M. et al. (2020) *A Structural View on the Maturation of Lanthipeptides*. *Frontiers in Microbiology*, 11: 1183.
- Lee, N., Hwang, S., Kim, J., Cho, S., Palsson, B. & Cho, B. (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.
- Lewis, K. *Recover the lost art of drug discovery*. *Nature* **485**, 439–440 (2012).
- Liu, R., Zhang, Y., Zhai, G., Fu, S., Xia, Y., Hu, B., ... Liu, T. (2020). *A Cell-Free Platform Based on Nisin Biosynthesis for Discovering Novel Lanthipeptides and Guiding their Overproduction In Vivo*. *Advanced Science*, 2001616.
- Lovett, S. t., Glukman, T., Simon, P., Sutura, V. & Drapkin, P. (1994) *Recombination between repeats in Escherichia coli by a recA-independent, promimuty-sensitive mechanism*. *Molecular General Genetics* 245: 294-300.
- Ma, H., Gao, Y., Zhao, F., Wang, J., Teng, J. & Teng, K. & Zhang, J. (2014) *Dissecting the catalytic and substrate binding activity of a class II lanthipeptide synthetase BovM*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 450: 1126-1132.
- Madeira, F., Park, J. M., et al. (2019) *The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019*. *Europe PMC* 47(W1): W636-W641.
- Merwin, N. J., Mousa, W. K., et al. (2019) *DeepRiPP integrates multiomics data to automate discovery of novel ribosomally synthesized natural products*. *PNAS* 117(1): 371-380
- Miller, B., Gulick, A. (2017) *Structural Biology of Non-Ribosomal Peptide Synthetases*. *Methods of Molecular Biology* 1401: 3-29.
- Montalbán-López, M., Van Heel, A. & Kuipers, O. (2016) *Employing the promiscuity of lantibiotic biosynthetic machineries to produce novel antimicrobials*. *FEMS Microbiology reviews* 41: 5-18.
- Montalbán-López, M., Zhou, L., Buivydas, A., Van Heel, A. & Kuipers, O. (2012). *Increasing the success rate of lantibiotic drug discovery by Synthetic Biology*. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 7:8, 695-709.
- Mu, D. (2015). *Combinatorial approaches for introducing additional modifications into lantibiotics*. [Groningen]: University of Groningen.

- Nagao, J., Morinaga, Y., Islam, M. R., Asaduzzaman, S. M., Aso, Y., Nakayama, J., & Sonomoto, K. (2009). *Mapping and identification of the region and secondary structure required for the maturation of the nukacin ISK-1 prepeptide*. *Peptides*, 30(8), 1412–1420.
- Nakashima, N., Mitani, Y. & Tamura, T. (2005) *Actinomycetes as host cells for production of recombinant proteins*. *Microbial Cell Factories* 4:7.
- Nelson, D.W., Moore, J.E. & Rao, (2019) *Antimicrobial resistance (AMR): significance to food quality and safety*. *Food Quality and Safety* 3: 15-22.
- Newman, D.J. & Cragg, G.M., *Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019*. *Journal of Natural Products* 83: 770-803.
- Nishie, M., Sasaki, M., Nagao, J., Zendo, T., Nakayama, J. & Sonomoto, K. (2011) *Lantibiotic Transporter Requires Cooperative Functioning of the Peptidase Domain and the ATP Binding Domain*. *Journal of Biological Chemistry* 186(13): 11163-11169.
- O’neill, J. (2016) *Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations*. Review in Antimicrobial Resistance. Wellcome Trust 76 p.
- O’Rourke, S., Widdick, D. & Bibb, M. (2017) *A novel mechanism of immunity controls the onset of cinnamycin biosynthesis in Streptomyces cinnamoneus DSM 40646*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 44: 563–572.
- Okeley, N., Paul, M., Stasser, J., Blackburn, N. & Van der Donk, W. A. (2003) *SpaC and NisC, the Cyclases Involved in Subtilin and Nisin Biosynthesis, Are Zinc Proteins*. *Biochemistry* 42: 13613-13624.
- Okesli, A., Cooper, L. E., Fogle, E. J. & Van der Donk, W. (2011) *Nine Post-translational Modifications during the Biosynthesis of Cinnamycin*. *Journal of the American Chemical Society* 133: 13753-13760.
- Oman, T., et al. (2012) *An engineered lantibiotic Synthetase That Does Not Require a Leader Peptide on Its Substrate*. *Journal of American Chemical Society* 134(16): 6952-6955.
- Poorinmohammad, N., Bagheban-Shemirani, R. & Hamedi, J. *Genome mining for ribosomally synthesised and post-translationally modified peptides (RiPPs) reveals undiscovered bioactive potentials of actinobacteria*. *Antonie van Leeuwenhoek* 112, 1477–1499 (2019).
- Ren, H., Shi, C., Bothwell, I. R., Van der Donk, W. A. & Zhao, H. (2020) *Discovery and Characterization of a Class IV Lanthipeptide with Non-Overlapping Ring Pattern*. *ACS Chemical Biology* 15: 1642-1649.
- Repka, L. M., Chekan, J., Nair, S. & Van der Donk, W. (2017) *Mechanistic Understanding of Lanthipeptide Biosynthetic Enzymes*. *Chemical Reviews* 117: 5457-5520.
- Reuter, J. S., & Mathews, D. H. (2010). *RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis*. *BMC Bioinformatics*. 11:129.
- Ríos, et al. (2016) *Alternatives to overcoming bacterial resistances: State-of-the-art*. *Microbiological Research* 191: 51-80.

- Rodríguez-Peña, K., Macías-Rubalcava ML, Rocha-Zavaleta, L., Trenado-Uribe, M., Rodríguez-Sanoja, R., Sánchez, S. (2018) *Streptomyces scabrisporus*, an endophyte isolated from *Amphipterygium adstringens* as producer of an anthracycline active against different cancer cell lines. *Global Drugs Therapeutics* 3(5): 1-10.
- Rucket, C., Albersmeier, A., et al. (2015) *Complete genome sequence of Streptomyces lividans TK24*. *Journal of Biotechnology* 10(199): 21-22.
- Safder, I. & Islam, A. (2017) *Antimicrobial peptides: Therapeutic potential as an alternative to conventional antibiotics*. *Journal of Innovation in Pharmaceutical and Biological Sciences* 4(1): 25-32.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning a laboratory manual*. Vol. 3: 614.
- Schägger, H. (2006). *Tricine-SDS-PAGE*. *Nature Protocols* 1(1): 16-23.
- Simons, A., Alhanout, K. & Duval, R. (2020) *Bacteriocins, Antimicrobial Peptides from Bacterial Origin: Overview of Their Biology and Their Impact against Multidrug-Resistant Bacteria*. *Microorganisms* 8: 639-670.
- Singh, M., Kumar, A., Singh, R. & Pandey, K. (2017) *Endophytic bacteria: a new source of bioactive compounds*. *Biotech* 7: 315.
- Skinnider, M., Johnston, C. W., Gunabalasingam, M., et al. (2020) *Comprehensive prediction of secondary metabolite structure and biological activity from microbial genome sequences*. *Nature communications* 11: 6058.
- Sorokina, M. & Steinbeck, C. (2020) *Review on natural products databases: where to find data in 2020*. *Journal of Cheminformatics* 12: 20-71.
- Takano, E., White, J., Thompson, C. & Bibb, M. (1995) *Construction of thiostrepton-inducible, high-copy-number expression vectors for use in Streptomyces spp.* *Gene* 166: 133-137.
- Van der Donk, W. & Nair, S. (2014) *Structure and mechanism of lanthipeptide biosynthetic enzymes*. *Current Opinion in Structural Biology* 29: 58-66.
- Van Heel, A., de Jong, A., Chunxu, C., Viel, J. & Kok, J. & Kuipers, O. (2018) *BAGEL4: a user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins*. *Nucleic Acids Research* 46(W1): W278-W281.
- Van Tyne, D., Martin, M. J. & Gilmore, M. S. (2013) *Structure, Function, and Biology of the Enterococcus faecalis Cytolysin*. *Toxins* 5: 895-911.
- Vázquez-Martínez, M. (2017) *Minería genómica de una cepa de Streptomyces sp. aislada del cuachalalate: Alternativa para la búsqueda de nuevos compuestos con actividad farmacéutica* (Tesis de Maestría) UNAM. México.
- Wass, MN., Kelley, L.A. & Sternberg MJ. (2010) *3D LigandSite: predicting ligand-binding sites using similar structures*. *NAR* 38: W469-W473.
- Widdick, D. A., et al. (2003) *Cloning and engineering of the cinnamycin biosynthetic gene cluster from Streptomyces cinnamoneus cinnamoneus DSM 40005*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(7): 4316-4321.
- Wright, G. D. (2017) *Opportunities for natural products in 21st century antibiotic Discovery*. *Natural Product Reports* 34(7): 694-701.

- Yachdav, G., Kloppmann, A., Kajan, L., *et al.* (2014) *PredictProtein an open resource for online prediction of protein structural and functional features*. *Nucleic acids research* 42 (WebServer issue): W337-W343. doi: 10.1093/nar/gku366
- Yu-Huan, M., Wang, C., Li, Y., *et al.* (2019) *Considerations and Caveats in Combating ESKAPE Pathogens against Nosocomial Infections*. *Advanced science* 7:1901872.
- Zhang, Q., Doroghazi, J. R., Zhao, X., Walker, M. C., & van der Donk, W. A. (2015). *Expanded Natural Product Diversity Revealed by Analysis of Lanthipeptide-Like Gene Clusters in Actinobacteria*. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(13), 4339–4350.

Anexos

Anexo 1: Medios y soluciones

LB

Triptona de caseína 10.0 g/L

NaCl 10.0 g/L

Extracto de levadura 5.0 g/L

Para la preparación de medio LB sólido, agregar 4.5% de agar.

Concentración de antibióticos

Kanamicina 50 µg/mL

Ampicilina 100 µg/mL

Concentración de otros sustratos para selección azul/blanco

Par cada 100 mL de agar LB, agregar las siguientes cantidades a partir de los stocks señalados.

Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 M 100 µL

β-D-galactopiranosido (X-gal) 60 mg/mL 100 µL

Solución I (SET)

Sacarosa	8% (m/v)
Tris-HCl	0.05 M
EDTA	0.05 M pH 8.0

Solución II

SDS	2% (m/v)
NaOH	0.4 N

La solución II se prepara mezclando partes iguales de SDS 2% y NaOH 0.4 N al momento de usar, mezclar con vortex.

Solución III

Acetato de sodio anhídrido 3 M pH 4.8

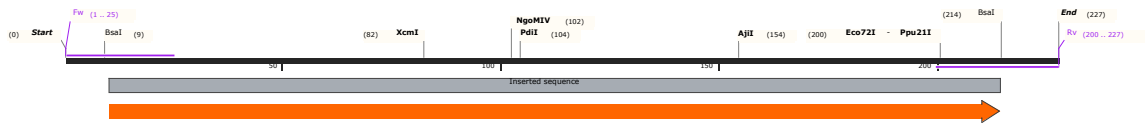
El pH se ajusta con ácido acético glacial

Las soluciones I y III se almacenan a 4 °C

Anexo 2: Condiciones de reacción para la amplificación por PCR del gen *lanA*

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	No. ciclos
Desnaturalización inicial	94	5:00	1
Desnaturalización	94	0:30	25
Alineamiento	57	0:30	
Elongación	72	0:30	
Elongación final	72	1:00	1
Storage	4	∞	1

Anexo 3: Gen *lanA* amplificado con la secuencia de reconocimiento de *Bsal* y los sitios de fusión



Secuencia del amplicón: 227 pb

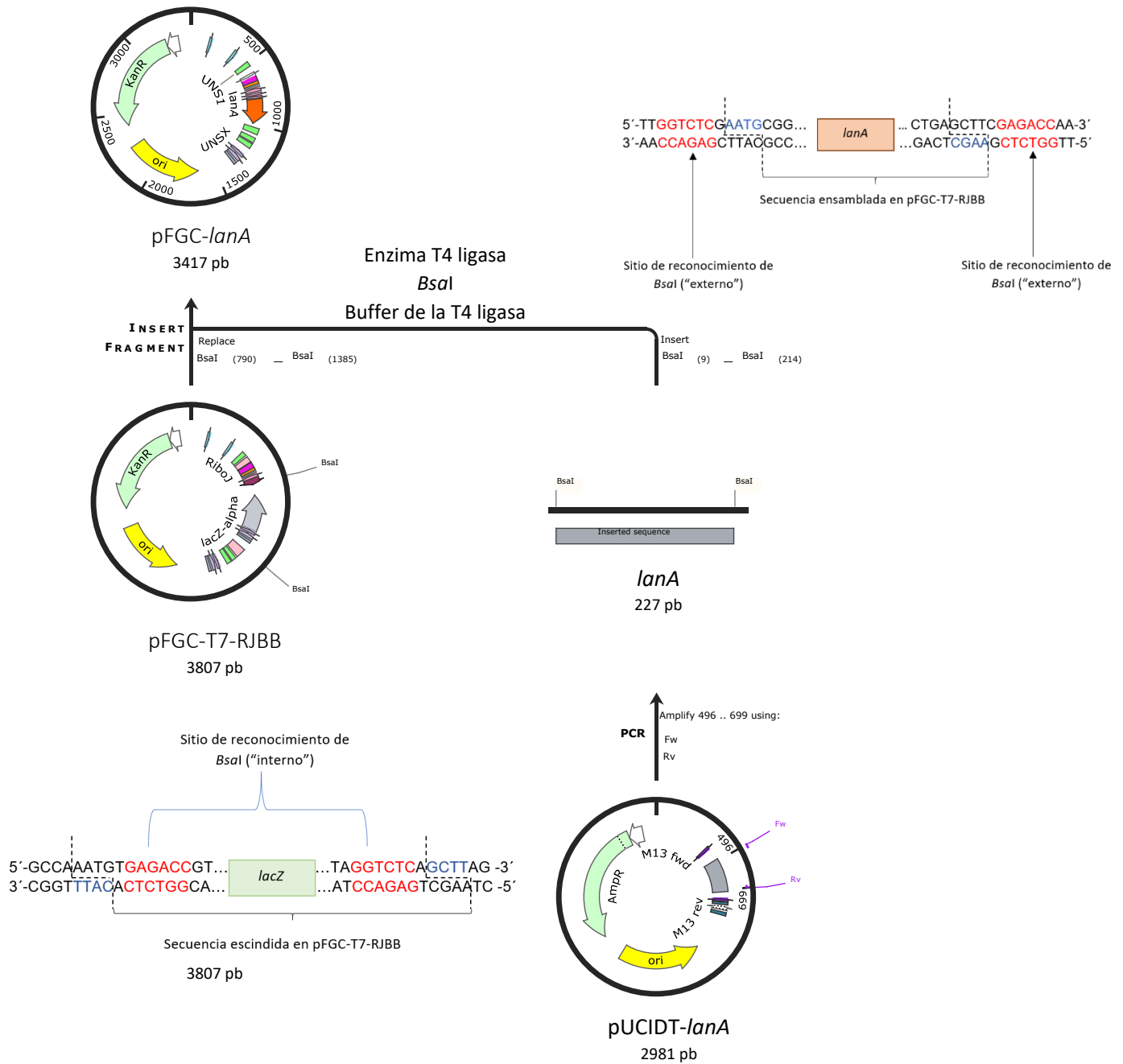
5´ - tt**ggtctc**ga**AT**GCGGACTGCATCCAATGCGACCCGTAACACTGTGGTCGATGCTTGGGAAGCGGTGCGGAAACCACCGATGGGATGGAGAATATAGATGGCCGGCTTTATATAGTGGTTCAGCGACTGAACAAGGTCTGACCGAAATTGACGTGGCTGCAATTAGTTGCGGAACCGCCTGCTCTTGGAGTCGGACACGTGCCTGTTGCTGA**gcttcgagacc**aa -3´

En rojo se muestra en sitio de reconocimiento de *Bsal*; en azul se muestran los sitios de fusión y en mayúsculas se observa la secuencia del gen *lanA*.

Anexo 4: Condiciones para el ensamble Golden Gate

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	No. ciclos
Restricción inicial	37	4:00	1
Restricción	37	2:00	33
Ligación	16	3:00	
Restricción final	37	4:00	1
Inactivación por calor	80	10:00	1
Storage	12	∞	1

Anexo 5: Esquema general del ensamble Golden Gate



Ensamble Golden Gate para obtener la construcción pFGC-*lanA*. Se muestran los sitios de reconocimiento de *BsaI* en rojo; en línea punteada los sitios de corte de la enzima y en azul los sitios de fusión para el ensamble. En la construcción final, los sitios de reconocimiento de *BsaI* se pierden, lo que evita la presencia de transformantes no ligadas.

Anexo 7: Protocolo de extracción de plásmido por lisis alcalina

1. Picar con la punta de un palillo estéril una colonia de bacterias transformantes, inocular en 5 mL de medio LB más antibiótico e incubar a 37 °C toda la noche.
2. Alicuotar en un microtubo, 1.5 mL del cultivo y centrifugar 1 min a máxima velocidad a temperatura ambiente y eliminar el sobrenadante.
3. Re-suspender el pellet en 1 mL de solución SET fría.
4. Centrifugar y eliminar el sobrenadante.
5. Re-suspender el pellet en 150 μ L de SET + 5 μ L de ARNasa, agitando vigorosamente en vórtex.
6. Agregar 350 μ L de la solución II y mezclar por inversión 5-6 veces.
7. Incubar 10 min en hielo.
8. Agregar 250 μ L de la solución III fría, mezclar por inversión.
9. Incubar 15 min en hielo.
10. Centrifugar 10 min a máxima velocidad a temperatura ambiente.
11. Recuperar el sobrenadante por decantación en un tubo nuevo y desechar la pastilla.
12. Agregar 600-800 μ L de isopropanol al tubo con el sobrenadante, agitar por inversión 6 veces.
13. Inmediatamente centrifugar 10 min a máxima velocidad, y eliminar el sobrenadante por decantación.

14. Agregar a la pastilla 1 mL de etanol al 70%, agitar por inversión.
15. Centrifugar 10 min a máxima velocidad y eliminar el sobrenadante por decantación.
16. Secar la pastilla en un concentrador al vacío a temperatura ambiente por 5 minutos.
17. Resuspender el pellet en 50 μ L de TE-8 o en agua MilliQ estéril.

Anexo 8: Preparación rápida de células quimio-competentes de *E. coli*

1. Tomar una colonia de una placa fresca e inocular 5 mL de medio LB en tubos de 16x150 mm e incubar a 37 °C, 300 rpm por 16-20 horas.
2. Tomar 1 mL y re-inocular en 5 mL de LB contenidos en tubos de 16x150 mm e incubar a 37 °C, 300 rpm hasta que la DO₆₀₀ sea de 0.4 – 0.7.
3. Alicuotar 1 mL de cultivo en un microtubo de 1.5 mL.
4. Centrifugar a 14 000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente y desechar el sobrenadante.
5. Disolver la pastilla en 600 µL de CaCl₂ 100 mM frío.
6. Dejar reposar en hielo por 30 min.
7. Centrifugar a 14 000 rpm durante 1 min a 4 °C.
8. Disolver la pastilla en 200 µL de CaCl₂ frío.

Anexo 9. Transformación de las células quimio-competentes

1. Agregar el DNA plasmídico, mezclar gentilmente y dejar reposar en hielo por 10 min.
2. Colocar el tubo en termoblock precalentado a 42 °C durante 2 min.
3. Reposar en hielo de 2 a 5 min.
4. Agregar 1 mL de LB e incubar durante 1h a 37 °C y 300 rpm.
5. Transferir un volumen adecuado de las células transformantes a una caja de LB sólido con antibiótico y esparcir con perlas de vidrio. Agotar todo el volumen de células entre el número total de cajas.
6. Mantener las cajas a temperatura ambiente hasta que el líquido se ha absorbido completamente.
7. Invertir las cajas e incubar a 37 °C. Las colonias transformadas deben aparecer de 12 a 16 horas.

Anexo 10: Soluciones para SDS-PAGE

Buffer de corrida 1x (1 L)

Glicina 14.4 g

Tris 3.02 g

SDS 1.0 g

Ajustar a pH 8.3 con HCl.

Buffer de carga 2x (10 mL)

SDS 10% (m/v) 4 mL

1M Tris HCl pH 6.8 1.2 mL

Azul de bromofenol 1% (m/v) 0.2 mL

Agua MiliQ 2.6 mL

DTT 1 M 2 mL

Para la preparación del gel separador (20 mL)

Reactivo	Porcentaje de acrilamida	
	15 % (m/v)	16 % (m/v)
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	5.2 mL	5.2 mL
SDS 10% (m/v)	200 µL	200 µL
Acrilamida 40% (m/v)	7.5 mL	8 mL
Agua MiliQ	6.88 mL	6.38 mL
PSA 1M	200 µL	200 µL
TEMED	20 µL	20 µL

Para la preparación del gel concentrador (8 mL)

Reactivo	4 % (m/v) Acrilamida
Tris-HCl 1 M pH 6.8	960 μ L
SDS 10% (m/v)	80 μ L
Acrilamida 40% (m/v)	800 μ L
Agua MiliQ	6.072 mL
PSA 1M	80 μ L
TEMED	8 μ L

Tinción con azul de Coomassie

Solución stock I

Azul brillante de Coomassie 0.2 % (m/v)

Etanol 90 % (v/v)

Solución stock II

Ácido acético 20 % (v/v)

Solución de fijación (100 mL)

Etanol 40 mL

Ácido acético glacial 10 mL

Agua destilada 50 mL

Fijar el gel durante 30 minutos

Solución de tinción (100 mL)

Solución stock I	50 mL
Solución stock II	50 mL

Teñir el gel durante 20 minutos

Solución de destinción I

Solución de fijación

Desteñir con esta solución durante 30 segundos.

Solución de destinción II (100 mL)

Etanol	20 mL
Ácido acético glacial	10 mL
Agua destilada	70 mL

Desteñir durante aproximadamente 1 hora.

Al final, realizar dos lavados con agua durante 5 minutos.

Anexo 11: Soluciones para Tris-Tricina-PAGE

Reactivo	Buffer del ánodo 10x	Buffer del cátodo 10x	Buffer del gel 3x
Tris (M)	1.0	1.0	3.0
Tricina (M)	---	1.0	---
SDS (% m/v)	---	1.0	0.3
pH	8.9*	~8.25	8.45*

*Ajustar el pH con HCl concentrado

Buffer de carga A

SDS	12 % (m/v)
Mercaptoetanol	6 % (v/v)
Glicerol	30 % (v/v)
Azul brillante de Coomassie	0.05 % (m/v)
Tris-HCl	150 mM
pH 7.0	

Solución stock AB-6 (acrilamida-bisacrilamida)

Acrilamida	46.5 g
Bisacrilamida	3.0 g

Llevar a volumen de 1 litro y disolver. Posteriormente, es necesario filtrar la solución, previo a su uso.

Para la preparación de los geles

Reactivo	Porcentaje de acrilamida	
	4 % (m/v) (gel concentrador)	16 % (m/v) (gel separador)
AB-6	0.33 mL	3.33 mL
Buffer del gel 3x	1 mL	3.33 mL
Glicerol	---	0.79 mL
Agua cbp	2.637 mL	2.495 mL
PSA 1M	30 μ L	50 μ L
TEMED	3 μ L	5 μ L

Para preparar las muestras se agregan 5 μ L de buffer A a 15 μ L de muestra y calentar a 75 °C durante 5 minutos.

Condiciones de la electroforesis

Paso	
Voltaje inicial	35 V
Voltaje 2	200 V
Voltaje para terminar la corrida	300 V

Anexo 12: Protocolo de purificación de proteínas con afinidad a níquel (Ni-NTA Spin Kit)

Soluciones

Buffer de lisis (NPI-10): NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, pH 8,0

Buffer de lavado (NPI-20): NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM*, pH 8,0

Buffer de elución (NPI-500): NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 500 mM, pH 8,0

*Modificado a 80 mM de imidazol

Procedimiento

1. Equilibrar la columna de centrifugado Ni-NTA con 600 µl de buffer NPI-10. Centrifugar durante 2 min a 890 x g (aprox. 2900 rpm).
2. Cargar hasta 600 µL del lisado aclarado que contiene la proteína etiquetada con 6xHis en la columna giratoria Ni-NTA preequilibrada. Centrifugar durante 5 min a 270 x g (aprox. 1600 rpm) y recolectar el sobrenadante.
3. Lavar la columna de centrifugado Ni-NTA dos veces con 600 µL de buffer NPI-20. Centrifugar durante 2 min a 890 x g (aprox. 2900 rpm). Recolectar los lavados.
4. Eluir la proteína dos veces con 30 µL de buffer NPI-500. Centrifugar durante 2 min a 890 x g (aprox. 2900 rpm) y recolectar el eluido.

Anexo 13: Secuencias de los genes

>*lanA* (propéptido A)

ATGCGCACTGCATCGAATGCCACGCGGAACACCGTCGTCGACGCCTGGCGCTCCGG
CGCCGAAACGACCGACGGCATGGAAAACCCCGCCGGTTCGCTCTACATCGGCGGAT
CCGCCACGGAACAGGGCCTCACCGAGATCGACGTCGCGGGCGATCAGCTGCGGCAC
CGCCTGTTCTGGTTCGCGCACCCGCGCCTGTTGCTGA

>*lanA* (propéptido B)

GTGGAAAACCGGCCGGTTCGACGCGTCGAGGGGGCGCATCGACCACCATCGGTTCGC
CCGCCCGACCGCGCGCGAACCCTCGATTACGGCCTGGGAGTGGAGAATTCGCCTC
GTGCGCGGGAAGTCTGTGCGCGACGACATTCGGACGCTAACGTGTGCCTGCCGCAC
TTCCCTCACCCAGGGTTCGATGA

>*lanM*

GTGGTTCGCGCACCCGCGCCTGTTGCTGACCGAAGCTCACCGGCCCGCCGTCCGGC
GCCGATCGTTGCGTCGATCGGTGTCTGGGCGGCGGGTCCGTCTCGATGGGTGGCGAT
CCGCAGATGGCGATTCCGGTCCGGCCGCGTCCCGTGGTGTGAGCTACGACGACGCGG
GTGAGTTCGACACCGCGTTCGAGCCGCTGATCGGCCCCGCCCTGAACCGCTTTCGG
CGCCGATTGCGCGCCGTGCCGGACCCGCTGTGACCACCGAGCGGGAGATCCTGC
TGCGCGCCGCCGACGCGCCCTGCTGGAGACCGTGCGCCCAAGGCCAACCGACT
GCTGCTGCTGGAAGTGCACGCGGCCCGGATGTCCGGCCGGCTCACCCGCGCGACC
AGCGAGCAACGCTGGCTCGAATTCCTCGAACACGCCGCCGAGCCCGGGTTCTGGAG
CGAACTCGACGTCGACTATCCCGCGTTCGCACCGCGGCTGGACCGGGTGATCCGCA
ATCGGTGCACGGCGCTGCTCACTCTGGCCCGCCGCATCGCCGCCGATCGCGACCG
GCTCACCGACCTGCTCGGCACACGCCCCGGCGAACTCGTCGAGATCGGCACGGACG
CGGGCGACTCGCACCGCGGGCGGCCGTACCGTGGCCCTGCTCCGCTTCGAGGCCGG
CCGCGTGGTGTACAAACCCCGCGCACTCGACGTGGACGTCGCCCTCGCCACCACCG
TGGACACCCTCCTGGCGCACGTCCCGCGCGAGGAACGCATCGCGGTCCCCGGGT
ATTGCTCGGTGGCGAGTACGGCTGGGCCGAATACGTCGAACACCGCTACTGCGCCG

ACGCCGCCGAACGGTCCCGTTTCTACCGCGGCCTCGGCGAATGGATGTGCGTCGTG
CAACTGCTGGGCGGCACCGACCTGCACTCGGAGAACGTGATCGCGTGCGGCCCCCGT
CCCGTGGGTGGTGGACTGCGAGACCCTGTTTCAGCCCCGAACCCCGGGTTCGGCGCG
AGCGGACTCGGCGATGCCTTCGACACCGCCGCCGCTCGGTCCGGCGCACCGTGC
TGCGCACCGGCCTGTTGCCGATGCGCCTGGGCCAACTCGCGCTGCAGGGCGTGGA
CATGTCCGCGGTTCGGTGCCCTTCCCGACCAGCAACCGCGCGTCCCGGTGCCGGTGA
TCACCGGCGCCGGCACCGATCTGGCCCGGCTCACGATGGAGCCCGCCGACGTTCG
CGGATCGGCCAACCTGCCCGCCCCGACGCCGATCCGCTCGCCCATCAGGACGACA
TCGTGCACGGCTATCGCGACCTGCGCGCCCCGCTGGACGGACGCGACGCGGCCGG
GCGACTGCGGCCGATGCTCGACGTGTTTCGCCGGTGTGAGCTGCGGGTGGTGTTCG
GCCCCACCCAGGTCTACGTGAGATCGCCCGGATGCTCTGGCATCCCGCGTCGCTG
CACGAGGAGGGCCCGGCCGTCGAGCGCGCGGGGATGTGCTGATCCGCCAGGCGA
AGGCGCTGCACGGCGCCCCCGACACGCCCGAGGTGGTCGGCGCGGAGGTTCGCCGA
TCTCCTCGACGGCGACATCCCGTTCTTCGGCGTCCGGCCCGAGCGGGGGCGGATGA
CCGGACCACGCGGCACCGAATGGGGCGATCCCGCACACCTGATCGACGAGAGCCTC
GACCGCTGGCGGGCCGGAGACCCGGAGTTCGAGGAGGTGATGATCCGCTCCTCGC
TGCTCGGCGTCTACCGCGACCGCAGCGCGATGCCCGAGGGGGAACGACACCGCGA
GGTTCGAGTACGACACGACGAGCGGGAGGAGCGCCGGCGCGCCCTCGCCGCCGAA
GCGGCGCGCGACCTGTGCGCCCGGGCCGTGGTCGGCGCGGACGGGACGGCCACC
TGGATCGGGCCGGTGTACACCGACAGCGGCTTCAACGTACGCCGTTTCGCCGCCGA
CCTGTACAGCGGACAGGCCGGCGTCGCACTGGCCCTGCGCGCGTATCTGACCGAGT
CCCGCGCGGGCCGGGTGCCGATCGTGGACGGGCTGCCGGCGCTCACCGAGGGGG
CGATCCGGGCACTGGCGGCCATGGAGGACGCGGTACCCACCGCCCGGATCGGCGC
GTTTCGACGGGATCGGCGCGGCGGTCCGCACCTGGCTGGCCCTGCACACCGCGTCG
GGCCGGCCGACCGACCTGGACCGGGCGATCCGACACGCCGAGCGCGCACCGGGC
CTGCTGGCCGAGGACACCATCCTCGACCTGGCCGGCGGCGCCGCCGGATCGATCG
TGCCGATGCTCGCCCTGGCCGACCGTACCGGCGACCGCCGTTGGCGCGACGTTCG
CGAATCCGCCGCGGAACTGCTCGGGCGACGCGCGGTTCGTCGAGGAGGACTCCCTC
GGCCGACGCACCGCCCGCTGGCCGACCGTACTCTTCCCGACGGCATCGGCGGCTT
CGCGCACGGCGCCGCGGGCATCGCCTGGGCCCTGACCCGACTGGGCTTGGCCGCG
AGCCGGCCGAAGTGGTTCGAACTCGCGGATCTGGCATGGGCGTTCAGGAAGCCCT
GTACGACCCGAAGGTGCGCGGCTGGCTCGACGGCCGACAGCGGGACGAGGTCTG
TTCCTCGACTCGTGGTGCCACGGCAGCACCGGCATCGGCCTGGCCGGTGGGACCT
GTACCGGCGCACCGGGCGCCCCGAGCAGCTCGACCGGGCCCTGCGCGCGGCGGC

CGCGACCTGGCGCACCGGCTTCGGCTGGGACTACACGCTGTGCCACGGCGACCTG
GGCTCGTGGGAACTCCTGGACACCCTGCTGCGCGGCGCCCCGAGCAGCTTCGATC
CCATCTGCGGAACGCCCCACCGCGAGCGGCTGGACGCGCTCCTGCTCACCGGG
CTCGAAACCTACGGCCCGCACACCCCGTCCACTCGGCACACCACCACGGCATCCCT
GCTCCCGGGCAGCGCGGGCGCCCTGCACCAACTCCTGCGCATGCACCCGACGAGC
GCGGACCGCCCGTCGTCACTGCTGCTCCTGGACGAACTCTGA