

CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DEL GEN *lanA* DE UN CLÚSTER PARA LA PRODUCCIÓN DE UN LANTIPÉPTIDO BACTERIANO

Susana Elena Barrera Gutiérrez, Beatriz Ruiz Villafán, Sergio Sánchez, Depto. Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, CDMX, C.P. 04510, suelenbarrera@gmail.com

Palabras clave: RiPPs, lantipéptidos, Streptomyces.

Introducción. El descubrimiento de nuevas cepas productoras de segundos metabolitos con actividad antimicrobiana promete una solución al problema de resistencia a antibióticos, ya que es posible descubrir nuevas alternativas de antimicrobianos. Dentro de estos productos naturales se encuentran los lantipéptidos, un tipo de RiPPs policíclicos que contienen puentes tioéter denominados lantioninas, que en general han presentado actividad contra algunas bacterias Gram positivas y negativas, al inhibir la biosíntesis de la pared celular y alterar la integridad de la membrana mediante la formación de poros. Típicamente el clúster para la síntesis de un lantipéptido está conformado por el gen *lanA* que codifica para el péptido precursor y los genes *lanB* y *lanC* que codifican para las enzimas que catalizan la deshidratación y la formación de anillos tioéter, respectivamente.

El objetivo del proyecto es clonar y expresar el gen *lanA* que codifica para el péptido precursor de un lantipéptido de clase I de la cepa *Streptomyces thermocarboxydus* K155.

Metodología. Se realizó un análisis bioinformático del clúster de genes biosintéticos correspondientes al lantipéptido de clase I de *S. thermocarboxydus* K155, para corroborar su función putativa mediante su modelado y por alineamientos locales múltiples de los genes involucrados. El gen *lanA* fue optimizado para su expresión en *Escherichia coli* y clonado en el vector de expresión pRSFDuet-1 empleando los sitios de restricción *EcoRI* y *HindIII*. La construcción se transformó por electroporación en las cepas de expresión de *E. coli* (BL21 (DE3), pLysS y Rosetta) y se realizarán ensayos de expresión variando el tiempo de inducción (0 h, 1 h, 4 h y overnight) con IPTG 1mM.

Resultados. El análisis bioinformático con el programa en línea anti-SMASH indicó que la región 2 del genoma de *S. thermocarboxydus* K155 produce un lantipéptido de clase I. El clúster del metabolito esta formado por los 3 genes biosintéticos *lanA*, *lanB* y *lanC*. Por alineamiento con genes ortólogos, se confirmó la conservación de los aminoácidos del sitio catalítico de las enzimas LanB y LanC. Como primer paso para la producción heteróloga del lantipéptido de clase I, se clonó el gen *lanA* que codifica para el péptido

precursor. Para la clonación y expresión del gen *lanA* en *E. coli*, se sintetizó el gen con una optimización de codones y se le agregó un sitio de corte de la proteasa Furin para que después se pueda cortar el péptido líder. Se decidió expresar el gen *lanA* usando el vector pRSFDuet-1, que tiene dos sitios de clonación. El gen *lanA* se clonó en el primer sitio de clonación para su expresión fusionado a un tallo de histidinas en su extremo amino terminal. La construcción pRSFDuet-1+*lanA* se transformó en las cepas de expresión de *E. coli* BL21 (DE3), BL21-pLysS y Rosetta. Hasta el momento se ha realizado el ensayo de expresión en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) a una concentración de IPTG 1 mM con tiempos de inducción de 0, 1, 4, y 18 horas, a 37°C; sin embargo, no se ha identificado la banda correspondiente a 6XHis-LanA en los ensayos de western blot. Se realizará este mismo ensayo en las cepas restantes.

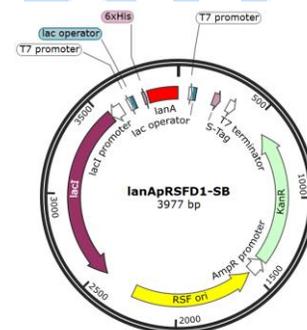


Fig. 1. Construcción pRSFDuet-1 + *lanA*.

Conclusiones. Se clonó el gen *lanA* optimizado para *E. coli* en el vector de expresión pRSFDuet-1, sin embargo, no se identificó su expresión en la cepa *E. coli* BL21 (DE3).

Agradecimiento. Los autores agradecen al CONACYT por la beca a la alumna de licenciatura y el apoyo al proyecto PAPIIT IN205922

Bibliografía.

- Hutchings, M. I., Truman, A. W., y Wilkinson, B. (2019) Current opinion in microbiology, 51, 72-80.
- Van der Donk, W. y Nair, S. (2014) Current Opinion in Structural Biology 29: 58-66.
- Knerr P.J. y Van der Donk W.A. (2012) Annual Review of Biochemistry, 81:479-505