



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

MINERÍA GENÓMICA DE UNA CEPA DE *Streptomyces* sp., AISLADA DEL
CUACHALALATE: ALTERNATIVA PARA LA BÚSQUEDA DE NUEVOS
COMPUESTOS CON ACTIVIDAD FARMACÉUTICA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
MELISSA VÁZQUEZ HERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL
SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. AMELIA FARRÉS GONZÁLEZ-SARAVIA
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM
DR. JOSÉ ADELFO ESCALANTE LOZADA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

Ciudad de México. Octubre, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	2
Antecedentes	3
1. Productos naturales	4
1.1 Origen de productos naturales	5
1.1.1 Endófitos de plantas	6
1.1.1.1 Actinobacteria	8
1.2 Descubrimiento de nuevos productos naturales	10
1.2.1 Clústeres de genes biosintéticos	11
1.2.2 Minería genómica	12
1.2.2.1 Herramientas bioinformáticas	13
1.2.2.2 Expresión de clústeres de genes biosintéticos	16
Antecedentes inmediatos	19
Justificación	20
Hipótesis	20
Objetivos	20
Metodología	21
a. Cultivo de las cepas <i>Streptomyces</i> spp. aisladas de <i>A. adstringens</i> .	21
b. Ensayo de antibiosis	22
c. Extracción de DNA genómico y secuenciación.	23
d. Ensamble y anotación	24
e. Comparación genómica de las cepas	24
f. Búsqueda y análisis de clústeres de genes biosintéticos	25
g. Expresión heteróloga del clúster de interés	25
l. Clonación en <i>Escherichia coli</i> DH5α con el plásmido pET22b	26

II.	Expresión en <i>E. coli</i> BL21 (DE3) y <i>E. coli</i> ROSETTA	30
h.	Evaluación de la actividad del producto obtenido	32
I.	Zimogramas	32
II.	Actividad de glucoaminidasa	33
2.	Resultados y Discusión	35
a.	Cultivo de las cepas <i>Streptomyces</i> spp. aisladas de <i>A. adstringens</i> .	35
b.	Ensayo de la antibiosis de la cepa L06	35
c.	Aislamiento de DNA genómico y secuenciación de las muestras	36
d.	Ensamble y anotación	37
e.	Comparación genómica de las cepas	39
f.	Búsqueda y análisis de clústeres de genes biosintéticos	42
g.	Expresión heteróloga del clúster 19 de <i>S. champavatii</i> L06	53
I.	Clonación del gen de la bacteriocina del clúster 19 de <i>S. champavatii</i> L06	53
II.	Expresión de la bacteriocina (pET22b-bact2)	58
h.	Evaluación de la actividad del producto obtenido	61
I.	Zimogramas	61
II.	Actividad de peptidoglucano hidrolasa (PGH) utilizando 4-Nitrofenil N-acetil- β - D-glucosamina	63
	Conclusiones	67
	Prospectivas	68
	Referencias	69
	Anexos	88
	Anexo 1: Medios de cultivo	88
	Anexo 2: Protocolo de extracción de DNA para <i>Streptomyces champavatii</i> L06	91

Anexo 3: Protocolo de extracción de DNA para <i>Streptomyces scabrisporus</i> NF3	92
Anexo 4: Mapa del plásmido pET-22b (+)	93
Anexo 5: Condiciones térmicas de la PCR para la amplificación	94
Anexo 6: Preparación de células electro-competentes	95
Anexo 7: Protocolo de extracción de plásmido	96
Anexo 8: Protocolo de sonicación para células de <i>E. coli</i>	97
Anexo 9: Protocolo para Western-Blot	98
Anexo 10: Secuencias de DNA del gel 16S ribosomal	99
Anexo 11: Secuencias de aminoácidos de Bacteriocinas tipo III encontradas en las cepas de <i>Streptomyces</i> L06 y NF3	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Cronograma de descubrimiento de antibióticos y del desarrollo de resistencia a éstos.	4
2	Interacción planta-endófitos	7
3	Ecología de los actinobacterias	8
4	Técnicas para el descubrimiento de productos naturales	10
5	Ejemplificación del tamaño de diferentes clústeres de genes biosintéticos	12
6	Minería genómica	13
7	Porcentaje de BGCs identificados por antiSMASH	15
8	Pasos importantes para la expresión heteróloga.	17
9	Diagrama experimental	21
10	Modelo para el ensayo de antibiosis	23
11	Cultivo de cepas aisladas del Cuachalalate en medio YMG	35
12	Ensayo de antibiosis con <i>Streptomyces</i> L06	35
13	Gel de electroforesis de DNA de las muestras enviadas a secuenciar a la Universidad de Yale y su calidad	36
14	Resultados del alineamiento de las secuencias de los genes 16S rRNA de ambas cepas	37
15	Diagrama de Venn de las familias de genes ortólogos encontrados por PATRIC	39
16	Comparación del proteoma	40
17	Comparación del número de genes pertenecientes a un grupo de vías metabólicas	42
18	Clústeres de genes predichos para la producción de metabolitos secundarios	43

19	Representación esquemática de los cromosomas y localización de los metabolitos secundarios encontrados	44
20	Clústeres de genes para la síntesis de bacteriocinas tipo III	46
21	Dominios catalíticos y de unión	49
22	Alineamiento múltiple de las bacteriolisinas	51
23	Diagrama circos de las bacteriolisinas	52
24	Representación gráfica del Clúster 19 de <i>Streptomyces</i> sp. L06	53
25	Construcción pET-22b-B	54
26	Electroforesis de las amplificaciones por PCR	55
27	Construcción pET-22b-B1	56
28	Alineamiento de las secuencias de bacteriocina tipo III con diferentes anotaciones.	56
29	Predicción del péptido señal con SignalP	57
30	PCR del gen de la bacteriocina de 1200 bp	58
31	Comprobación de la construcción pET-22b-B2	58
32	Western Blot de la expresión de pET-22B-B2 en <i>E. coli</i> BL21 a 30°C después de la inducción con IPTG	59
33	Expresión de la bacteriocina en <i>E. coli</i> ROSETTA pET-22b-B2.	60
34	Western-Blot de la expresión de la bacteriocina en <i>E. coli</i> ROSETTA pETt-22b-B2.	60
35	Análisis de dominios transmembranales por el servidor informático TMHMM.	61
36	Zimograma de la actividad lítica de la bacteriocina contra <i>M. luteus</i>	62
37	Actividad de peptidoglucano hidrolasa (PGH) utilizando 4-nitrofenol N-acetil- β -D-glucosamina	64
38	Sitios de corte de las peptidoglucano hidrolasas	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Comparación entre diferentes hospederos heterólogos para la síntesis de productos naturales bacterianos	18
2	Cepas utilizadas	22
3	Cebadores utilizados para la amplificación por PCR	27
4	Cantidades de reactivos para las restricciones enzimáticas	28
5	Concentraciones de reactivos para la ligación	29
6	Resumen del ensamble y la anotación de los genomas de <i>Streptomyces</i> sp. L06 y <i>Streptomyces scabrisporus</i> NF3	38
7	Clústeres de genes predichos por BAGEL3 para la producción de bacteriocinas	49
8	Zimogramas de peptidoglucano hidrolasas contra diferentes microorganismos	62

TABLA DE ABREVIATURAS

BGC	Clúster de genes biosintéticos
µL	Microlitro
mL	Mililitro
NRPS	Sintasa de péptidos no ribosomales
PKS	Policétido-sintasa
O/N	Toda la noche
Min	Minuto
Rpm	Revoluciones por minuto
Nm	Nanómetros
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosid
Mm	Milímetro
Mb	Megabase
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
OGF	Familia de genes ortólogos
aa	Aminoácido
NAG	Ácido N-acetilglucosamina
NAM	Ácido N-acetilmurámico
TEMED	Tetrametiendiamina

RESUMEN

Actualmente la resistencia a los antibióticos por microorganismos nos ha obligado a buscar nuevas estrategias para el descubrimiento de moléculas bioactivas. La minería genómica ha demostrado ser una herramienta útil en la búsqueda de nuevos metabolitos secundarios con actividades de interés farmacéutico. Las actinobacterias endófitas de plantas representan un excelente blanco para la aplicación de esta estrategia debido a su gran potencial para producir metabolitos con aplicaciones farmacéuticas. En el presente trabajo se utilizaron dos cepas de *Streptomyces* aisladas previamente del árbol del Cuachalalate. El objetivo del presente trabajo fue aplicar la técnica de minería genómica a uno de los *Streptomyces* aislados. Mediante la secuenciación del gen 16S rRNA los actinomicetos se identificaron como *Streptomyces champavatii* L06 y *Streptomyces scabrissporus* NF3. Se secuenciaron los genomas y se ensamblaron en 13 y 8 scaffolds respectivamente y fueron anotados mediante herramientas bioinformáticas. Se encontraron 53 clústeres de genes biosintéticos en la cepa NF3 y 23 en la cepa L06. Debido al interés en encontrar moléculas antibióticas el trabajo se enfocó en bacteriocinas tipo III, conocidas también como bacteriolisinas o peptidoglucano hidrolasas. Se encontraron 6 clústeres para la síntesis de estas moléculas en ambos genomas; de estos clústeres, el número 19 de *S. champavatii* L06 fue seleccionado. Se llevó a cabo la expresión heteróloga del gen de bacteriolisina en *Escherichia coli* ROSETTA (DE3), a la cual se ha denominado “Champamicina”. Por medio de la técnica de Western-Blot se detectó la expresión de la proteína en la fracción no soluble del lisado celular. Mediante zimogramas se pudo comprobar la actividad lítica contra 8 bacterias entre ellas *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, y contra la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Se probó su actividad como glucosaminidasa por medio de una técnica colorimétrica. Esta es la primera bacteriocina tipo III identificada de *Streptomyces* con potencial actividad antimicrobiana. Este estudio confirma la utilidad de la minería genómica en el descubrimiento de nuevas moléculas con potencial farmacéutico como la bacteriocina producida en este trabajo, obtenidas de microorganismos aislados de ambientes no convencionales como los endófitos de plantas.

ABSTRACT

In the last years, an increasing pathogens resistance to antibiotics has lead us to the use of new techniques to discover new bioactive molecules. Genome mining has proven to be a useful tool for the search of new secondary metabolites with activity of pharmacological interest. Endophytic actinobacteria are an excellent target for the application of this strategy for their immense potential to produce secondary metabolites. In this work, two *Streptomyces* strains isolated from the “Cuachalalate” tree were used. The objective was to apply the genome mining technique to one of the *Streptomyces* isolated. The used actinobacteria were identified by 16S rRNA gene as *Streptomyces champavatii* L06 and *Streptomyces scabrisporus* NF3. In this work the genomes were sequenced, assembled and annotated so they could be analyzed using bioinformatic tools. 53 biosynthetic gene clusters were found in the NF3 strain, while 23 were found in the L06 strain. Since the interest was to find new antibiotic molecules, this work focused in type III bacteriocins, also known as bacteriolysins or peptidoglycan hydrolases. 6 clusters were found for the synthesis of this molecules between both genomes. For its novelty, cluster 19 of L06 strain was chosen, from which the bacteriolysin gene was expressed and named “Champamycin”. The gene was expressed in the heterologous host *Escherichia coli* Rosetta (DE3) within the pET22b plasmid. Using the Western-Blotting technique the expression of the protein was detected in the insoluble fraction for the cellular lysate. Through zymograms the lytic activity against 8 bacteria, including *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*, and against *Saccharomyces cerevisiae*, was proven. The activity of glucosaminidase was tested through a colorimetric technique. This is the first type III bacteriocin identified of *Streptomyces* with potential antibiotic activity. The study confirms the utility of genome mining for the discovery of new molecules with pharmaceutical potential as this bacteriocin. Besides its application in soil and water microorganisms, the technique offers great perspectives for its use in microorganism isolated from no conventional environments like the plant endophytes.

ANTECEDENTES

Uno de los mayores problemas a los que nos enfrentamos hoy en día es la creciente resistencia a antibióticos que diferentes microorganismos están desarrollando. Para microorganismos multi-resistentes hay pocas terapias efectivas y pocos antibióticos nuevos o probados. El problema aumentará tanto que se espera que la muerte por la resistencia a antibióticos aumente de 700,000 de personas anualmente a 1 millón en el 2050 (Kolter & van Wezel, 2016).

La resistencia de patógenos importantes a las terapias antimicrobianas comunes y el surgimiento de bacterias multi-resistentes están aumentando de manera alarmante. El abuso de antibióticos en humanos, animales y la agricultura han generado situaciones de emergencia en el campo de la salud y un gran impacto socio-económico (Brown and Wright, 2016; Chaudhary, 2016). Desafortunadamente, acompañando el incremento de la resistencia a antibióticos se encuentra la disminución en el descubrimiento de nuevos antimicrobianos.

Entre los patógenos *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y especies de *Enterobacter* conocidos como ESKAPE se encuentran especies multirresistentes como *Staphylococcus aureus* multirresistente a meticilina (MRSA, por sus siglas en inglés) y *Klebsiella* ST258 (Moloney, 2016). La última línea de defensa contra estos es la colistina, sin embargo falta poco para que ya no sea útil (Kealey *et al.*, 2017).

Los antibióticos de última generación son moléculas modificadas sintéticamente basadas en antibióticos previamente utilizados, así como nuevas dosis de viejos antibióticos utilizados hoy en día. Una terapia alternativa a las actuales es el uso combiando de antibióticos los cuales se usan en dosis reducidas, disminuyendo el riesgo de resistencia y los efectos secundarios (Fernandes and Martens, 2017).

Sin embargo, muchos de los nuevos compuestos son rápidamente obsoletos por la adquisición de resistencia también a ellos. Como se muestra en la Figura 1, la resistencia se genera rápidamente después de la introducción del antibiótico

(Scheffler *et al.*, 2013). La búsqueda de compuestos nuevos, así como el uso de nuevas herramientas para producirlos se ha vuelto necesaria.

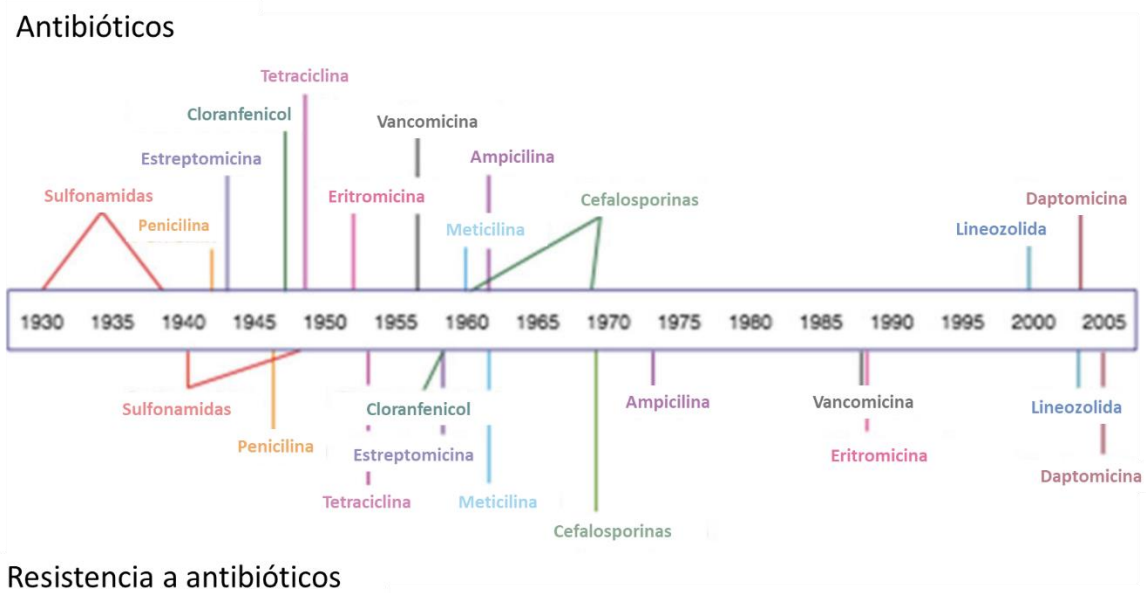


Figura 1 Cronograma del desarrollo de antibióticos y evolución de la resistencia a éstos. Modificado de (Scheffler *et al.*, 2013)

Para la búsqueda de nuevos antimicrobianos, debemos tener en cuenta que, idealmente, un antibiótico debe matar o inhibir el crecimiento de microorganismos dañinos para el huésped y que no cause toxicidad a éste (Singh *et al.*, 2017).

1. Productos naturales

En 1928, cuando Fleming descubrió la penicilina, se abrieron las puertas a la búsqueda de compuestos conocidos como productos naturales obtenidos de plantas y microorganismos (Fleming, 1929). Durante la “era dorada”, entre 1940 y 1960, los productos naturales fueron la principal fuente de antimicrobianos (Kurtböke 2017; Tracanna et al. 2017). La esperanza de vida aumentó, mientras que la muerte por enfermedades bacterianas disminuyó. La búsqueda se vio obstruida por el redescubrimiento de moléculas lo que llevó al uso de nuevas estrategias dirigidas a la búsqueda de productos naturales (Clardy, Fischbach, and Walsh 2006).

Los productos naturales, también conocidos como metabolitos secundarios o metabolitos especializados, son moléculas orgánicas provenientes de plantas, microorganismos e invertebrados (Jensen, 2016). Muchos antimicrobianos, antitumorales, preservadores de alimentos y pesticidas son compuestos obtenidos de bacterias, hongos y plantas.

Los productos naturales son la fuente más importante de compuestos bioactivos; para 1990 la mayoría de los compuestos eran productos naturales o sus análogos (Tanvir, Javeed and Bajwa, 2017). En el caso de los antibióticos derivados de microorganismos; 23,000 productos naturales con actividad antibacteriana son conocidos, de los cuales, el 51% son producidos por Actinobacterias, el 36% por hongos y el 13% por eubacteria (Centeno-Leija *et al.*, 2016; Wohlleben *et al.*, 2016).

Entre los productos naturales usados como antimicrobianos en la actualidad se encuentran la eritromicina, estreptomicina, tetraciclina y la vancomicina.

1.1. Origen de productos naturales

Hasta ahora, casi el 60% de los compuestos naturales son obtenidos de plantas. El suelo cuenta con una gran diversidad de bacterias; conteniendo 4×10^7 hasta 2×10^9 células por gramo de suelo, considerando suelo forestal y suelo cultivable (Centeno-Leija *et al.*, 2016). De las bacterias aisladas del suelo, cerca del 30% son actinobacterias, de las cuales hoy en día se siguen aislando en sitios como India (Ganesan *et al.*, 2017) y Brasil (Lima *et al.*, 2017)

Otras fuentes no convencionales en donde se pueden buscar productos naturales es en microorganismos que viven en lechos marinos, en animales como esponjas marinas; en nichos ecológicos extremos, en cuevas y también dentro de las plantas. A estos últimos se les conoce como endófitos de plantas (Wilson, Zha and Balskus, 2017).

1.1.1. Microorganismos endófitos de plantas

Los endófitos son microorganismos que viven en los tejidos de las plantas sin causar daño, al menos durante una parte de su ciclo de vida, e incluyen aquellos que viven

en las raíces y que tienen una interacción con la rizósfera (Nalini and Prakash, 2017). Pueden encontrarse en el tallo, hojas y en las semillas de las plantas (Brader *et al.*, 2014) (Figura 2).

Se ha considerado que todas las plantas contienen al menos un endófito viviendo en ellas (Guzmán-Trampe *et al.*, 2015). Existe la posibilidad que la diversidad de los endófitos sea dependiente de la interacción ecológica de estos y la planta y de ambos con el nicho ecológico en que se encuentren (Kealey *et al.*, 2017).

Se ha hipotetizado que plantas y endófitos han evolucionado juntos, promoviendo la transferencia de genes entre ellos, otorgando a los endófitos un número mayor de clústeres de genes biosintéticos (BGCs) así como mayor diversidad (Dinesh *et al.*, 2017; Tanvir, Javeed and Bajwa, 2017). Los endófitos deben estar adaptados al ambiente específico de la planta, por lo que el potencial metabólico de un endófito debe diferir de aquellos microorganismos que habitan el suelo (Brader *et al.*, 2014).

Los compuestos aislados de plantas que pueden tener relación con endófitos pueden estar presentes por tres diferentes razones: los metabolitos son producidos por los endófitos debido a su interacción con la planta, puede haber una síntesis bilateral, en dónde uno de los participantes comienza el compuesto y el otro lo termina, y, metabolitos producidos por la planta debido a la inducción del endófito. Estos metabolitos producidos pueden tener diferentes funciones en la interacción planta-endófito: defensa y competición de los endófitos contra otros microorganismos, comunicación bacteriana, interacción o señalización específica con la planta y la adquisición de nutrientes (Brader *et al.*, 2014)(Figura 2).

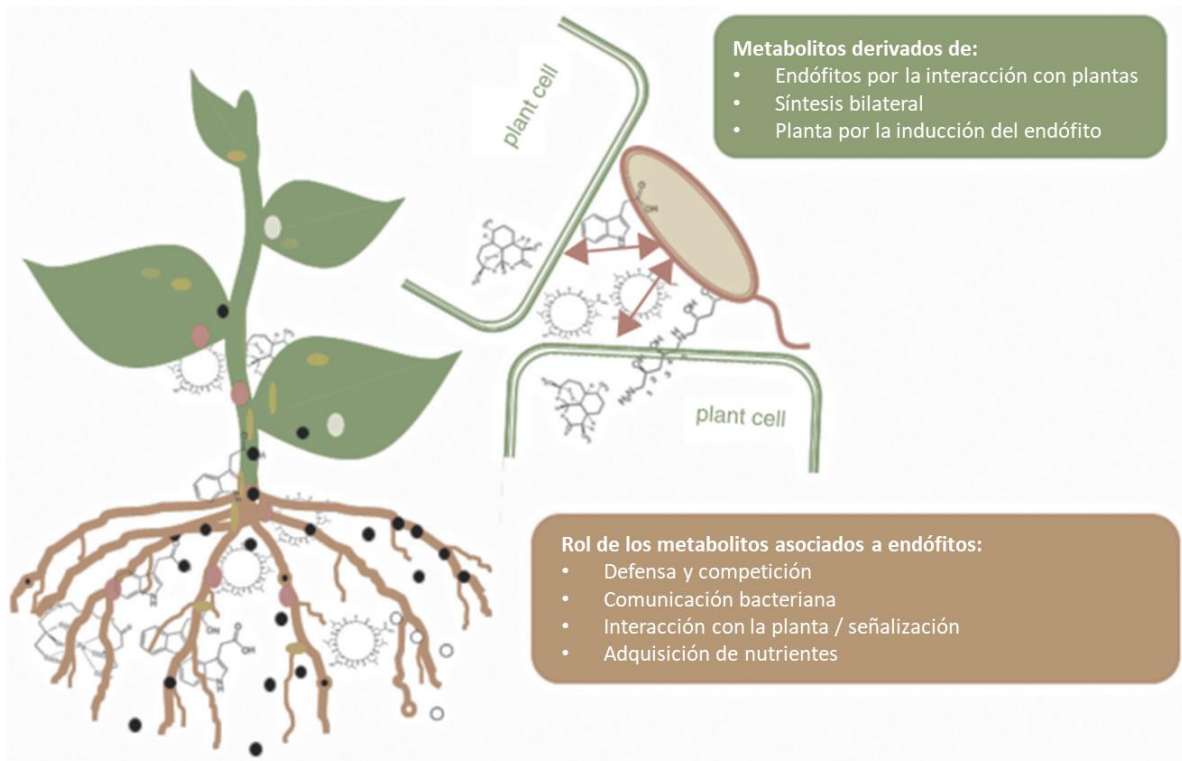


Figura 2 Interacción planta-endófitos. Modificada de (Brader *et al.*, 2014)

Un gran número de compuestos han sido aislados de endófitos, sin embargo la producción comercial de estos aún sigue en su infancia (Strobel, 2003; Kusari, Singh and Jayabaskaran, 2014; Kaul, Sharma and K Dhar, 2016).

Se puede considerar a los endófitos como fuentes prometedoras de productos naturales con potenciales beneficios en diferentes campos como la medicina y la agricultura. Los endófitos encontrados comúnmente son hongos y bacterias (Martinez-Klimova, Rodríguez-Peña and Sánchez, 2016). De los 20,000 compuestos bioactivos aislados de microorganismos (Demain and Sanchez, 2009), la mayoría son obtenidos de Actinobacterias (Bérdy, 2005).

1.1.1.1. Actinobacteria

Las Actinobacterias son bacterias Gram-positivas, filamentosas y con un genoma rico en Guanina y Citosina (G+C): entre el 50% en *Corynebacteria* y hasta el 70% en *Streptomyces* (Ventura *et al.*, 2007).

Las Actinobacterias se han encontrado en diversos ambientes como suelo, agua, hábitat marino, materia orgánica, rizósfera y dentro de plantas (Figura 3); se han encontrado en diferentes ecosistemas, en cuevas, en hormigas y como endófitos en diferentes partes de las plantas (Maciejewska *et al.*, 2016; Dinesh *et al.*, 2017; van der Meij *et al.*, 2017).

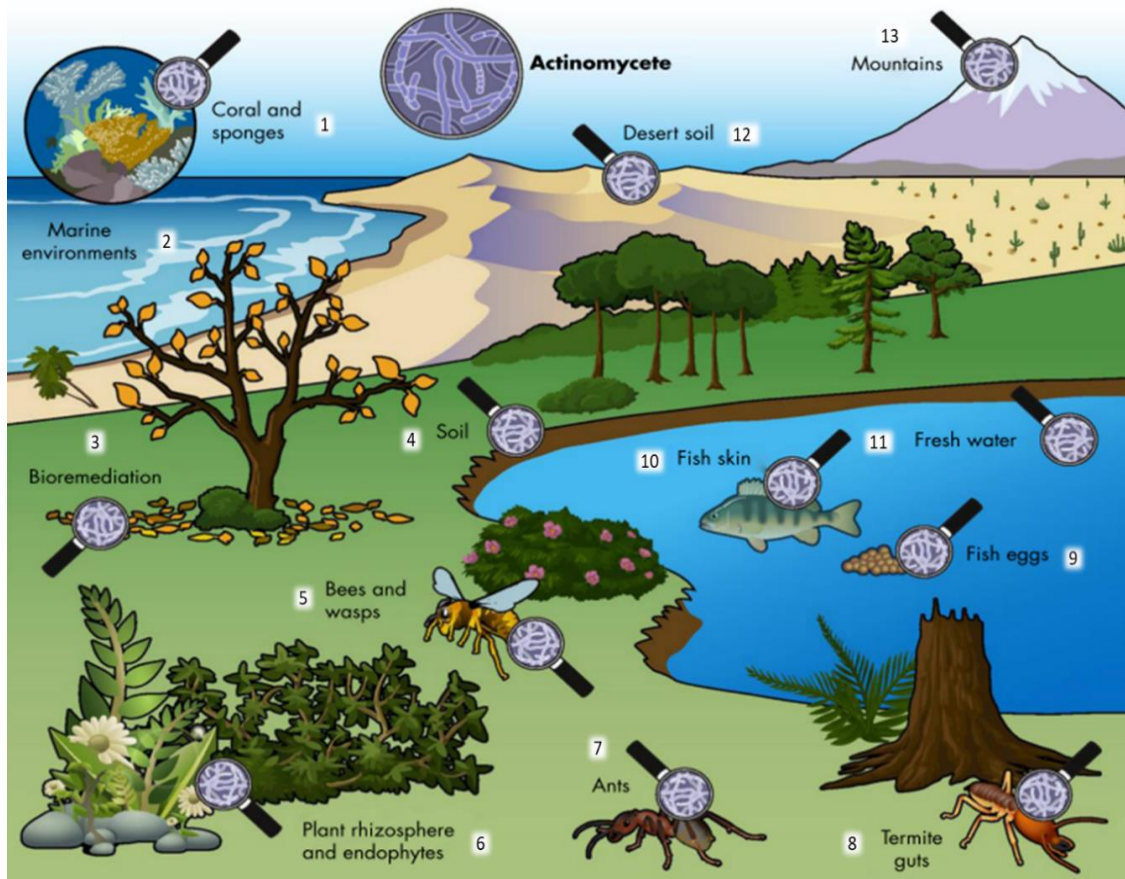


Figura 3 Ecología de los actinobacterias. 1. Coral y esponjas; 2. Ambientes marinos; 3. Biorremediación; 4. Suelo; 5. Avispas y abejas; 6. Rizósfera y endófitos de plantas; 7. Hormigas; 8. Estómagos de termitas; 9. Huevos de pez; 10. Piel de pez; 11. Agua; 12. Suelo desértico; 13. Montañas. Modificada de (van der Meij *et al.*, 2017)

En la naturaleza, *Streptomyces* es el mayor componente de actinobacterias presentes en diferentes nichos ecológicos como suelo, agua y rizósfera. Solamente de raíces, se ha logrado aislar hasta 1000 cepas de Actinobacterias (Matsumoto and Takahashi, 2017). En diferentes aislamientos se ha encontrado que *Streptomyces* llega a ser hasta el 65% de todas las especies de Actinobacterias endófitas encontradas (Passari *et al.*, 2015; Qin *et al.*, 2015; Dinesh *et al.*, 2017).

Diferentes especies de *Streptomyces* se han encontrado en ambientes marinos, así como dentro de plantas. Han llegado a tener una relación simbiote con plantas, hongos, insectos y esponjas (Andersen, 2017). Los *Streptomyces* endófitos tienen una relación comensal o incluso simbiótica con las plantas en las que habitan, en donde la bacteria toma nutrientes y protección de la planta, mientras que provee metabolitos que ayudan a la planta en diferentes situaciones de estrés (Dinesh *et al.*, 2017; van der Meij *et al.*, 2017); incluso esta actividad simbiote se ha visto como una posibilidad poco explorada con la finalidad de la obtención de nuevos compuestos (Adnani, Rajski and Bugni, 2017). La diversidad y el sitio dentro de la planta en donde se encuentran los endófitos es un tema aún de discusión ya que no hay consenso sobre esto.

La capacidad de supervivencia de los *Streptomyces* en diferentes condiciones sugiere habilidades adaptativas que pueden estar relacionadas directamente con su metabolismo secundario tan diverso y especializado.

Más del 70% de los antibióticos usados hoy en día fueron obtenidos a partir de actinobacterias siendo el género *Streptomyces* el mayor productor (Dinesh *et al.*, 2017). Se ha calculado que el género completo puede llegar a producir hasta 100,000 diferentes compuestos (Watve *et al.*, 2001).

Aún se siguen aislando nuevas especies y cepas del género *Streptomyces*, encontrando actividades antimicrobianas en ellas, incluso para bacterias multirresistentes como *Rasamsonia argillacea* (Maciejewska *et al.*, 2016). Su presencia constante, así como su gran diversidad en los clústeres de genes biosintéticos, hace a las bacterias del género *Streptomyces*, las preferidas para la búsqueda de nuevos productos naturales.

1.2. Descubrimiento de nuevos productos naturales

La búsqueda tradicional de compuestos antimicrobianos se ha basado en la detección de bioactividad por medio de dos estrategias: el fraccionamiento de

extractos y la detección química. Sin embargo, estas han sido las técnicas que han llevado al redescubrimiento de compuestos. La primera estrategia involucra extractos de fermentaciones, detección de bioactividad, fraccionamiento y la elucidación de la estructura; la segunda busca el aislamiento a partir de Cromatografía en capa fina (Thin Layer Chromatography, TLC, por sus siglas en inglés) seguido por la elucidación de la estructura (Centeno-Leija *et al.*, 2016).

El problema del redescubrimiento de moléculas hizo que se cambiará el enfoque de la búsqueda hacia el genoma de los organismos; gracias a la disponibilidad de genomas microbianos, se ha establecido a la minería genómica como el método más utilizado para la búsqueda y expresión de clústeres de genes biosintéticos (Blin *et al.*, 2016; Baltz, 2017). En la Figura 4 se puede observar la metodología para la búsqueda de nuevos productos naturales: fraccionamiento, minería genómica, técnica unicelular, metabolómica y proteómica.

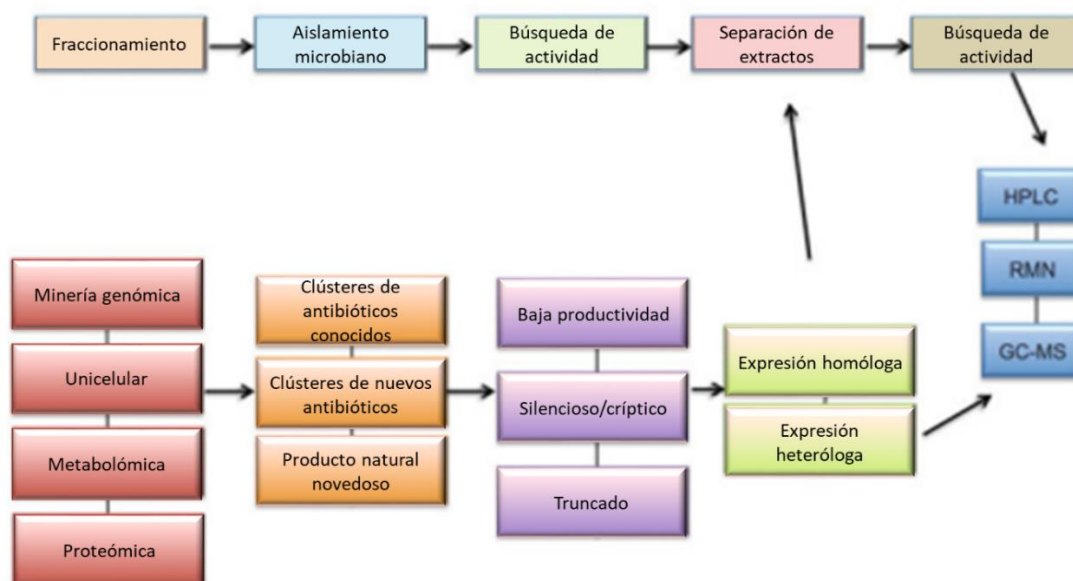


Figura 4 Técnicas para el descubrimiento de productos naturales. Cromatografía líquida de alta eficacia (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC); Resonancia Magnética Nuclear (RMN); Cromatografía de gases acoplado a masas (Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS). Modificado de (Centeno-Leija *et al.*, 2016)

Desde que los genomas de *Streptomyces coelicolor* y *Streptomyces avermitilis* fueron publicados entre el 2002 y el 2003, se observó que contenían la capacidad de producir hasta 10 veces otros metabolitos que los que se habían obtenido

previamente en fermentaciones (Bentley *et al.*, 2002; Ikeda *et al.*, 2003; Challis, 2014; Ikeda, Shin-Ya and Omura, 2014).

La disminución de los costos para la secuenciación masiva así como el desarrollo de nuevas tecnologías de secuenciación han hecho posible una mayor investigación dentro de los genomas de microorganismos conocidos actualmente por tener un alto contenido de BGCs (Loman and Pallen, 2015; Miller, Chevrette and Kwan, 2017).

1.2.1 Clústeres de genes biosintéticos

Se ha observado que los genomas de muchos microorganismos contienen un conjunto de genes cuyo fin es la producción de una molécula bioactiva, a éstos se les llama clúster de genes biosintéticos (BGC). Estos suelen estar co-localizados y co-regulados (Martinez-klimova, Centeno-leija and Sánchez, 2016). Se ha observado que, mayoritariamente, los genes que dirigen la síntesis de metabolitos secundarios se encuentran agrupados de esta manera; a diferencia de un operón que contiene un solo promotor y operador, en los BGCs puede haber promotores para cada gen y éstos pueden ser expresados de manera independiente. Estos clústeres de genes pueden llegar a medir hasta más de 100 kb con diferentes operones dentro del clúster y bajo un estricto control transcripcional.

Varias actinobacterias han sido sometidos a la minería genómica como un *Streptomyces* aislado del lecho marino, el cual fue secuenciado y en donde se encontraron 36 clústeres de genes de 18 tipos diferentes de metabolitos (Paulus *et al.*, 2017).

En varios casos se puede hacer una predicción de la clase química y las estructuras del compuesto codificado basado en la estructura y el contenido de los BGCs. Esta información puede ser utilizada para elegir la técnica a utilizar para la expresión de un compuesto (Wohlleben *et al.*, 2016).

Se han descrito más de 6000 familias de BGCs, cuya presencia o ausencia de los genomas de microorganismos de la misma especie indica la ganancia y/o pérdida

de éstos durante la evolución (Cimermancic *et al.*, 2014; Miller, Chevrette and Kwan, 2017). Estas familias se pueden dividir dependiendo del tipo de metabolito que produzcan: bacteriocinas y péptidos ribosomales modificados post-traduccionalmente (RiPPs), péptidos no ribosomales (NRPS), policétidos (PKSI-III), terpenos, sideróforos, así como híbridos de estos. Estos BGCs pueden ser encontrados gracias a herramientas bioinformáticas especializadas para su búsqueda.

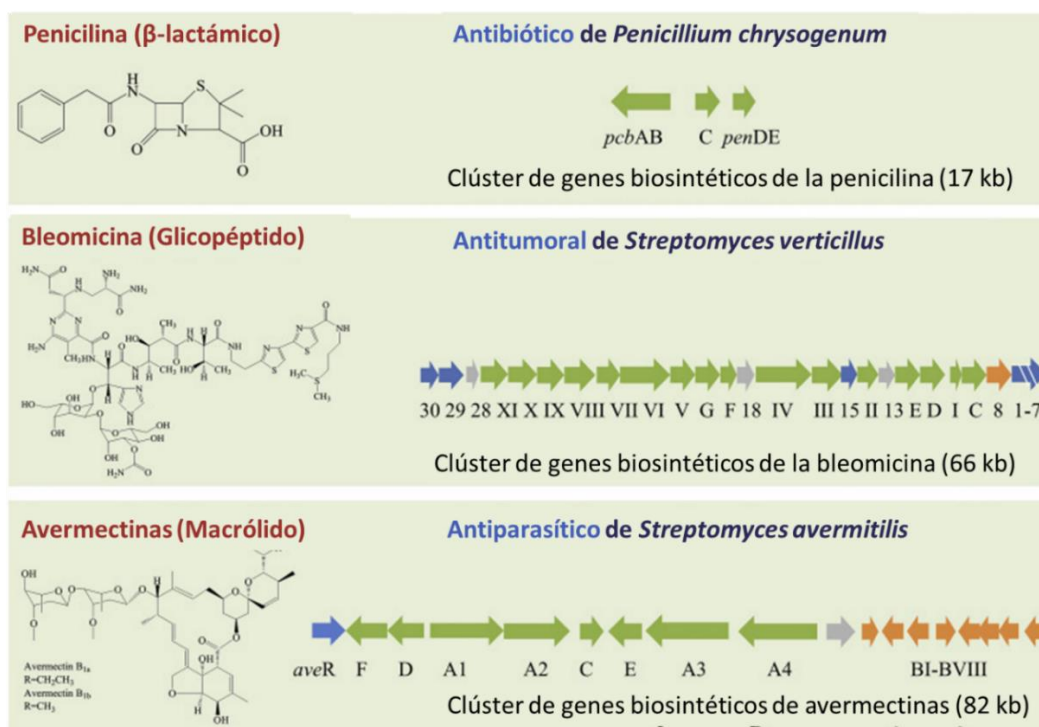


Figura 5 Ejemplificación del tamaño de diferentes clústeres de genes biosintéticos. Modificado de (Li, Jiang and Lu, 2017)

1.2.1.1 Minería genómica

La minería genómica se ha definido como: “El uso de la bioinformática, genética molecular y la química analítica de productos naturales para acceder al producto metabólico de un clúster de genes encontrado en el genoma de un organismo” (Gomez-Escribano and Bibb, 2014).

La minería genómica busca dentro de los genomas secuenciados de organismos los BGCs involucrados en la producción de nuevos compuestos. Los avances en esta área han permitido definir las capacidades biosintéticas potenciales de un

organismo a partir del análisis de sus BGCs. La minería genómica detecta y analiza los clústeres de genes y los conecta con moléculas que una bacteria podría producir.

La técnica se ha aplicado exitosamente en diferentes organismos como hongos (Ugai *et al.*, 2016), actinobacterias (Chen *et al.*, 2016) y otros microorganismos (Liu *et al.*, 2016). Así como para diferentes moléculas: policétidos (Ugai *et al.*, 2016), péptidos no ribosomales (NRPS) y bacteriocinas.

Actualmente la minería genómica consiste en 4 pasos como se muestran en la Figura 5: selección del microorganismo, aunque este paso no es necesario en metagenómica, y secuenciación de su genoma; análisis bioinformático y búsqueda de clústeres de genes biosintéticos; estrategias de biología molecular y sintética para expresar el producto deseado y finalmente, la caracterización de éste (Rutledge and Challis, 2015; Ren, Wang and Zhao, 2017).

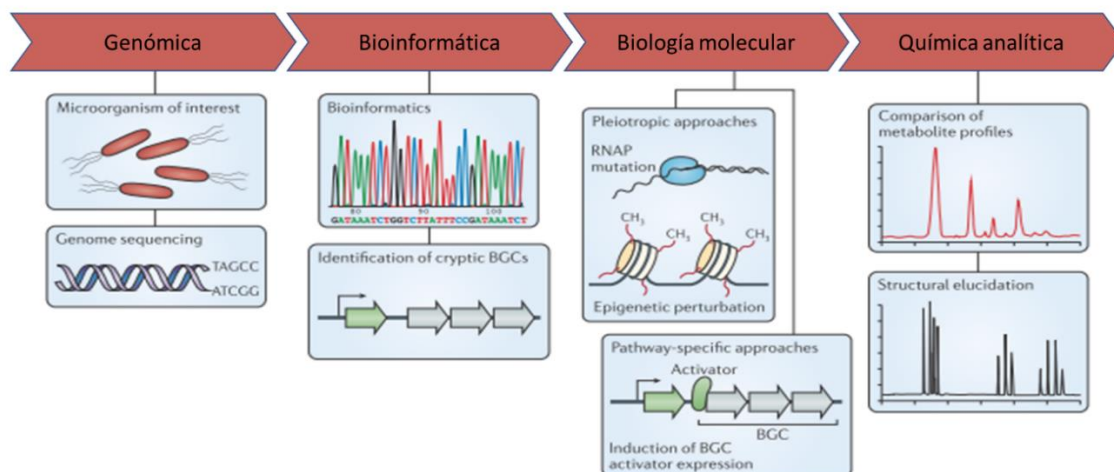


Figura 6 Minería genómica. Pasos para el descubrimiento de productos naturales a partir de la minería genómica. Modificado de (Rutledge and Challis, 2015)

1.2.1.2 Herramientas bioinformáticas

Las herramientas bioinformáticas han facilitado la búsqueda de BGCs dentro de un genoma. Entre estas herramientas se encuentran antiSMASH (Blin *et al.*, 2017), BAGEL (van Heel *et al.*, 2013) y PRISM (Skinnider *et al.*, 2015), las cuales se basan en “firmas”, es decir, características particulares de cada clúster según el tipo, éstas

pueden ser enzimas como las policétido-sintasas (PKS) o dominios proteicos como en algunas bacteriocinas.

Una de las herramientas más utilizadas en primera fase para la búsqueda de clústeres de genes biosintéticos es denominada antiSMASH (antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell), la cual se basa en su propia base de datos en donde se encuentran las BCG anotados por antiSMASH junto con otras bases de datos existentes como StreptomeDB (Blin *et al.*, 2016). Igualmente, está integrada con el repositorio conocido como MIBiG por sus siglas en inglés (Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster) (Medema, 2015). Lleva en funcionamiento desde el 2011 y se ha actualizado hasta llegar a su versión actual, antiSMASH v. 4.0. Esta herramienta se destaca sobre las otras por su amplitud en el reconocimiento de la mayoría de BGCs de metabolitos secundarios conocidos. Sin embargo, algo que los propios creadores afirman es que el programa no reconoce todos los BGCs de bacteriocinas. A pesar de esto, la mayor ventaja de antiSMASH es su amplia cobertura, ya que otras herramientas para la búsqueda de BGCs son específicas para uno o dos tipos de metabolitos (Figura 7).

BAGEL (BActeriocin GEnome mining tool) es una herramienta especializada en bacteriocinas. Las bacteriocinas son péptidos ribosomales que según su clasificación pueden o no ser modificadas post-traduccionalmente; son ampliamente conocidas por tener actividad antibacteriana. Una característica particular e importante para su identificación es el propéptido, es decir, el péptido inmaduro que sufrirá las modificaciones para llegar al producto activo final. BAGEL identifica precisamente el gen que codifica para este péptido de acuerdo con la similitud con otros en su base de datos. Además de identificar el gen para el propéptido identifica también los genes involucrados en su modificación o sus factores de inmunidad (van Heel *et al.*, 2013).

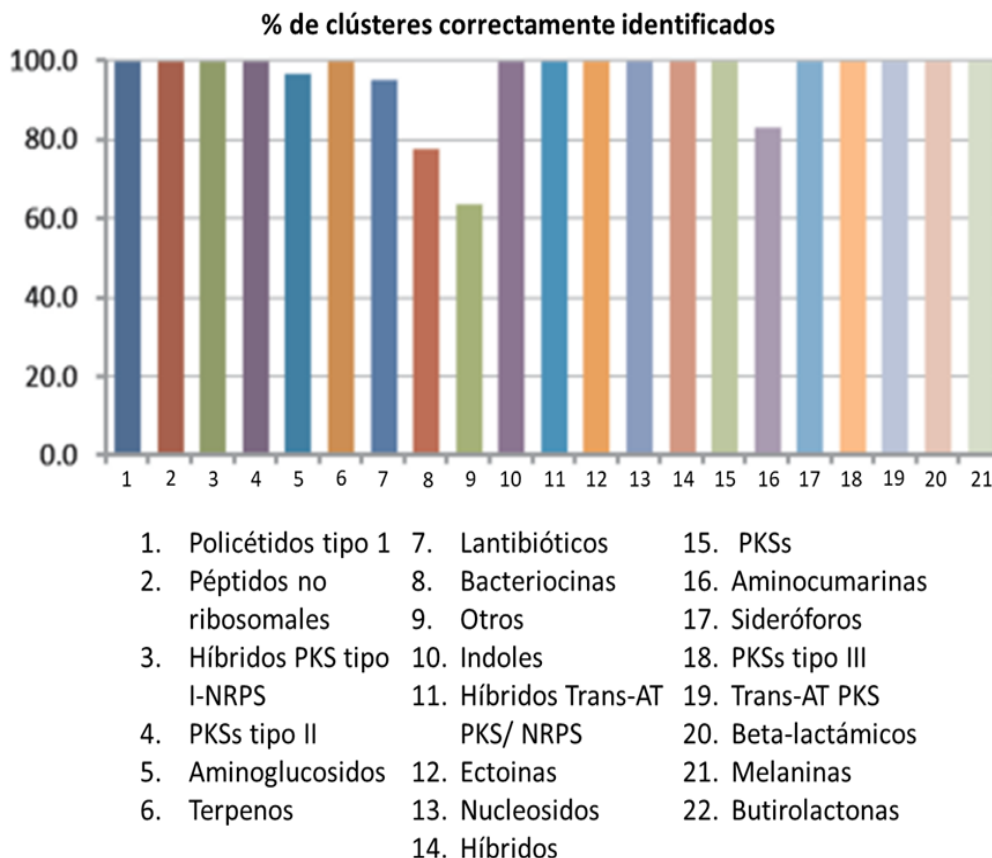


Figura 5 Porcentaje de BGCs identificados por antiSMASH. Modificado de (Medema *et al.*, 2011)

PRISM (PRediction Informatics for Secondary Metabolomeses) es otra herramienta ampliamente utilizada la cual se enfoca en PKS y NRPS. Esta herramienta puede en ciertos casos predecir la estructura molecular del producto final del clúster (Skinnider *et al.*, 2015).

La mayor limitación de estas herramientas es que se basan en BGCs conocidos, por lo que encontrar un clúster cuyo producto sea completamente novedoso o que explique características observadas en laboratorio puede no ocurrir, por lo que la minería genómica no debe ser basada solamente en estas herramientas sino en el análisis del genoma; un ejemplo de esto sucedió con Machado y colaboradores en donde los resultados de las herramientas bioinformáticas para encontrar BGCs no fueron suficientes para explicar los resultados experimentales obtenidos de actividad de quitinasa en diferentes cepas de microorganismos aislados de sedimentos marinos (Machado *et al.*, 2015; Wohlleben *et al.*, 2016).

1.2.1.3 Expresión de clústeres de genes biosintéticos

Uno de los grandes problemas para el descubrimiento de productos naturales es que hasta el 90% de los clústeres de genes son crípticos o se encuentran silenciados, aunque también se ha planteado la idea de que se expresan en bajas cantidades (Baltz, 2017); estos se encuentran bajo control transcripcional, por lo que muchas veces no son expresados en condiciones de laboratorio (Rutledge and Challis, 2015). Hay diferentes estrategias para solventar este problema las cuales se pueden agrupar dependiendo de en dónde se hará el planteamiento del problema, en el hospedero nativo, o en un hospedero heterólogo (Ren, Wang and Zhao, 2017).

Una de las ventajas de la expresión de un clúster en el hospedero nativo es que el hospedero tendrá todas las herramientas necesarias para la producción completa de la molécula, así como resistencia a la molécula y transportadores adecuados. Sin embargo, encontrar la manera de regular su expresión en el propio hospedero puede ser una tarea complicada (Zhang *et al.*, 2016). Para expresar los clústeres en el hospedero nativo existen diferentes herramientas como CRISPR/Cas9 para eliminar promotores, la inserción de promotores constitutivos y el uso de elicitores, así como el sometimiento a condiciones de estrés. Todas éstas han sido exitosamente aplicadas para expresar clústeres biosintéticos en el microorganismo de origen (Dinesh *et al.*, 2017; Nah *et al.*, 2017; Ren, Wang and Zhao, 2017; Zhang *et al.*, 2017).

Aunque *Streptomyces* albergan una gran cantidad de BGCs, la regulación de estos es estricta, muy compleja y en la mayoría de los casos desconocida. Por lo que uno de los planteamientos más utilizados para la expresión de clústeres provenientes de *Streptomyces* es la expresión heteróloga, ya sea en el mismo género o en bacterias ampliamente utilizadas como *E. coli* o *Bacillus subtilis*.

En el caso de expresión heteróloga en *Streptomyces*, se han modificado genéticamente cepas de este género disminuyendo el número de clústeres que posee o quitando BGCs pertenecientes a determinado tipo de molécula (Zhang *et*

al., 2016). Algunos de los hospederos utilizados son *S. coelicolor* M1154 (Gomez-Escribano and Bibb, 2011) o *S. avermitilis* SUKA17 (Ikeda, Shin-Ya and Omura, 2014); en ambas cepas se deletaron sus BGCs con mayor expresión.

La Figura 8 demuestra gráficamente y de manera sencilla la expresión heteróloga de un clúster de interés. Para lograr la producción de la molécula es importante elegir adecuadamente el hospedero así como los vectores a utilizar y futuras modificaciones que se deseen hacer en el clúster (Zhang *et al.*, 2016).

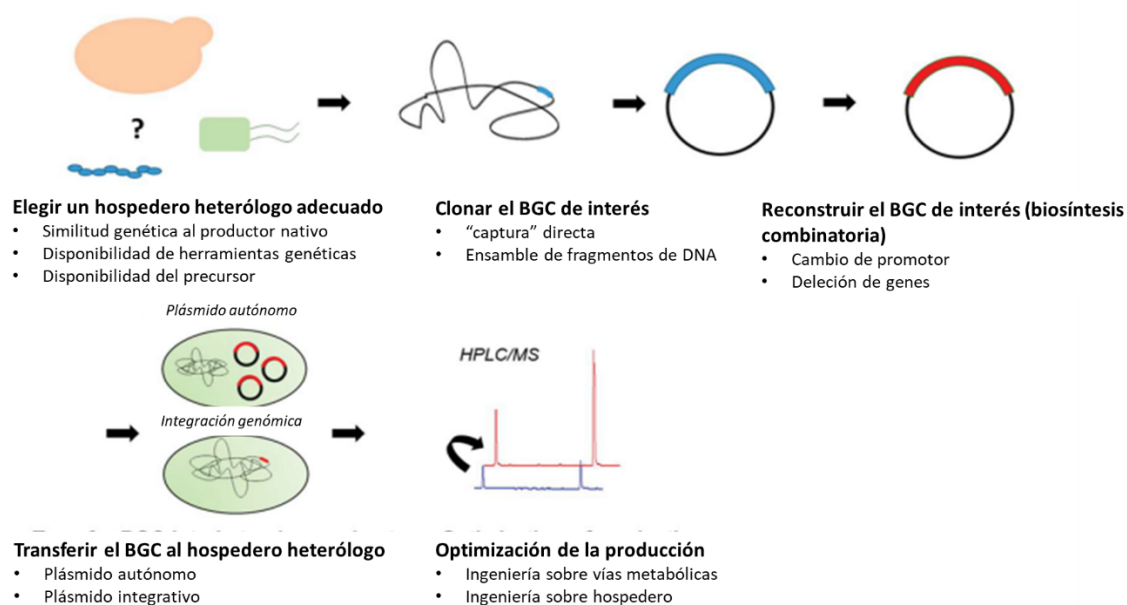


Figura 6 Pasos importantes para la expresión heteróloga. Modificado de (Zhang *et al.*, 2016)

En la Tabla 1 se pueden observar las ventajas y desventajas de las cepas comúnmente utilizadas para la expresión de BGCs por medio de la expresión heteróloga.

Uno de los problemas que se puede tener en la expresión heteróloga, es el tamaño del clúster a clonar ya que muchos son mayores a las 10 Kb llegando incluso a las 100 Kb. Sin embargo se han desarrollado diferentes técnicas para resolver este problema como el sistema de recombinación asociado a la transformación (TAR) o la recombinación mediada por integrasa (Nah *et al.*, 2017).

Tabla 1 Comparación entre diferentes hospederos heterólogos para la síntesis de productos naturales bacterianos

Hospedero heterólogo	Ventajas	Desventajas
<i>Escherichia coli</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Rápido crecimiento • Gran cantidad de herramientas disponibles • Conocimiento sobre sus rutas metabólicas 	<ul style="list-style-type: none"> • Falta de maquinaria biosintética y precursores • Puede hacer falta manipulación genética requerida para productos naturales de actinomicetos
<i>Bacillus subtilis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Rápido crecimiento • Caracterización genética • Hospedero ideal para moléculas bioactivas de <i>Bacillus</i> spp. 	<ul style="list-style-type: none"> • Falta de plásmidos autónomos que faciliten la clonación, transferencia y expresión de grandes BGCs
<i>Streptomyces</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> • Rico en precursores metabólicos y mecanismos enzimáticos • Metabolismo intrínseco versátil que soportan modificaciones postrduccionales requeridas para PKS y NRPS • Ideal para la expresión de la mayoría de proteínas de actinomicetos 	<ul style="list-style-type: none"> • Lento crecimiento • Falta de herramientas avanzadas para manipulación genética • Competencia de BGCs endógenos

Es importante recordar que la compatibilidad del hospedero con el clúster, así como la eficiencia de la clonación son factores determinantes para el éxito de la producción heteróloga de productos naturales.

La necesidad de nuevos antimicrobianos nos ha llevado a la búsqueda de nuevas estrategias como co-cultivo, en donde otras cepas pueden “ayudar” a la producción de moléculas bioactivas (Kealey *et al.*, 2017). Sin embargo, gracias a la secuenciación masiva, la minería genómica es ahora la herramienta con mayores beneficios en la búsqueda de nuevos productos naturales.

ANTECEDENTES INMEDIATOS

El árbol *Amphipterygium adstringens*, mejor conocido como Cuachalalate, endémico de México, es una planta medicinal conocida por sus propiedades anti-inflamatorias y su uso contra las úlceras gástricas (Olivera Ortega *et al.*, 1999). Recientemente se aislaron en el laboratorio del Dr. Sergio Sánchez diferentes cepas de *Streptomyces* con el fin de encontrar moléculas bioactivas producidas por estas bacterias. La recolección de las muestras del árbol se hizo en el poblado de Barranca Honda en Yautepec, Morelos (Vazquez-Hernandez *et al.*, 2017).

En un trabajo reciente con la cepa de *Streptomyces* NF3 aislada de este árbol, se demostró la capacidad de biosíntesis de compuestos bioactivos (Trenado, 2016a). Además, se realizó una comparación del gen de 16S rRNA de la cepa obteniendo una similitud del 99% con la secuencia parcial del 16S de *S. scabrisporus*.

Se trabajo con una cepa de *Streptomyces* novedosa del mismo árbol, así como la estudiada previamente, *Streptomyces* NF3.

JUSTIFICACIÓN

La necesidad de descubrir nuevos productos farmacéuticos ha llevado al ensayo de nuevas técnicas para su búsqueda. La minería genómica es una herramienta novedosa que ha permitido la detección de productos bioactivos cuya expresión permanecía silenciosa o críptica en los microorganismos que los producen. Las cepas de *Streptomyces* sp. aisladas de Cuachalalate son candidatas para aplicar la minería genómica y poder detectar y seleccionar clústeres de genes que codifiquen para la síntesis de metabolitos secundarios de interés farmacológico potencial

HIPÓTESIS

Con la ayuda de la minería genómica, se evidenciarán clústeres de genes que sirvan para la síntesis de metabolitos secundarios que puedan servir para fines farmacológicos. El clúster elegido codificará para la síntesis de una molécula con actividad antibiótica o antitumoral.

OBJETIVOS

General

- Expresar heterológamente un clúster novedoso de una cepa de *Streptomyces* aislada del Cuachalalate.

Particulares

- Secuenciar los genomas de dos cepas de *Streptomyces* spp. aisladas del Cuachalalate.
- Analizar con bioinformática los genomas de *Streptomyces* spp. aisladas del Cuachalalate.
- Encontrar por medio de minería genómica clústeres de genes cuya función sea la biosíntesis de moléculas con posible actividad antimicrobiana.
- Expresar de manera heteróloga el clúster cuya molécula tenga una posible actividad antimicrobiana.
- Probar la actividad de la molécula obtenida por medio de la expresión heteróloga del clúster elegido.

METODOLOGÍA

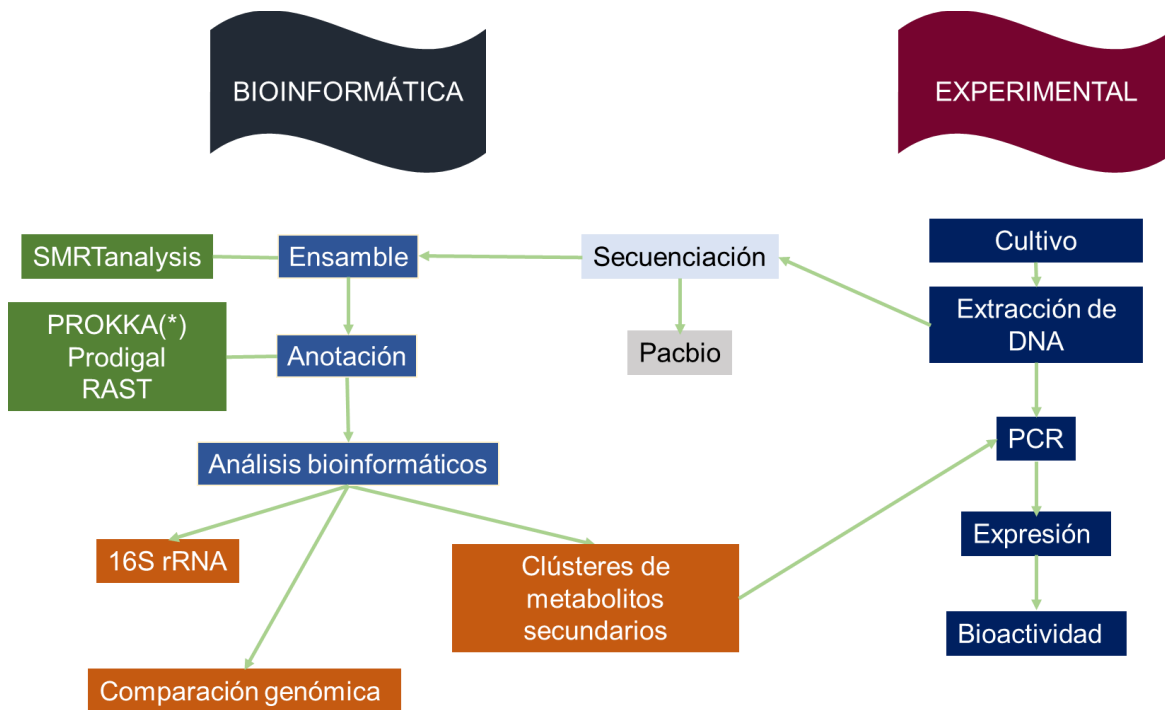


Figura 7 Diagrama experimental

Dado el objetivo principal de este trabajo, se aplicaron las cuatro etapas antes mencionadas de la minería genómica, eligiendo una cepa de entre dos de las aisladas previamente del árbol *A. adstringens*: *Streptomyces* L06 y *Streptomyces* NF3.

Los medios y soluciones presentes en la metodología se explican en el Anexo 1.

a. Cultivo de las cepas *Streptomyces* spp. aisladas de *A. adstringens*.

Streptomyces L06 se recuperó de un liofilizado hecho previamente en el laboratorio; *Streptomyces* NF3 se recuperó a partir de un glicerol. Ambos se recuperaron dentro de una campana de flujo laminar para conservar la esterilidad. El contenido del liofilizado se resuspendió en 300 μ l de medio YMG. Se tomaron 100 μ l y se inocularon dos matraces Erlenmeyer bafleados de 250 ml con 50 ml de medio YMG. Se estrió una caja de Petri con agar YMG utilizando el resto de la suspensión. Los matraces se incubaron a 29°C con 180 rpm de agitación. Para el glicerol, se estrió

en varias cajas Petri con agar YMG y se seleccionó la cepa con las características descritas en trabajos anteriores en el laboratorio.

En la tabla 2 se describen las cepas utilizadas, así como su medio de cultivo y la temperatura de crecimiento. Las cepas se almacenaron a -20°C para uso inmediato o a -80°C para su conservación; se almacenaron en el medio de cultivo óptimo adicionado con glicerol (20% v/v). Para reactivar las cepas, se añadieron 100 µl del microorganismo almacenado en glicerol en 5 ml del medio óptimo líquido o se estriaron en placas según su uso.

Tabla 2 Cepas utilizadas. Medios de cultivo y temperaturas de incubación para cada una.

Microorganismo	Medio de cultivo	Temperatura de incubación
<i>Streptomyces</i> L06	YMG	29°C
<i>Streptomyces</i> NF3	YMG	29°C
<i>Escherichia coli</i> DH5α	LB	37°C
<i>Escherichia coli</i> BL21	LB+cloranfenicol	15°C, 20°C, 25°C, 29°C, 37°C
<i>Escherichia coli</i> ROSETTA	LB+cloranfenicol	29°C, 37°C
<i>Mycrococcus luteus</i>	TSB	37°C
<i>Staphylococcus aureus</i>	TSB	37°C
<i>Bacillus subtilis</i>	TSB	37°C
<i>Pseudomonas</i> sp.	DNA	37°C
<i>Streptomyces lividans</i>	YMG	29°C
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1152	YMG	29°C
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YPD	29°C

b. Ensayo de antibiosis

Debido a que la cepa L06 no fue estudiada previamente fue necesario determinar si tenía actividad antimicrobiana, por lo que se realizó un análisis cualitativo.

Se reactivó la cepa en agar YMG con 200 µl de un vial de glicerol, se colocaron 50 µl del cultivo en una línea central en una placa de YMG agar, y se inoculó por 5 días hasta la esporulación.

Las cepas a utilizar para el ensayo fueron:

- *M. luteus*, (coco Gram positivo)
- *B. subtilis*, (bacilo Gram positivo)
- *E. coli* DH5α (Gram negativo)
- *S. cerevisiae* (Levadura)

Las cepas utilizadas se sembraron en placa un día antes del experimento para reactivarse con su respectivo medio de cultivo y temperatura óptima. Transcurridos los 5 días se inocularon las cepas de manera perpendicular a L06 por ambos lados (Figura 10)

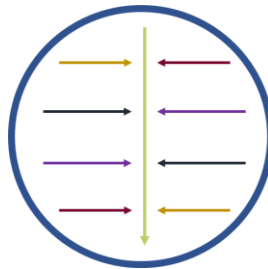


Figura 8 Modelo para el ensayo de antibiosis

Se incubaron nuevamente a 29°C O/N para observar si existía inhibición del crecimiento de las cepas de prueba.

c. Extracción de DNA genómico y secuenciación.

La cepa L06 fue inoculada en 50 ml de medio YMG en matraces Erlenmeyer bafleados de 250 ml e incubada durante 48 horas y se extrajo su ADN con el protocolo descrito en el Anexo 2. La cepa NF3 fue inoculada en medio YMG por 48 horas, se centrifugó el cultivo a 8,500 rpm por 10 minutos, se lavó con PBX 1X y se resuspendió en 50 ml de medio YEME en matraces Erlenmeyer bafleados de 250 ml y se incubó a 29°C por 24 h; la extracción de ADN se hizo con el protocolo descrito en el Anexo 3.

Para poder secuenciar se midió la calidad del ADN extraído espectrofotométricamente (Nanodrop). La calidad requerida mínima es 1.8 en ambas relaciones (OD260/OD280 y OD260/OD230) y que no haya presencia de RNA.

Las muestras de DNA se enviaron por paquetería en H₂O miliQ al Centro de Análisis Genómica de Yale (YCGA, Yale Center for Genome Analysis, E.U.A.). La secuenciación se hizo por medio de la tecnología “PacBio single-molecule real-time” (SMRT). Se mandaron dos muestras de DNA genómico de L06 y una muestra de NF3, para cada cepa se preparó una librería PacBio y se usaron dos Smrt-Cell; en el caso de las muestras de L06 se preparó la librería con las dos muestras.

❖ Secuenciación del gen 16S rRNA

Se amplificó parcialmente el gen 16S rRNA de la cepa L06. Se utilizaron como cebadores los oligonucleótidos universales para la amplificación de este gen. Las condiciones de amplificación se muestran en el Anexo 6.

d. Ensamble y anotación

Se realizó un ensamble *de novo* con la “pipeline” RS-HGAP2 en Smrt-Portal, una interfaz para las secuenciaciones hechas por tecnología PacBio. Se eligió una cobertura de 30X con un genoma esperado de 10 Mb.

Las órdenes para las anotaciones fueron tomadas de los manuales de cada programa y no se hizo ninguna variación.

Las secuencias codificantes fueron identificadas con PRODIGAL (Hyatt *et al.*, 2010) y anotadas con RAST (Overbeek *et al.*, 2014) y PROKKA (Seemann, 2014).. Se complementaron las anotaciones y se hizo una revisión manual.

e. Comparación genómica de las cepas

Se realizó una comparación de los proteomas entre ambas cepas, así como una comparación de las proteínas ortólogas, por medio de la herramienta de comparación de proteomas de PATRIC (Wattam *et al.*, 2014). Se compararon el

número de genes utilizados en diferentes rutas metabólicas y las familias de proteínas en común.

f. Búsqueda y análisis de clústeres de genes biosintéticos

Para buscar los BGCs se utilizaron las herramientas descritas previamente: antiSMASH v. 4.0, BAGEL3 y PRISM. Cabe destacar que se realizó un análisis anterior con antiSMASH v. 3.0, pero dado que los resultados no modificaban las decisiones tomadas en este proyecto, los resultados mostrados aquí fueron obtenidos por la versión 4.

Se analizaron los clústeres reconocidos por las tres herramientas, juntando los reconocidos por más de dos y agregando aquellos clústeres que sólo fueron reconocidos por uno. Para este análisis se tomaron en cuenta el tipo de clúster, el tamaño, los genes involucrados y la probabilidad de éxito para la expresión del metabolito.

Para fines prácticos sólo se describirán con mayor detalle los de un grupo de metabolitos. Las proteínas codificadas por los genes de este grupo se compararon por medio del servidor BLASTP en la página web de NCBI y se hizo un alineamiento múltiple por medio de Clustal omega (Sievers *et al.*, 2014). Se revisaron los dominios catalíticos y de unión con BLASTP y Pfam (Finn *et al.*, 2016). En base a estas comparaciones se decidió qué clúster expresar.

Para predecir las características de la proteína a expresar se utilizó el servidor protPARAM para saber el punto isoeléctrico y el peso de la proteína (Gasteiger *et al.*, 2005). Se utilizó el servidor SignalP para la búsqueda de péptidos-señales (Nordahl Petersen *et al.*, 2011), así como el servidor TMHMM para ver dominios transmembranales (Krogh *et al.*, 2001).

g. Expresión heteróloga del clúster de interés

Para la expresión del clúster elegido fue necesaria la clonación y expresión de un solo gen, por lo que el resto del presente trabajo se basa en la clonación, expresión y actividad de dicho gen.

I. Clonación en *Escherichia coli* DH5 α con el plásmido pET22b

❖ Plásmido y cepa utilizados:

Se utilizaron el sistema pET (pET System, Novage) y la cepa *E. coli* DH5 α para la clonación de la construcción.

El plásmido empleado fue pET-22b (+) de 5493 pb ya que cuenta con el operador *lac*, es inducible por IPTG y cuenta con un tallo de histidinas en el N-terminal (10x-His) lo que servirá para identificar la expresión y purificarla en el futuro. Este plásmido cuenta con resistencia a ampicilina por lo que es posible la elección de colonias transformantes. El mapa del plásmido se encuentra en el Anexo 4.

La cepa DH5 α fue usada para la clonación de la construcción ya que las mutaciones que tiene permiten una mayor eficiencia en la transferencia de plásmido y en la estabilidad del inserto (Kawashima *et al.*, 1984; Taylor, Walker and McInnes, 1993; Durfee *et al.*, 2008).

❖ Extracción de DNA de la cepa L06

Dado que el clúster elegido pertenece a *Streptomyces* L06, se realizó la extracción de DNA genómico de ésta. El protocolo de extracción fue el mismo que se utilizó para la secuenciación.

❖ Diseño de cebadores

Se diseñaron un primer par de cebadores con la secuencia codificante de la proteína del clúster elegido de la cepa L06, la cual fue anotada inicialmente sólo por PROKKA (denominado B1 para los propósitos del presente trabajo). Sin embargo, fue necesario diseñar otro par con la secuencia anotada por RAST (denominado B2 para los propósitos del presente trabajo). A demás se diseñaron cebadores para otra secuencia del clúster y para un grupo de genes anteriores a la secuencia de interés.

Se utilizó el software SnapGene para el diseño de cebadores y se comprobaron con OligoAnalyzer3.1 de Integrated DNA Technologies (IDT). Los oligonucleótidos del gen B1 fueron sintetizados por SigmaAldrich. El par de oligonucleótidos del gen de

interés B2 fue sintetizado en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología de la UNAM. En el inicio de cada oligonucleótido se insertaron secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción, estas se indican en la Tabla 3. Se hicieron viales de cada cebador a una concentración de 10 μ M.

Tabla 3 Cebadores utilizados para la amplificación por PCR

Nombre	Cebador 5' \rightarrow 3'	Tm °C	Enzima	Tamaño esperado (pb)	Objetivo
B1-F	GGATCCGGCTGTCTCACTCATGGCCGTATC	80.4	<i>Bam</i> HI	1573	Gen de interés (PROKKA)
B1-R	AAGCTTCACCTTGACGCCGCCTCCCCGGAGA	85.9	<i>Hind</i> III		
B2-F	CGCGGATCCcATGGCCGTACGCGGACGTCACC	79.6	<i>Bam</i> HI	1296	Gen de interés (PRODIGAL/RAST)
B2-R	CCCAAGCTTCACCTTGACGCCGCCTCCCCGGA	78.5	<i>Hind</i> III		
TPT-F	TCTCCGGGGAGGCGGCGTCAA	90.2	NA	794	Transportador de glucósidos (gen adyacente)
TPT-R	TTCTGCACGTCCTGGCACTCG	82.3	NA		
IND-F	AGTTGAAGATCCACTTCCTGG	62.1	NA	4700	Clúster índigoidina (conjunto de genes adyacentes)
IND-R	TGCCGAACGTGTGAGAGATA	67.9	NA		

❖ Amplificación de los genes

Las amplificaciones del gen de interés, del gen adyacente y del conjunto de genes cercanos al gen se realizaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando el termociclador Veriti (Applied Biosystems®), con la enzima AccuPrime™ *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (ThermoFisher). Se usaron 150 ng del DNA extraído de la cepa L06, una concentración final de 0.2 μ M de cada par de los cebadores, DMSO a una concentración final de 5%, 1 U de la enzima y 1x del Buffer II de la enzima. Se adicionó agua con base a 50 μ L. Las condiciones de cada reacción se enlistan en el Anexo 5.

Las amplificaciones se comprobaron por medio de un gel de agarosa al 1% (p/v) utilizando buffer TAE 1x. Se preparó el gel de agarosa con bromuro de etidio al 0.01%. Se cargaron 5 μ L de cada PCR mezcladas con buffer de carga 6x (DNA loading Dye, ThermoScientific). Se utilizó como marcador de peso molecular de 1

Kb el marcador GeneRuler 1Kb DNA Ladder (ThermoScientific), La electroforesis se corrió a 90 V por 60 min. Se reveló sobre un transiluminador de luz UV.

❖ Purificación de productos de PCR

Una vez obtenidos los fragmentos deseados se corrieron electroforesis en las mismas condiciones mencionadas anteriormente, pero con 50 µL de las PCR.

La banda deseada del gen de interés se purificó a partir del gel de agarosa utilizando el Kit Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), siguiendo las especificaciones del proveedor con excepción de que el H₂O miliQ fue calentada a 50°C antes de agregarla a la columna.

❖ Digestión y ligación

El gen amplificado y purificado, así como el plásmido seleccionado, se digirieron con las enzimas de restricción correspondientes a cada cebador (*Bam*HI y *Hind*III, Invitrogen y Promega respectivamente). En la Tabla 4 se muestran las concentraciones utilizadas en las digestiones.

Tabla 4 Cantidades de reactivos para las restricciones enzimáticas

Reactivo	Gen	Plásmido
Buffer	1x	1x
DNA	1-2 µg	500 ng
<i>Bam</i> HI / <i>Hind</i> III	2 U	2 U
H ₂ O miliQ	25 µL	25 µL

Se realizó primero la digestión con *Bam*HI, se comprobaron las bandas, se purificaron las muestras por medio de fenol:cloroformo y dos lavados extras de cloroformo, isopropanol y etanol al 70%, y se realizó la segunda digestión con *Hind*III. Cada una de las reacciones se incubaron O/N y las enzimas se inactivaron a 80°C por 20 min.

Después de la última restricción se corrieron geles de electroforesis para comprobar la presencia de las bandas deseadas. Se purificaron las bandas con el mismo protocolo de extracción de agarosa mencionado anteriormente.

Previo a la ligación el plásmido se desfosforiló con la enzima CIP (New England Biolabs). Las concentraciones de ADN del inserto y el plásmido se midieron en Nanodrop.

Para la ligación del gen de interés al plásmido elegido se utilizó la enzima T4 DNA Ligasa (New England Biolabs). Para saber la cantidad de inserto, se ocupó la herramienta NEBioCalculator con una relación molar 5:1. La concentración de vector fue de 50 ng y la cantidad del inserto B1 fue de 70 ng mientras que la del inserto B2 fue de 60 ng (Tabla 5).

Tabla 5 Concentraciones de reactivos para la ligación

Reactivo	Concentración final B1	Concentración final B2
Vector pET-22b (+)	50	50
Inserto	70	60
Buffer de la enzima 10x	2 μ L	2 μ L
T4 DNA Ligasa	1 U	1 U
Agua miliQ	A 20 μ L	A 20 μ L

La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente 90 min y se incubó durante 10 min a 70°C para inactivar la enzima. Una vez obtenida la construcción pET-22b-B1 o B2, se transformó en *E. coli* DH5 α .

❖ Células competentes y transformación

El protocolo para hacer células electrocompetentes se explica en el Anexo 6 el cuál fue aplicado a células de *E. coli* DH5 α , BL21 y ROSETTA.

Para la transformación se tomó una alícuota para cada muestra y controles (control positivo: plásmido vacío; control negativo: sin plásmido). Cada alícuota consistía en 50 μ L de células competentes *E. coli* DH5 α y se le adicionaron 3 μ L de la mezcla de

ligación. Este procedimiento se realizó en hielo. A las celdas de electroporación frías se les añadió la mezcla de la ligación con las células electrocompetentes y se realizó la electroporación a 1250 V con un tiempo de entre 4 y 5 s. Inmediatamente se les agregó 1 mL de medio LB (Luria-Bertani), se pasó la mezcla a tubos Eppendorf de 1.5 mL y se incubaron a 37°C con 180 rpm por 1 h. Se estrilaron las muestras en cajas Petri con agar LB más Ampicilina. Se picaron colonias al azar y se inocularon tubos de 15 mL con 5 mL de medio LB con ampicilina, los cuales se incubaron a 37°C O/N a 180 rpm.

De todas las colonias se realizó la extracción de plásmido con el protocolo del Anexo 7. Para verificar que el gen se encontraba dentro del vector se realizaron restricciones enzimáticas con *HindIII*, *KpnI* y *NotI*. *KpnI* y *NotI* cortan dentro del inserto mientras que *HindIII* corta entre el inserto y el vector.

Las muestras positivas se seleccionaron y se guardaron en glicerol al 20% (v/v) a -70°C. Las construcciones extraídas se almacenaron en agua miliQ a 4°C.

II. Expresión en *E. coli* BL21 (DE3) y *E. coli* ROSETTA

Para la expresión del gen de interés se hicieron electro-competentes de *E. coli* BL21 y *E. coli* ROSETTA. Ambas fueron transformadas únicamente con la construcción pET-22b-B2. Los protocolos utilizados para ambos experimentos son los mismos descritos previamente. Las cepas con las construcciones se guardaron en glicerol al 20% (v/v) a -20°C.

❖ Expresión en *E. coli* BL21 (DE3)

Los primeros ensayos de expresión se realizaron en la cepa *E. coli* BL21 (DE3). Se eligió esta cepa ya que es muy utilizada para expresar proteínas heterólogas. Es deficiente en proteasa y entre otras cualidades posee un gen de RNA pol T7 que sirve para la amplificación de genes insertados en los plásmidos del sistema pET. Además contiene 3 codones modificados AGG/AGA, AUA y CUA. La cepa es resistente a cloranfenicol. Esta cepa se ha utilizado previamente en el laboratorio para la expresión de proteínas de cepas de *Streptomyces*.

De acuerdo con el protocolo descrito en el manual de Sambrook (Sambrook and Russel, 2000) se hizo un pre-inóculo con 200 μ L de la cepa con el vector en 5 mL de medio LB con ampicilina (200 μ g/mL) y cloranfenicol (25 μ g/mL) y se incubó a 37°C con 180 rpm, O/N. A partir del pre-inóculo se tomaron los microlitros necesarios para que un matraz con 50 mL de medio LB con antibióticos tuviera una D.O._{600nm} de 0.1. Este inóculo fue incubado a 37°C a 180 rpm hasta llegar a una D.O._{600nm} de 0.7. Una vez llegado a la densidad óptica se adicionaron diferentes concentraciones de IPTG (ThermoScientific): 0.25 mM, 0.5 mM, 1 mM y 2 mM. Todas las concentraciones se incubaron a diferentes temperaturas: 15°C, 20°C, 25°C, 29°C y 37°C. Se tomaron muestras a las 2 h, 4 h, 6 h, 9 h, 12 h, 18 h, 24 h y 36 h. Las muestras se centrifugaron y se deshecho el sobrenadante; el pellet se almacenó a -20°C si la extracción no se hacía inmediatamente.

❖ Expresión en *E. coli* ROSETTA

La cepa de ROSETTA es una cepa derivada de BL21, pero con la adición de 3 codones: CGG, CCC y GGA.

El protocolo de expresión de la proteína fue el mismo que para BL21, sin embargo, las variantes no fueron tantas. Se probó la expresión a 29°C y 37°C con una concentración de 1 mM de IPTG.

❖ Extracción de la proteína

Las muestras almacenadas de las proteínas expresadas a -20°C fueron sonicadas utilizando el equipo Vibra-Cell de SONICS; el protocolo de sonicación se describe en el Anexo 8. La sonicación se utilizó para separar las fracciones solubles e insolubles. Ambas fracciones se re-suspendieron en 500 μ L de Buffer para extracción de proteínas (Anexo 1).

❖ Determinación de la concentración de la proteína

La concentración de proteína de cada muestra se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando un kit comercial de Bio-Rad y albúmina sérica bovina (ASB) en un rango de 1.2 a 10 μ g/mL para el estándar. Las muestras se

midieron en una microplaca de 96 pozos en donde se colocaron 80 μ L del estándar o de la muestra y 20 μ L del reactivo. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en el equipo Multiscan FC (ThermoScientific).

❖ SDS-PAGE y Western-Blot

Para confirmar la producción de la proteína recombinante, así como su peso molecular, se realizó un SDS-PAGE (Laemmli, 1970) y un Western-Blot.

Para ambos experimentos se usó un gel de poliacrilamida al 10% (Anexo 1); para hacer los geles se utilizaron los vidrios con grosor de 0.75 mm. Se corrieron 10 μ L de muestra (ajustadas a 40 μ g de proteína) con un volumen igual de Buffer de carga (BioRad), se hirvieron por 10 minutos antes de cargarse. Los geles se corrieron a un amperaje constante de 20 A por gel durante 1.5 h con el equipo Power-Pac 300 (BioRad). Como control positivo se utilizó una Diterpeno-sintasa con peso de 35 kDa aislada previamente en el laboratorio. El marcador de peso molecular utilizado fue Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range (BioRad) de 6 a 198 kDa, el cual se utilizó para determinar el peso de las proteínas en las muestras.

Los geles para SDS-PAGE se incubaron 30 min con solución fijadora, ésta se deshecho y se dejaron una hora tiñéndose con azul de Coomasie. Al terminar se tiró el colorante y se agregó solución decolorante para poder visualizar las bandas.

Para el Western-Blot se utilizó una membrana “Immobilon-P” (0.45 μ m, PVDF) para la transferencia de las proteínas en el gel desnaturizante. La transferencia se realizó a 4°C a 60 V por 90 min en un equipo Mini Trans Blot® (Bio-Rad). El protocolo de Western-Blot se describe en el Anexo 9.

h. Evaluación de la actividad del producto obtenido

I. Zimogramas

Los geles de poliacrilamida co-polimerizada se realizaron de la misma manera que los geles para SDS-PAGE, adicionándoles el 2% (p/v) de las cepas a evaluar. Se utilizaron las fracciones no solubles de los extractos proteicos a una concentración

de 40 µg de proteína total. Los geles se corrieron de la misma manera que los geles de SDS-PAGE.

El primer ensayo para estandarizar la técnica fue con *M. luteus* (Leclerc and Asselin, 1989). Las siguientes cepas por evaluar fueron *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* ROSETTA, *Pseudomona* sp. *S. lividans*, *S. coelicolor* M1152, *S. scabrisporus* NF3 y *S. cerevisiae*. Todas las cepas se reactivaron en 5 mL de su medio óptimo un día antes del ensayo. Los inóculos se homogenizaron y se esterilizaron por medio de autoclave. Se pesó el micelio húmedo para llegar a la concentración del 2% del volumen final de la preparación de los reactivos de los geles de poliacrilamida al 10%. Una vez transcurrida la electroforesis, el gel se lavó dos veces con agua miliQ durante 30 min. Se incubó a 37°C con amortiguador de renaturalización (Anexo 1) con agitación suave O/N. Se realizaron varios lavados con agua miliQ hasta que las burbujas desaparecieron y el gel se tiñó con 0.01% de KOH y 0.1% de azul de metileno durante 2 h y se destiñó con agua miliQ.

II. Actividad de peptidoglucano hidrolasa (PGH) utilizando 4-Nitrofenil *N*-acetil-β- D-glucosamina

La actividad de PGH fue evaluada utilizando como sustrato al 4-Nitrofenil *N*-acetil-β- D-glucosaminida (Sigma-Aldrich), el cual al ser hidrolizado libera *p*-nitrofenol que en medio básico forme el *p*-nitrofenolato, el cual es de color amarillo y puede medirse a una longitud de onda de 405 nm.

En una microplaca de 96 pozos se colocaron 80 µL de un amortiguador de citrato de sodio 100 mM a pH 4.8, 10 µL de una solución 1 mg/mL del sustrato NP-GlcNAc y 10 µL de la enzima (estudio o control). Como control positivo se utilizó a β-N-acetilglucoamidasas de *Canavalia ensiformis* (Sigma-Aldrich) y como control negativo la lisozima; ambas en una concentración de 10 µg/mL. El blanco fue el sustrato más 90 µL de amortiguador. La reacción se incubó a 37°C por 10 min. Se adicionaron 100 µL de carbonato de sodio 140 mM para detener la reacción. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm en el equipo Multiscan FC (ThermoScientific).

Para los cálculos de afinidad se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Unidades}}{\text{mL}} = \frac{(A_{405}(\text{muestra}) - A_{405}(\text{blanco})) * 0.2 * DF}{18.3 * \text{tiempo} * \text{Venz}}$$

A₄₀₅(muestra) = absorbancia de la muestra

A₄₀₅(blanco) = absorbancia del blanco

DF = Factor de dilución de la muestra original

Tiempo = tiempo de incubación a 37°C en minutos

Venz = volumen de muestra añadido en mL.

18.3 = Coeficiente de extinción milimolar del 4-nitrofenol a 405 nm

0.2 = Volumen total en la cubeta

Una unidad es la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 μmol de 4-Nitrofenil *N*-acetil-β- D-glucosaminida a *p*-nitrofenol y *N*-acetil-β- D-glucosaminida en 1 min a 37°C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

a. Cultivo de las cepas *Streptomyces* spp. aisladas de *A. adstringens*.

En la Figura 11 se puede observar la morfología de cada cepa. *Streptomyces* NF3 produce un pigmento rojo o naranja como se ha descrito previamente; este pigmento puede ser ocasionado por la producción de estaffimicina B (Trenado, 2016b). La cepa *Streptomyces* L06 tiene un ligero color verde que al verla al microscopio no se puede apreciar en su totalidad.

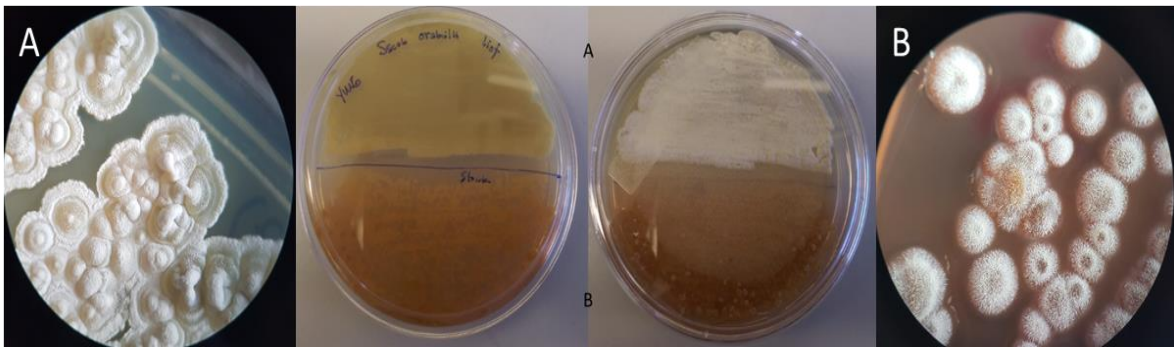


Figura 9 Cultivo de cepas aisladas del Cuachalalate en medio YMG. A) *Streptomyces* L06, B) *Streptomyces* NF3

b. Ensayo de antibiosis de la cepa L06

Ya que no se había estudiado con anterioridad a la cepa L06, se realizó un ensayo de antibiosis con esta cepa para saber si presentaba alguna actividad contra algún microorganismo. El ensayo se hizo contra *M. luteus*, *E. coli*, *S. cerevisiae* y *B. subtilis*.



Figura 10 Ensayo de antibiosis con *Streptomyces* LO6. 1) *Micrococcus luteus*; 2). *Escherichia coli*; 3) *Saccharomyces cerevisiae*; 4) *Bacillus subtilis*

Se encontró actividad únicamente contra *B. subtilis*, una bacteria Gram-positiva (Figura 12). Al momento de estriar las cepas de prueba, L06 ya había esporulado, por lo que se podría pensar que en menor tiempo de incubación el ensayo podría tener resultados distintos, teniendo actividad también contra otro microorganismo.

c. Aislamiento de DNA genómico y secuenciación de las muestras

Se aisló el DNA genómico de ambas cepas con diferentes protocolos como se indica en la metodología a partir de medio líquido. Se hizo una tinción de Gram para corroborar que no hubiera contaminación.

En la Figura 13 se muestran los geles de electroforesis de agarosa al 1% de la extracción de DNA de cada muestra, en donde se ve que no está degradado ni la presencia de RNA el cual es un impedimento en la secuenciación.

Se midió la calidad del DNA genómico extraído por medio del Nanodrop, obteniendo la calidad requerida para la secuenciación masiva llevada a cabo en la Universidad de Yale. En la Figura 13 se muestran las calidades y concentraciones de cada muestra enviada.

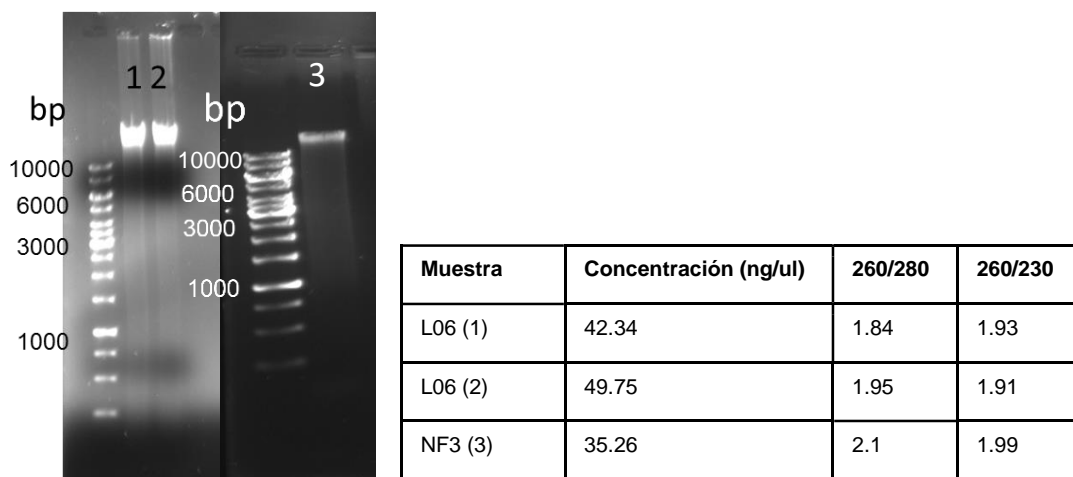


Figura 11 Gel de electroforesis de DNA de las muestras enviadas a secuenciar a la Universidad de Yale y su calidad. 1) *Streptomyces* L06-1; 2) *Streptomyces* L06-2; 3) *Streptomyces* Nf3

❖ Identificación de las cepas por medio del gen 16S rRNA

Para identificar las cepas se realizó una PCR, como se indica en la metodología, de la secuencia del 16S ribosomal para cada cepa y se mandó a secuenciar a

Laragene. Se obtuvieron fragmentos de alrededor de 900 pb en ambos sentidos del gen; con el programa SnapGene se emparejaron las secuencias correspondientes a cada muestra formando una secuencia de 1470 pb para ambas cepas.

Con Blast de NCBI buscando específicamente en secuencias de 16S ribosomal, se identificaron a que microorganismo podrían pertenecer. La secuencia de la cepa L06 tiene una identidad de 99% con la especie de *Streptomyces champavatii* y la de la cepa NF3, una identidad del 99% con *Streptomyces scabrisporus* (Figura 14). En el Anexo 10 se encuentran las secuencias del gen 16S rRNA de ambos microorganismos.

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
L06	Streptomyces champavatii strain NRRL B-5682 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2571	2571	99%	0.0	99%	NR_115669.1
	Streptomyces sampsonii strain ATCC 25495 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2571	2571	99%	0.0	99%	NR_025870.1
	Streptomyces globisporus subsp. caucasicus strain NBRC 100770 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2567	2567	99%	0.0	98%	NR_112593.1
NF3	Streptomyces scabrisporus strain NBRC 100760 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2560	2560	96%	0.0	99%	NR_112597.1
	Streptomyces scabrisporus strain KM-4927 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2512	2512	97%	0.0	99%	NR_028613.1
	Streptomyces aomiensis strain M24DS04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2326	2326	96%	0.0	96%	NR_112998.1

Figura 12 Resultados del alineamiento de las secuencias de los genes 16S rRNA de ambas cepas.

d. Ensamble y anotación

El ensamble *de novo* fue hecho con el algoritmo RS-HGAP2 en SMRT-Portal.

Como se observa en la Tabla 6, se obtuvieron 13 scaffolds para el genoma de L06, y 8 para el genoma de NF3. Probando que la calidad de las muestras de DNA puede influenciar en la secuenciación, dando secuencias más largas y facilitando el proceso de ensamblado.

En el caso de la cepa L06 se obtuvo un genoma de 6.8 Mb en donde el scaffold con mayor tamaño contenía 6.6 Mb. Para NF3 se obtuvo un genoma de 10.9 Mb, donde el scaffold más grande tenía 7.2 Mb.

Se evidenció que la herramienta proporcionada por Pacific Biosciences (PacBio), SMRT Analysis es una buena herramienta para el ensamble de genomas secuenciados únicamente por PacBio.

Se ha descrito previamente que es posible unir los scaffolds obtenidos por PacBio con secuencias obtenidas por medio de la tecnología Illumina HiSeq (Lin and Liao, 2015); por lo que, si se quisiera tener las secuencias de los genomas completos de las cepas, sería recomendable secuenciar por esta tecnología.

Para ambos genomas el contenido de G+C fue mayor al 70%, un resultado esperado en cepas pertenecientes al género de *Streptomyces*.

El genoma de la cepa L06 se anotó primeramente con PROKKA, sin hacer una revisión manual de la anotación. Los primeros experimentos se realizaron con esta anotación.

Cuando las secuencias de NF3 fueron recibidas y el genoma ensamblado, fueron anotados, ambos ensambles, con la herramienta RAST.

Se realizó un análisis de la anotación de ambos genomas con la plataforma de PATRIC, la cual permite analizar los genes que contiene cada genoma. En el caso de NF3 se encontraron varios factores de virulencia, que al ser analizados se observó que la mayoría son oxido-reductasas que podrían servir en la simbiosis con el hospedero.

Tabla 6 Resumen del ensamble y la anotación de los genomas de *Streptomyces champavatii* L06 y *Streptomyces scabrisporus* NF3

Característica	L06	NF3
Contigs	13	8
Tamaño del genoma (bp)	6,887,193	10,968,352
Contenido GC (%)	73.05	71.61
CDS	7,513	10,552
tRNA	64	60
rRNA	7	7
CRISPR-cas9	1	-
Factores de virulencia	3	7
Genes de resistencia a antibióticos	4	2

En el genoma de la cepa L06 se encontró un sistema de CRISPR-Cas9. Dado que no todos los genomas de *Streptomyces* conocidos tienen un sistema CRISPR-Cas9 completo, analizar esta característica podría ser de importancia en el ámbito de los actinobacterias.

e. Comparación genómica de las cepas

Los proteomas de ambas cepas fueron analizados con PATRIC y se identificaron las familias de genes ortólogos (OGF, por las siglas en inglés) utilizando el software de FIGFam; se encontró que comparten 1713 familias de proteínas. L06 parece contener mayor número de familias de proteínas de manera independiente a NF3, sin embargo, NF3 contiene un mayor número de genes que codifican para las proteínas en las familias identificadas indicando una mayor redundancia funcional (Figura 15).

Entre las familias de proteínas que comparten se encuentran del metabolismo primario y factores de regulación; muchas parecen pertenecer a la síntesis de aminoácidos, proteínas ribosomales y transcripcionales. Comparten familias de proteínas que pertenecen a la vía del shikimato la cual es una ruta para la cual une el metabolismo de carbohidratos con la síntesis de compuestos aromáticos entre ellos los aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptófano (Herrmann and Weaver, 1999).

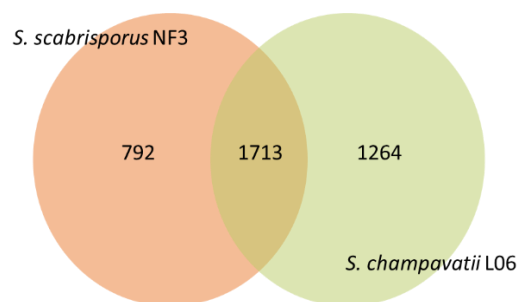


Figura 13 Diagrama de Venn de las familias de proteínas ortólogas encontrados por PATRIC

Las familias de proteínas únicas para la cepa L06 son muy variadas, van desde factores transcripcionales como NsR, el cual es un represor por nitrito, la proteína Cas2 asociada al sistema CRISPR, diferentes transportadores y sistemas de

secreción, e incluso familias para la protección contra metales pesados como el arsénico y β -lactamasas. En cambio, NF3 contiene familias particulares para el catabolismo de carbohidratos como la sorbosa y ramnosa y diferentes transportadores para metales como el Cobalto y el Molibdeno.

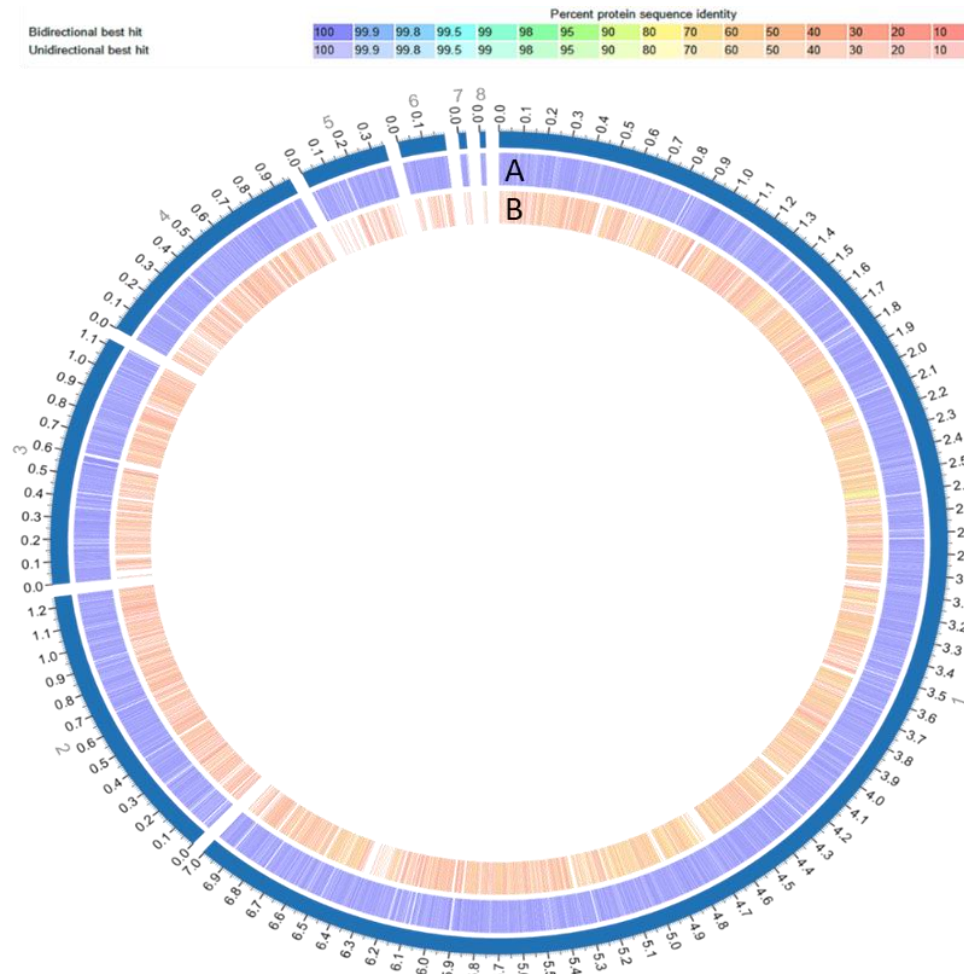


Figura 14 Comparación del proteoma. Diagrama de Circos entre NF3 (A) y L06 (B). En la parte superior se muestra la tabla con los colores que identifican la identidad entre los genes que codifican las proteínas. Entre más cercano al azul hay mayor similitud mientras que entre más cercano al rojo la similitud es menor.

En el diagrama de Circos se observa la comparación realizada entre las familias de genes ortólogos encontradas en ambos genomas (Figura 16). Se usa como referencia el genoma ensamblado de *S. scabrisporus* NF3 ya que tiene un tamaño mayor de nucleótidos.

Se puede observar que los genes ortólogos de la cepa L06 tienen una identidad menor al 50% con los genes de la cepa NF3, sin embargo, sus transcritos parecen compartir funciones similares. Hay distribución de las OGF en todos los scaffolds del genoma de referencia, sin embargo, en el scaffold número 5 parece que la cobertura de genes con L06 es menor al resto y sólo en el scaffold más grande hay proteínas con un porcentaje mayor de similitud.

Se hizo un conteo de los genes involucrados en rutas metabólicas de ambos genomas, no con el fin de compararlos entre ellos sino de vislumbrar el número de genes destinado a ciertas vías en el mismo genoma. Las vías metabólicas evaluadas fueron para el metabolismo de aminoácidos, biosíntesis de PKS y NRPS, metabolismo secundario, metabolismo de carbohidratos, metabolismo energético, metabolismo del glucano, de lípidos, cofactores y vitaminas, otros aminoácidos y degradación de xenobióticos.

En la Figura 17 se puede observar el número de genes que participan en cada grupo de vías metabólicas de ambos genomas.

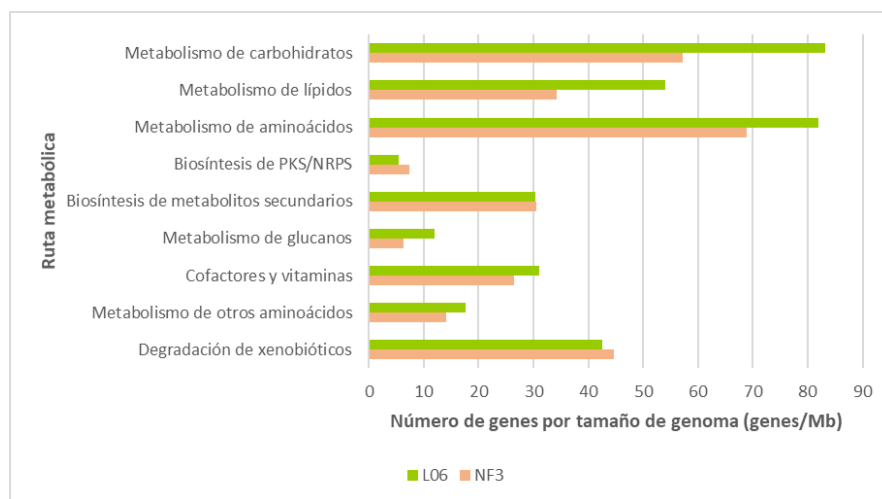


Figura 15 Comparación del número de genes pertenecientes a un grupo de vías metabólicas.

La mayoría de los genes en ambas cepas parecen estar involucrados en el metabolismo de carbohidratos y de aminoácidos. Mientras que el menor número es para el metabolismo de glucanos y la biosíntesis de metabolitos secundarios como policétidos y péptidos no ribosomales.

Aunque el número de genes para la degradación de xenobióticos es mayor que otras rutas en las dos cepas, NF3 parece destinar gran parte de su repertorio genético para este fin.

La comparación genómica nos ayudó a vislumbrar la capacidad metabólica en las cepas secuenciadas, así como ciertas características particulares que las hacen muy interesantes y fuentes de grandes proyectos a futuro. Aunque es claro que entre las especies del género *Streptomyces* hay grandes diferencias en su genoma, con este estudio podemos apreciar la gran separación genética y metabólica de ambas cepas.

f. Búsqueda y análisis de clústeres de genes biosintéticos

Para la identificación de clústeres de metabolitos secundarios se utilizaron las herramientas de antiSMASH 4.0, PRISM y BAGEL3.

Se encontraron 53 BGCs en la cepa NF3 y 23 en la cepa L06. En la Figura 18 se pueden observar el número de clústeres para cada tipo de metabolito encontrado por los programas bioinformáticos en cada cepa.

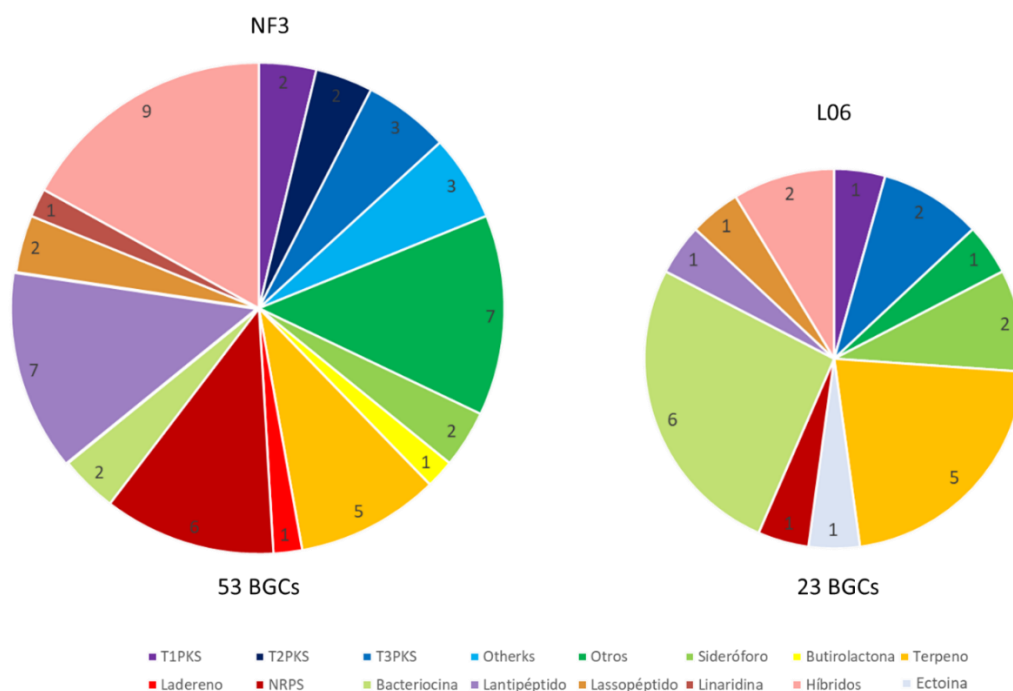


Figura 16 Clústeres de genes predichos para la producción de metabolitos secundarios.

Ambas cepas contienen los clústeres para producir los 3 tipos de policétidos conocidos, sin embargo, NF3 tiene mayor cantidad de clústeres para éstos, así como otro tipo de policétidos conocidos como “otherks” que no son reconocidos entre ninguno de los tres grupos. Los clústeres para la síntesis de NRPS y lantipéptidos son los que tienen mayor número en el genoma, con 7 clústeres para cada uno. No contiene clústeres para la síntesis mixta de oligosacárido con NRPS ni para tiopéptido como es el caso de L06.

Cabe destacar la presencia de dos clústeres en el genoma de NF3 que no son comunes, el clúster para la producción de linaridina y el clúster para la producción de laddereno. Las linaridinas son péptidos ribosomales modificados post-traduccionalmente que han sido encontrados en Streptomyces, sin embargo, su número es bajo (Mo *et al.*, 2017). El laddereno es un compuesto lipídico que fue descubierto por primera vez en bacterias anaerobias capaces de oxidar amonio, pertenecientes al phylum Planctomycetes; a estas bacterias les sirve como protección contra agentes tóxicos como la hidracina y la hidroxilamina (Mercer *et al.*, 2016).

A pesar del menor número de clústeres encontrados en L06, parece ser un gran productor de bacteriocinas y terpenos. Contiene clústeres para la síntesis mixta de oligosacárido con NRPS y para tiopéptidos.

En la Figura 19 se puede observar un mapa de la localización de cada clúster encontrado. Los genomas están divididos por los scaffolds encontrados, indicando el tamaño de los más grandes. Cada tipo de metabolito tiene un color que lo diferencia de otro; se resaltan a las bacteriocinas tipo III debido al interés creado durante la investigación de los clústeres ya que se ha encontrado que tienen función antimicrobiana (Biziulevičius, Biziulevičienė and Kazlauskaitė, 2008; Buist *et al.*, 2008). Como se puede observar en el esquema la mayoría de los clústeres se encuentran a las orillas de los cromosomas. En el caso específico de NF3, el segundo scaffold parece contener una gran cantidad de BGCs y se podría apreciar que justo esos scaffolds podrían pertenecer a los brazos del genoma.

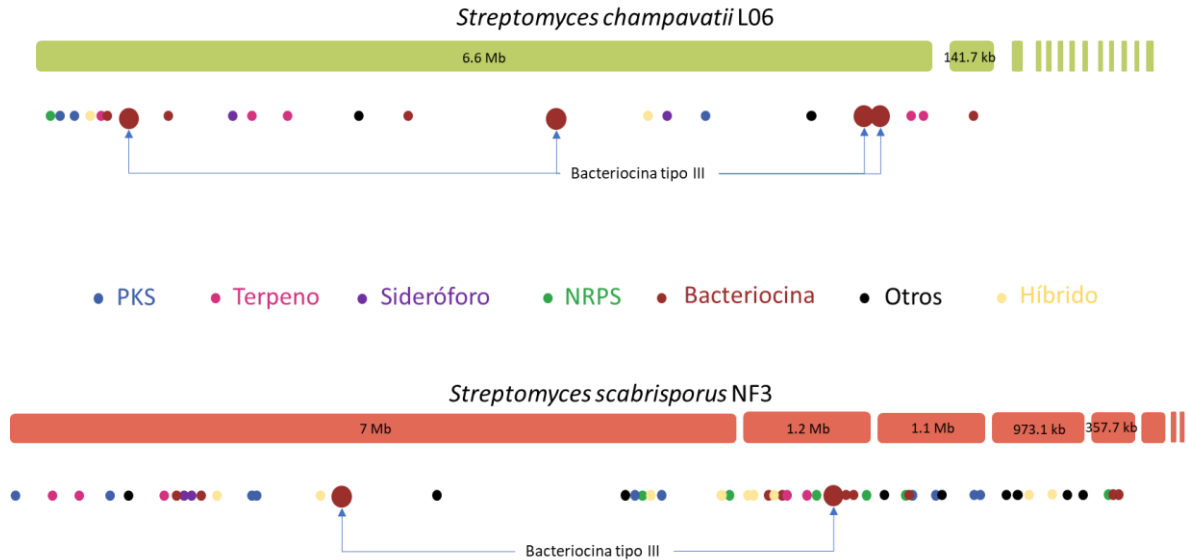


Figura 17 Representación esquemática de los cromosomas y localización de los metabolitos secundarios encontrados. *Streptomyces champavatii* L06 (verde) y *Streptomyces scabrissporus* NF3 (naranja).

Se analizaron cada uno de los clústeres de ambos genomas, evaluando el tamaño, actividad, la similitud con otros y su nivel de dificultad para la expresión heteróloga del clúster.

Selección de clúster para expresión heteróloga

Ya que como planteamiento del problema está la búsqueda de nuevos antibióticos se eligieron las bacteriocinas como los principales metabolitos de interés ya que son ampliamente reconocidas por su actividad antibiótica y se han considerado como el futuro de los antibióticos (Chavan and Riley, 2007; Riley and Chavan, 2007; Gillor, Etzion and Riley, 2008; Desriac *et al.*, 2010; Roces, Rodríguez and Martínez, 2012; Güllüce, Karadayı and Barış, 2013; Hammami *et al.*, 2013; van Heel *et al.*, 2013; Yount and Yeaman, 2013; Bali and Panesar, 2014).

Las bacteriocinas son péptidos ribosomales que se clasifican en 3 tipos según su modo de acción y su tamaño. Las de clase I y II son péptidos pequeños menores a los 30 kDa.

Las bacteriocinas de tipo III son mayores a 30 kDa y también se conocen como bacteriolisinas; algunas de estas son conocidas como peptidoglucano hidrolasas (PGH). Las bacteriolisinas rompen los enlaces glucosídicos o peptídicos en la pared

celular provocando inestabilidad y cambio en la osmolaridad de la célula (Cotter, Hill and Ross, 2005).

A las PGH se les ha visto como potenciales antibióticos e incluso se les ha llegado a denominar enzibióticos (Tiwari *et al.*, 2014). Este tipo de bacteriocinas han sido estudiadas y descubiertas desde hace más de 60 años en bacterias Gram-positivas como *Staphylococcus* y *Enterococcus* (Schindler, 1965; Shockman *et al.*, 1996; Keep *et al.*, 2006; Kumar, 2008; Szweda *et al.*, 2012; Wittekind *et al.*, 2016). También se han evaluado PGHs de bacteriófagos como posibles alternativas a los antibióticos (Putu Sudiarta, Fukushima and Sekiguchi, 2010; Schmelcher, Donovan and Loessner, 2012; Rodríguez-Rubio *et al.*, 2013).

Hasta el momento de la escritura del presente trabajo no se han encontrado estudios de PGH en *Streptomyces* cuya finalidad sea la aplicación de éste como antibiótico; sin embargo hay estudios en donde se han evaluado para diferenciación morfológica en este género (Haiser, Yousef and Elliot, 2009; Sexton *et al.*, 2015). Por esta razón se decidió seguir el estudio y análisis dirigido hacia las bacteriocinas tipo III.

Comúnmente, debido a que su finalidad es la renovación de la pared celular, los clústeres consisten en el gen codificante de la bacteriocina el cual contiene un péptido señal y a la que se le considera la transglicosilasa o la péptidas que hace el recambio de los peptidoglucanos, y un gen que codifica para un transportador de glucósidos, entre otros.

Utilizando las tres herramientas bioinformáticas previamente mencionadas, se encontraron 6 BGCs para la producción de estos metabolitos en ambas cepas. En *S. champavatii* L06 se encontraron 4 clústeres mientras que en *S. scabrisporus* se encontraron 2 (Figura 20).

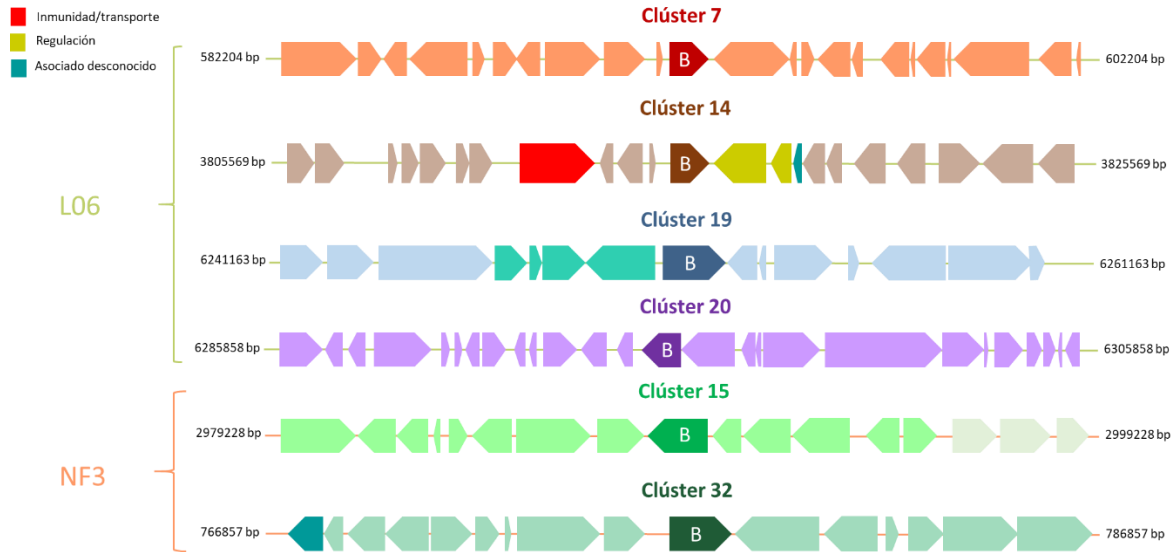


Figura 18 Clústeres de genes para la síntesis de bacteriocinas tipo III. En cada clúster se marca con una B el gen codificante para la bacteriocina. Otros genes reconocidos vienen marcados de un color cuya función se puede encontrar en la leyenda de la izquierda. Se indica la localización dentro del genoma de la cepa.

El clúster 7 de L06 fue identificado por un gen reconocido como peptidasa. El clúster contiene 19 genes entre los cuales hay reguladores tipo TetR, isomerasas y una carboxipeptidasa la cual contiene un dominio de PhoPB, un factor de virulencia. Hay una sección del clúster similar a una parte del clúster de kanamicina de *Streptomyces kanamyceticus*.

El clúster 14 de LO6 contiene en total 19 genes. Los genes presentes no parecen tener una relación con la peptidasa por la cual fue identificado el clúster. Entre los genes están reguladores transcripcionales específicos para carbohidratos, un sistema de regulación de dos componentes y una proteasa cuya función es eliminar proteínas intracelulares relacionadas con choque térmico. Sin embargo, también se encontró un gen identificado como Toxina Z el cual inhibe la síntesis de peptidoglucanos y también dos reguladores transcripcionales de la landomicina (antitumoral), LanK y LanR (Ostash *et al.*, 2010; Yang, Fu and Yu, 2011).

El clúster 19 fue reconocido por un gen identificado como transglicosilasa. La herramienta BAGEL3 identificó 14 genes, sin embargo 4 de ellos son genes para la síntesis del pigmento indigoidina el cual contiene actividades antioxidantes y antimicrobianas; en este caso, se tienen los genes necesarios para su síntesis

(Brachmann *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2013; Olano *et al.*, 2014; Xu, Gage and Zhan, 2015). Justo antes del inicio de los genes para la síntesis del pigmento se encuentra una transposasa con un elemento móvil previo. La transglicosilasa reconocida parece estar relacionada con fagos, factores de virulencia y enzimas líticas (Koonin and Rudd, 1994; Thunnissen *et al.*, 1995; Mushegian *et al.*, 1996; Koraimann, 2003); seguido de este gen se encuentra un transportador de carbohidratos, el cuál como se mencionó antes suele estar cerca de las PGHs. El resto de los genes no parecen tener una relación con la transglicosilasa.

El clúster 20 contiene 19 genes identificados. Fue reconocido por una proteína asociada a la Linocina M18, las cuales son reconocidas por encapsular peroxidasas como la peroxidasa tipo DyP y también como parte de las cápsides de fagos (Valdés-Stauber and Scherer, 1994; Valdes-Stauber and Scherer, 1996; Sugano *et al.*, 2000; Sutter *et al.*, 2008; Colpa, Fraaije and van Bloois, 2014). Contiene un gen codificante de una toxina denominada PenK, la cual es capaz de inhibir el crecimiento. Entre el resto de los genes se encuentran reguladores transcripcionales, oxidorreductasas y metiltransferasas.

Para NF3, se encontraron 2 clústeres involucrados con las bacteriocinas tipo III. El clúster 15 parece ser el que contiene más genes relacionados con la síntesis y recambio de la pared celular; contiene al menos 6 genes relacionados con la síntesis de pared celular como la dehidrorhaminosa reductasa y la glucosa deshidratasa. Contiene un gen que parece aumentar la actividad de amidasas, como con la colicina, a la cuál le ayuda a entrar en contacto con su blanco (Carr *et al.*, 2000; Bonsor *et al.*, 2009). En el clúster 32 sin embargo, la mayoría de sus genes se identifican como proteínas hipotéticas, aunque algunas son reconocidas como deacetilasas y lactonasas. La bacteriocina identificada en ambos clústeres es una transglicosilasa.

Todos los clústeres con excepción del clúster 20, el cual ya no será mencionado, fueron reconocidos por la similitud parcial con la Zoocina A, ya sea de la peptidasa o la transglicosilasa identificadas. La zoocina A es una bacteriolisina producida por *Streptococcus equi* supsp. *Zooepidermicus* la cual ataca a diferentes especies de

Streptococcus (Simmonds, Simpson and Tagg, 1997; Lai, Tran and Simmonds, 2002; Akesson *et al.*, 2007). El dominio catalítico de la Zoocina A, y que se encuentra en las proteínas identificadas, es el dominio de Peptidasa M23, el cual hidroliza los enlaces peptídicos de los peptidoglucanos en la pared celular (Bamford *et al.*, 2010; Grabowska *et al.*, 2015). Este dominio también está presente en otras bacteriolisinas como LytM y Lisostafina, ambas producidas por cepas de *Staphylococcus* (Bastos, Coutinho and Coelho, 2010; Singh, Carlos and Singh, 2010; Sabala *et al.*, 2012). En la Tabla 7 se muestra una breve descripción de los clústeres encontrados.

Tabla 7 Clústeres de genes predichos por BAGEL3 para la producción de bacteriocinas.

Cepa	Número de clúster	Reconocimiento por	Número de genes	Dominios catalíticos/unión de la bacteriocina/PGH
L06	7	Zoocina A	19	Peptidasa M23 / LysM
L06	14	Zoocina A	19	Peptidasa M23
L06	19	Zoocina A	14	Transglicosilasa y peptidasa M23 / LysM
L06	20	Linocina M18	19	Linocina M18
NF3	15	Zoocina A	18	Transglicosilasa y peptidasa M23 / LysM
NF3	32	Zoocina A	15	Transglicosilasa y peptidasa M23 / LysM

En la figura 21 se pueden observar los dominios catalíticos y de unión de las bacteriolisinas encontradas. En todas, menos en la presente en el clúster 20 de L06, está presente el dominio de Peptidasa M23.

El dominio LysM es un dominio de unión el cual reconoce y se une de manera no covalente a la N-acetilglucosamina (NAG); en general, sin este dominio las PGHs no pueden ejercer su actividad (Spaink, 2004; Buist *et al.*, 2008; Mesnage *et al.*, 2014; Najjari *et al.*, 2016). Este dominio está presente en los clústeres 7 y 19 de la cepa L06 y en ambos clústeres de la cepa NF3.

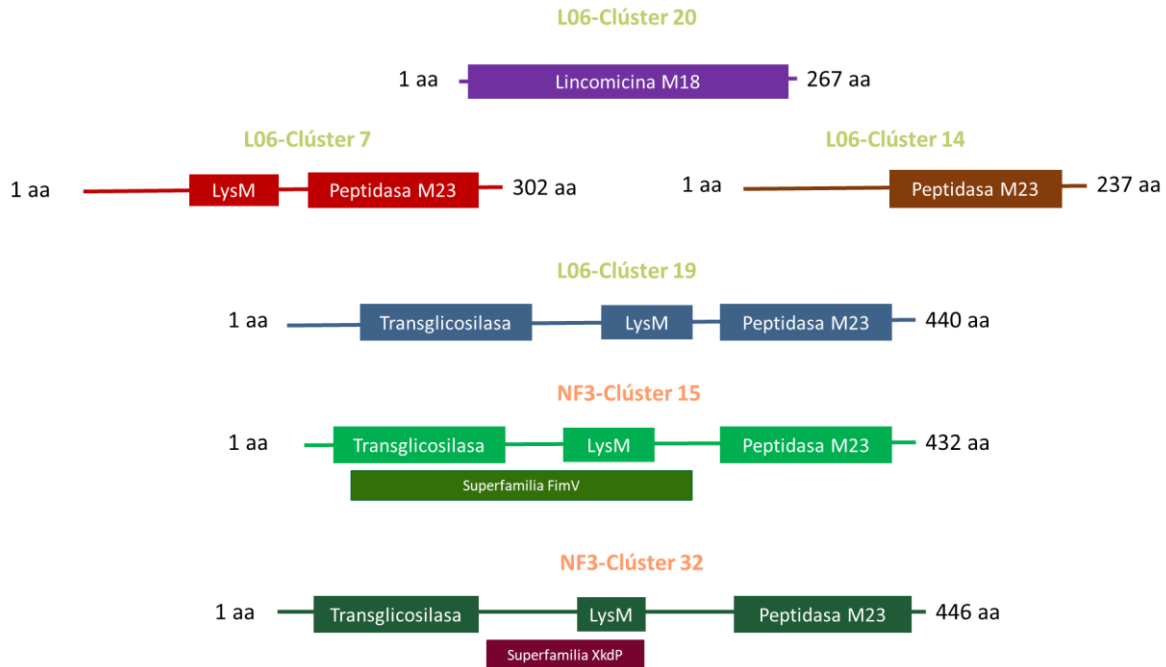


Figura 19 Dominios catalíticos y de unión. Se muestran los dominios de las 6 bacteriolisinas encontradas, así como el número de aminoácidos y la localización del dominio.

El otro dominio catalítico es el de transglicosilasa, el cual se encarga de cortar los enlaces β -(1-4) glucosídicos entre las cadenas glucosídicas de los péptidoglicanos. El ejemplo más común de una proteína con este dominio es la lisozima (García-Cano *et al.*, 2015). Este dominio está presente el clúster 19 de la cepa L06 y en ambos clústeres de la cepa NF3.

El clúster 15 de *S. scrubriporus* NF3 parece tener un dominio el cuál cubre los dominios de transglicosilasa y LysM; este dominio pertenece a la Superfamilia FimV. Las proteínas pertenecientes a esta familia están involucradas en sistemas de secreción requeridas para la movilidad por pili; aunque no se ha hallado una relación entre la función de este dominio y peptidoglucano hidrolasas, se ha sugerido que estas últimas podrían romper la pared celular y permitir el paso del pili a través de la pared celular (Wehbi *et al.*, 2011; Carter *et al.*, 2017).

El clúster 32 tiene un dominio que cubre el final del dominio de transglicosilasa y el dominio de unión LysM, este dominio pertenece a la superfamilia XkdP. El dominio parece ser un elemento PBSX de fagos, sin embargo, no hay literatura sobre la función de este dominio ni de sus requerimientos para su función.

Se realizó un alineamiento múltiple entre las seis secuencias para encontrar los sitios más diferentes, así como los más similares (Figura 22).



Figura 20 Alineamiento múltiple de las bacteriolisinas. Dominios: Transglucosilasa (verde), LysM (azul), Peptidasa M23 (rojo). En morado se subraya la sección de repeticiones. Alineamiento hecho por Clustal omega (Sievers *et al.*, 2014).

Se puede apreciar que las proteínas de los clústeres 15 y 32 de NF3 y la del clúster 19 de L06 son las más parecidas, aunque no tan similares en el sitio del dominio de unión. Entre las secuencias de NF3 hay una gran similitud en la región del dominio de transglicosilasa, siendo la del clúster 19 de L06 ligeramente diferente. Cabe destacar que en la secuencia del clúster 19 de L06 contiene entre los dominios Lys M y de Peptidasa M23 unas repeticiones de Alanina y Lisina, las cuales no están presentes en las otras proteínas, y cuya función es desconocida.

Por medio del programa Circoletto (Darzentas, 2010) se hizo un mapa estilo circos utilizando como referencia a la bacteriolisina del clúster 19 de *S. champavatii* L06 debido a que presenta mayor similitud con las demás secuencias de al menos el 50%.

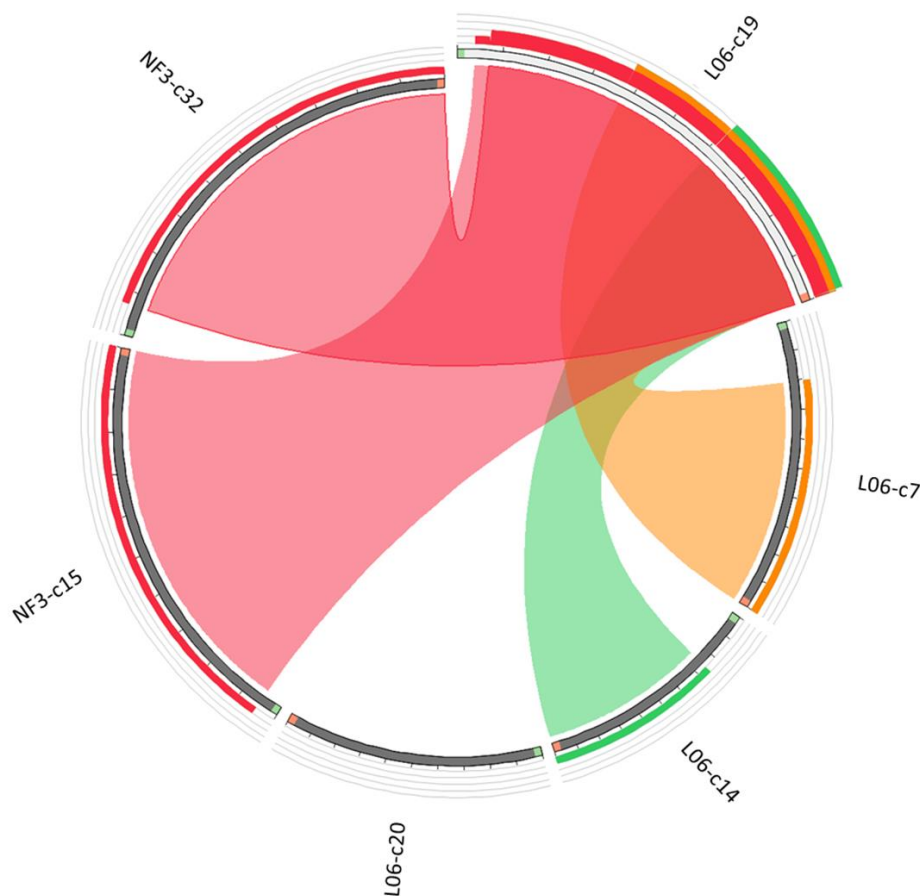


Figura 21 Diagrama circos de las bacteriolisinas. Porcentaje de similitud: Rojo (100-75%); naranja (75-50%); verde (50-25%). (Darzentas, 2010)

El programa señala la similitud por medio de colores, cada color representando un 25% más de similitud: azul es menor a 25%, verde es entre 25 y 50 %, naranja es entre 50 y 75% y rojo es entre 75 y 100%. Como se puede observar en la Figura 23, las bacteriocinas de los clústeres de NF3 son las más parecidas, aunque cubren una distancia ligeramente diferente en la bacteriocina del clúster 19. La del clúster 7 de L06 sigue en similitud, cubriendo los dominios LysM y Peptidasa M23, mientras que la del clúster 14 de la misma cepa, tiene una similitud menor al 50% cubriendo solamente el dominio de la Peptidasa M23. Lo que era de esperar era que la bacteriocina del clúster 20 de la cepa L06 no tuviera ninguna similitud debido a las diferencias en dominios catalíticos.

Como se pudo observar se fueron eliminando los clústeres hasta quedar con 3: 19 (L06), 15 (NF3) y 32 (NF3). Aunque las proteínas parecen tener las mismas características es importante tomar en cuenta los dominios y los genes presentes en el clúster.

La proteína del clúster 32 (NF3) cuenta con el dominio perteneciente a la superfamilia XkdP, el cual no se conoce su función; cuenta con 8 proteínas hipotéticas, y al no saber su función ni relevancia para el funcionamiento de la peptidoglucano hidrolasa lo elimina como candidato para la expresión heteróloga en este proyecto.

El clúster 15 (NF3) cuenta con diferentes genes relacionados con la síntesis de la pared celular, entre ellos uno que parece aumentar la actividad de amidasas y que podría ser necesario para su función. Por su dominio FimV, la proteína podría estar relacionada con la secreción del pili, lo que podría afectar su función como peptidoglucano hidrolasa. Por lo que este clúster también fue eliminado como candidato para su expresión heteróloga.

El clúster 19 (L06) parece tener sólo un gen involucrado con el recambio de la pared celular aparte de la bacteriocina, el transportador. El clúster presente para la síntesis de indigoidina no debe afectar la función de la PGH ni el resto de los genes. No presenta otros dominios cuya actividad pueda variar de la de hidrolasa. Por estas

razones este gen fue elegido. En la Figura 24 se hace una representación de lo que se consideró el clúster 19 así como de los dominios funcionales de la bacteriocina Tipo III.

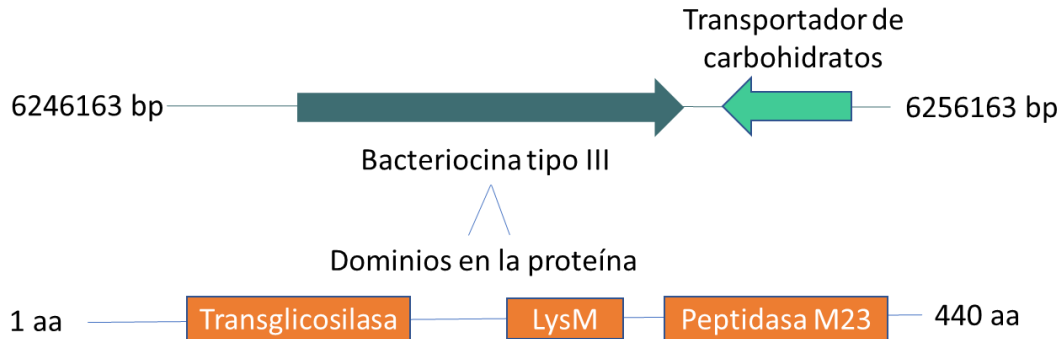


Figura 22 Representación gráfica del Clúster 19 de *Streptomyces champavatii* L06.

Debido a la alta posibilidad de que la bacteriocina tipo III perteneciente al clúster 19 de *S. champavatii* L06 tenga una actividad antibiótica decidimos continuar el trabajo con ésta.

Propiedades físico-químicas de la bacteriocina tipo III

Por medio del programa ProtParam se obtuvo que la bacteriocina tiene un peso de 44.4 kDa así como un punto isoeléctrico de 10.0 (Gasteiger *et al.*, 2005).

g. Expresión heteróloga del clúster 19 de *S. champavatii* L06

I. Clonación del gen de la bacteriocina del clúster 19 de *S. champavatii* L06

❖ Construcción de pET-22b-B

Los primeros cebadores utilizados se diseñaron según la anotación obtenida por PROKKA. Los genes a amplificar fueron el gen de la bacteriocina, el gen del transportador y el clúster para la síntesis de la indigoidina; estos últimos debido a la cercanía con la bacteriocina.

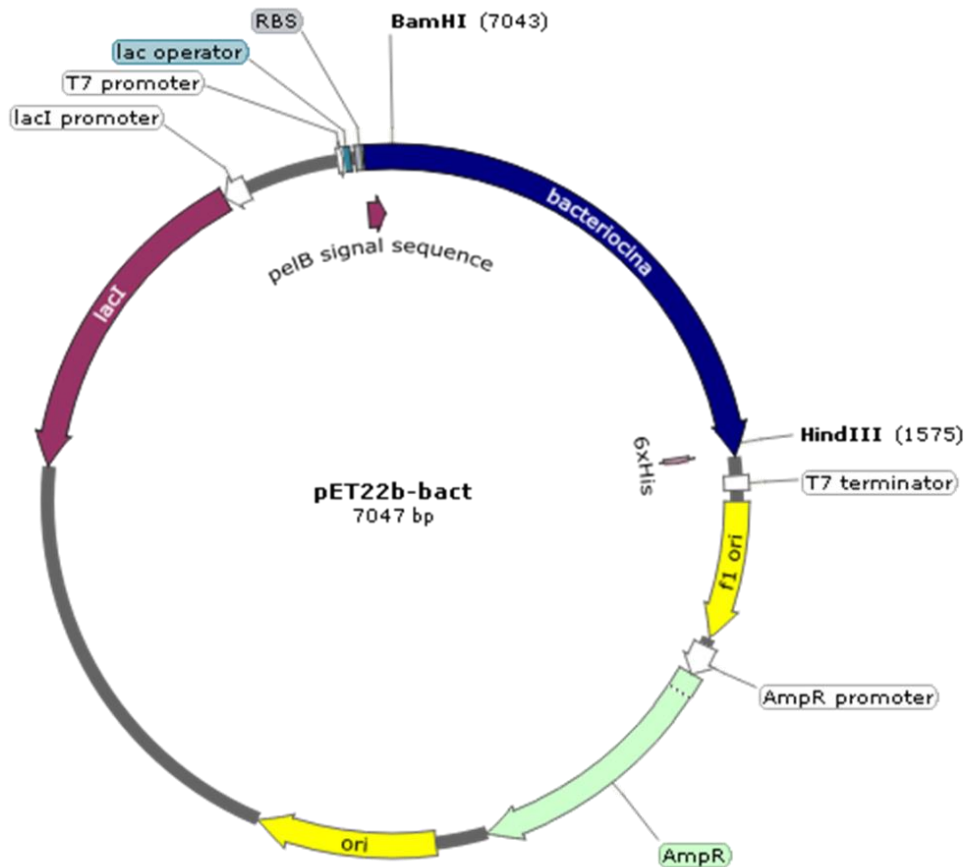


Figura 23 Construcción pET-22b-B

Los cebadores para la bacteriocina se hicieron con las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción *HindIII* y *BamHI* (Tabla 4), las cuales cortan de igual forma el plásmido pET-22b (Anexo 4). El diseño se hizo de tal forma que la secuencia de la bacteriocina estuviera en marco de lectura con la cola de histidinas. De tal manera que el diseño quedó como se muestra en la Figura 25.

Se realizaron las PCRs utilizando los cebadores para cada uno de los fragmentos buscados. Como se puede ver en la Figura 26 se pudo lograr la amplificación, en los tres casos, con el tamaño esperado. De la bacteriocina se esperaba un tamaño alrededor de 1,500 bp, del transportador cerca de 800 bp, y del fragmento que contemplan los genes para la síntesis del terpeno índigo se esperaba entre 4,500-5,000 bp. Como control negativo se realizó la reacción de amplificación agregando agua miliQ en lugar de ADN.

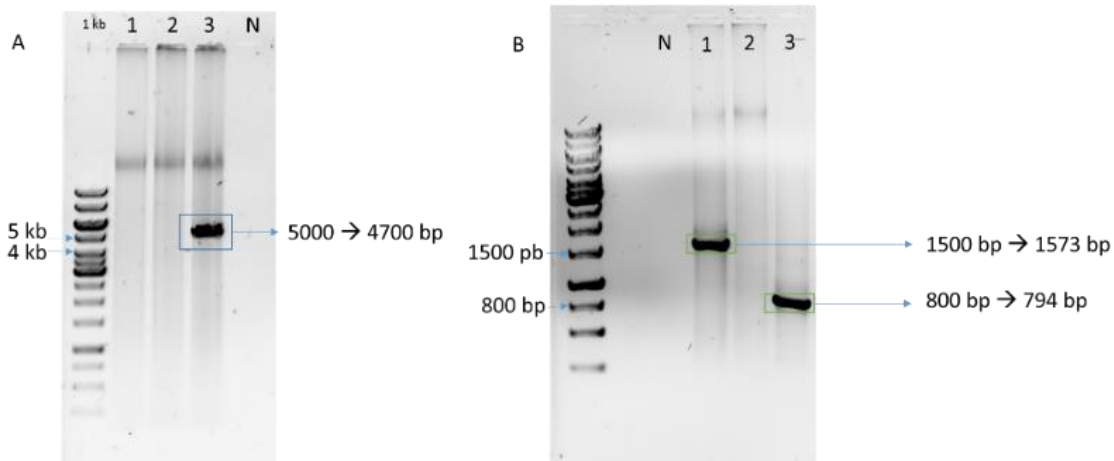


Figura 24 Electroforesis de las amplificaciones por PCR. Los primeros carriles es el marcaje del peso molecular. A: 1, bacteriocina-transportador TPT; 2, clúster completo; 3, segmento de índigo, el tamaño esperado es de 4700 bp; N, control negativo. B: N, control negativo; 1, bacteriocina, tamaño esperado 1573 pb; 2, bacteriocina-transportador TPT; 3, transportador TPT

Se ligó el fragmento de 1,573 bp al plásmido pET-22b como se explica en la metodología y se clonó en *E. coli* DH5 α . Se confirmó el plásmido por medio de la digestión con la enzima de restricción *Hind*III, lo que linealizó la construcción dando un fragmento un poco de alrededor de 7,000 bp (Figura 27).

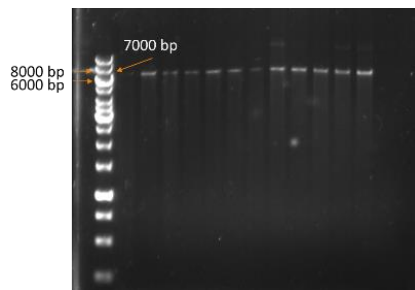


Figura 25 Construcción pET-22b-B1. Comprobación de la construcción de pET22b con el fragmento de 1573 bp de la bacteriocina, por medio de digestión enzimática con *Hind*III

Se volvió a hacer una revisión de las anotaciones, ahora incluyendo las hechas por PRODIGAL y RAST. Se encontró que la anotación del gen de la bacteriocina en estudio tiene un tamaño diferente. Por lo que se hizo un alineamiento de las dos secuencias con ClustalW (Figura 28). En el alineamiento se puede observar que en realidad son las mismas proteínas con la diferencia de alrededor de 90 aminoácidos o cerca de 300 nucleótidos en la secuencia genética.


```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

fig|68184.3.peg.6736|
bacteriocin      -----
MAVSLTRSGRQKGKGRASGQYRRAAAGPRARRRLPAARHPHTRPPRADPVPRAPVVRPLVT

fig|68184.3.peg.6736|
bacteriocin      -----MAVRGRHRRRQQSRINRASLTVTAGGAGLAL
ERSPPLRSGPHTTPGRGGPRARKSQGGPVMAVRGRHRRRQQSRINRASLTVTAGGAGLAL
*****

fig|68184.3.peg.6736|
bacteriocin      PLVAAGTADAASADTWAKVAACESSGDWSINTGNGYYGGLQFKQSTWEAYGGGAYASRAD
PLVAAGTADAASADTWAKVAACESSGDWSINTGNGYYGGLQFKQSTWEAYGGGAYASRAD
*****

fig|68184.3.peg.6736|
bacteriocin      LASKDQQIAVAIAEKVLDGQGGAWPACSQKAGLTRGGPAPAPEAAPPPRAKAPAATPTT
LASKDQQIAVAIAEKVLDGQGGAWPACSQKAGLTRGGPAPAPEAAPPPRAKAPAATPTT
*****

fig|68184.3.peg.6736|
bacteriocin      TPQSKAGTAEMYTVVRGDTLSQIAEEQRVKGGWQRLYQANRERVGTDPDLIVPGQRLQLK
TPQSKAGTAEMYTVVRGDTLSQIAEEQRVKGGWQRLYQANRERVGTDPDLIVPGQRLQLK
*****

fig|68184.3.peg.6736|
bacteriocin      PGAATPPKDRPAPRAKDRGTGPEPTGKQAAAKAAEAKKAADAKKAAEARKAEEARKAAAAK
PGAATPPKDRPAPRAKDRGTGPEPTGKQAAAKAAEAKKAADAKKAAEARKAEEARKAAAAK
*****

fig|68184.3.peg.6736|
bacteriocin      KAEKAAKAAAKKAAEAKKVSAPSSPRFSSPVDAGTGTTPYRASGSSWSKGYHTGVDFPV
KAEKAAKAAAKKAAEAKKVSAPSSPRFSSPVDAGTGTTPYRASGSSWSKGYHTGVDFPV
*****

fig|68184.3.peg.6736|
bacteriocin      PTGTSVKAAASGTVVSAGWGGSYGYQVVIKHTDGKYSQYAHLSALTVRSGQSVQAGQRIA
PTGTSVKAAASGTVVSAGWGGSYGYQVVIKHTDGKYSQYAHLSALTVRSGQSVQAGQRIA
*****

fig|68184.3.peg.6736|
bacteriocin      RSGSTGNSTGPHLHFVRTGPGFGSDIDPLAYLRGGGVKV
RSGSTGNSTGPHLHFVRTGPGFGSDIDPLAYLRGGGVKV
*****

```

Figura 26 Alineamiento de las secuencias de bacteriocina tipo III con diferentes anotaciones.

Se realizó la búsqueda del péptido señal en la proteína codificada por el gen de la bacteriocina identificado en ambas anotaciones. Se utilizó la herramienta SignalP para este propósito. Cuando se usa el gen anotado por Prokka para el análisis, no es posible encontrar el péptido señal; sin embargo, si se usa la anotación de RAST, PRODIGAL, así como la obtenida en BAGEL3, las cuales son las mismas secuencias, se encuentra un péptido señal de 41 aminoácidos, el cual tiene su sitio de corte entre los aminoácidos A41 y S42 (Figura 29).

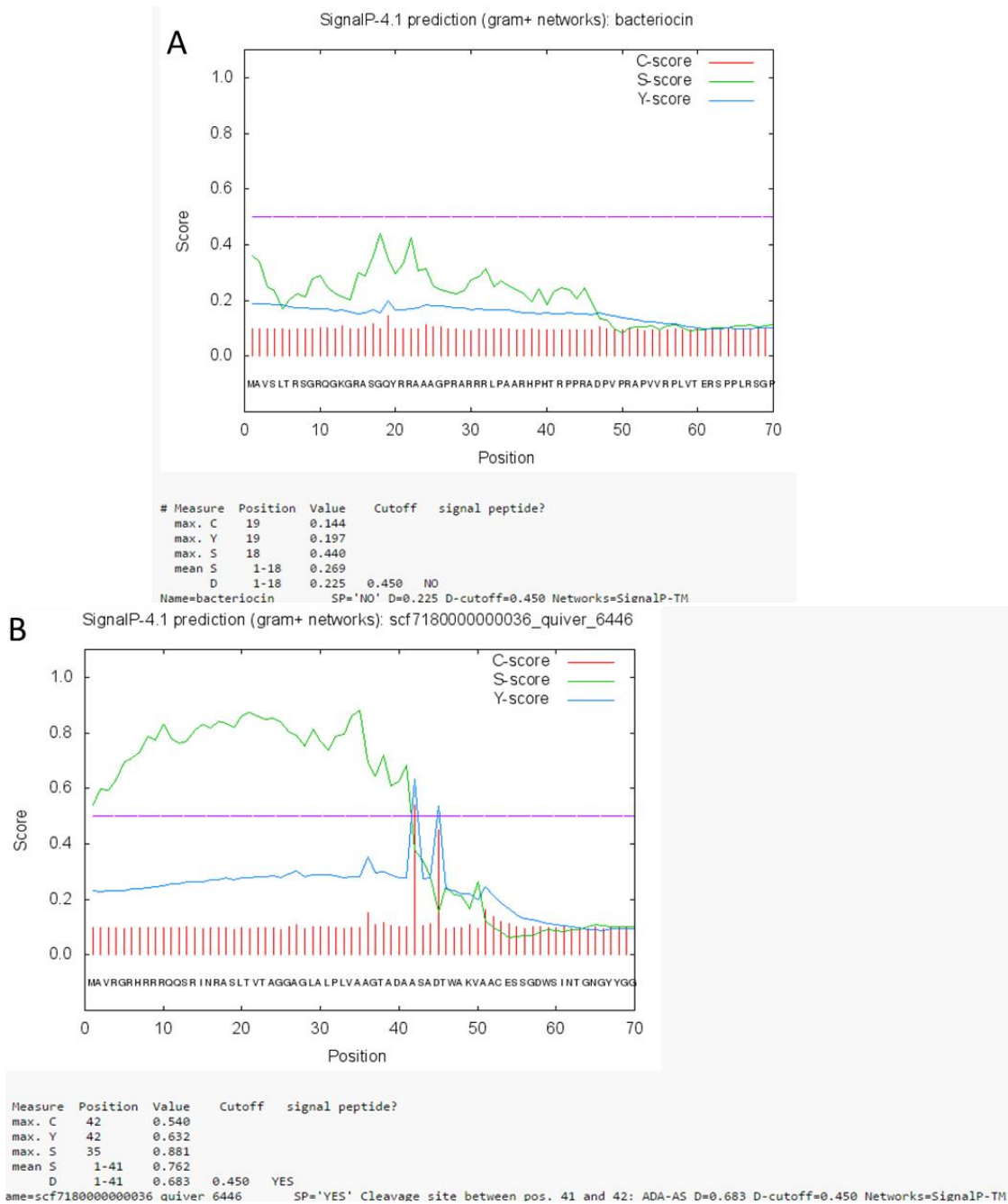


Figura 27 Predicción del péptido señal con SignalP. A) Gen anotado por Prokka; B) Gen anotado por RAST y PRODIGAL.

Debido a estos resultados se decidió volver a hacer el diseño de la expresión, por lo que el proceso anterior se tuvo que repetir. Se mandaron a sintetizar nuevos oligonucleótidos denominados B2.

Se hizo el PCR con los nuevos oligonucleótidos obteniendo una banda de alrededor de 1200 bp como era esperado (Figura 30).

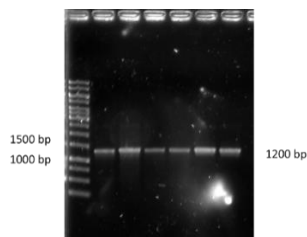


Figura 28 PCR del gen de la bacteriocina de 1200 bp

Se hizo la ligación de nuevo en pET22b y se clonó en *E. coli* DH5 α . Se obtuvo el plásmido con la ligación y se comprobó por medio de las enzimas de restricción *Hind*III, donde el fragmento esperado es de 6,768 bp, *Not*I, donde se esperaban fragmentos de 6,270 bp y 498 bp, y *Kpn*I, donde los fragmentos esperados eran de 5,912 bp y 852 bp. Como se puede ver en la Figura 31, los fragmentos son correctos con las 3 enzimas tanto para el plásmido ligado como para los controles con el plásmido vacío y con el producto de PCR. Se denominó a la construcción como pET22b-B2.

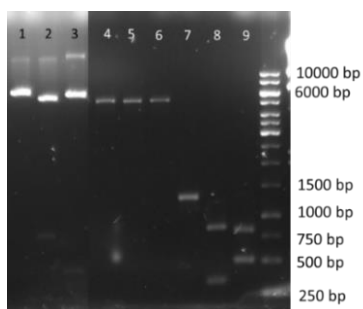


Figura 29 Comprobación de la construcción pET-22b-B2. 1) pET-22b-B2 / *Hind*III, 2) pET22b-B2 / *Kpn*I, 3) pET-22b-B2 / *Not*I, 4) pET-22b / *Hind*III, 5) pET-22b / *Kpn*I, 6) pET-22b / *Not*I, 7) Bact2 / *Hind*III, 8) B2 / *Kpn*I, 9) B2 / *Not*I

II. Expresión de la bacteriocina (pET22b-bact2)

Se transformó con la construcción pET-22b-B2 a *E. coli* BL21 para la producción de la bacteriocina.

Se realizaron diferentes ensayos modificando la temperatura de expresión de 4°C, 16°C, 20°C, 29°C y 37°C; modificando así mismo las concentraciones de IPTG de 0.25 mM, 0.5 mM, 1 mM y 2 mM; y modificando el tiempo de inducción de 2 h, 4 h,

6 h, 9 h, 12 h, 18 h, 24 h y 36 h. Sin embargo, en ninguna de las condiciones se pudo encontrar la expresión de la bacteriocina como se muestra en la Figura 32.

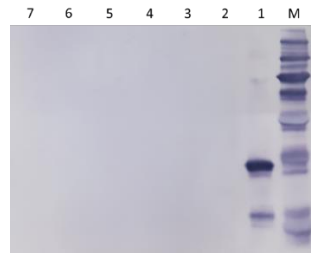


Figura 30 Western Blot de la expresión de pET-22B-B2 en *E. coli* BL21 a 30°C después de la inducción con IPTG. M: marcador de peso molecular; 1: control positivo; 2: *E. coli* BL21; 3: *E. coli* BL21 pET-22b; 4: *E. coli* BL21 pET-22b-B2 0.25 mM IPTG; 5: *E. coli* BL21 pET-22b-B2 0.5 mM IPTG; 6: *E. coli* BL21 pE-T22b-B2 1 mM IPTG; 7: *E. coli* BL21 pET-22b-B2 2 mM IPTG

Esto pudo ser debido a la preferencia de codones de la cepa BL21 que sólo contiene como codones extra a AGG/AGA, AUA y CUA, y no contiene codones ricos en G+C, los cuales son necesarios para la producción de algunas proteínas de *Streptomyces*.

Se decidió utilizar a *E. coli* ROSETTA, una cepa derivada de BL21 la cual contiene el material para el uso de los codones CGG, CCC y GGA, para expresar el gen de la bacteriocina. Se logró encontrar la expresión de la bacteriocina a las 6 h de inducción con 1 mM de IPTG a 29°C. Se sonicaron las células para separar las fracciones solubles e insolubles, sin embargo, se puede observar que la expresión de la proteína se encuentra en la fracción insoluble (Figura 33).

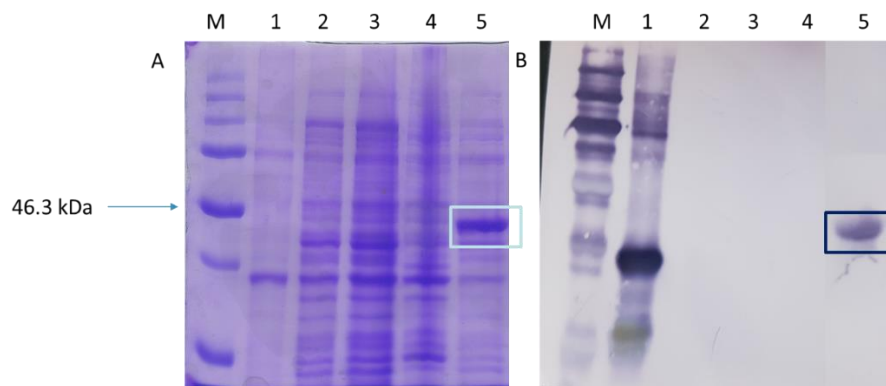


Figura 31 Expresión de la bacteriocina en *E. coli* ROSETTA pET-22b-B2. A, SDS-PAGE; B, Western-Blot. M: marcador de peso molecular; 1: control positivo; 2: *E. coli* ROSETTA; 3: *E. coli* ROSETTA pET-22b; 4: *E. coli* ROSETTA pET-22b-B2 SN; 5: *E. coli* ROSETTA pET-22b-B2 PELLET

Debido a la presencia de la proteína en la fracción insoluble se llegó a la conclusión de que se estaban formando cuerpos de inclusión. Se ha encontrado que el cultivo con etanol puede mejorar el plegamiento de las proteínas heterólogas, por lo que su producción se ve aumentada y los cuerpos de inclusión disminuidos (Chhetri, Kalita and Tripathi, 2015). Se cultivó a *E. coli* ROSETTA con pET-22b-B2; al día siguiente del preinóculo se agregaron 1.5% y 3% de etanol en el cultivo previo a la inducción. Se logró aumentar la cantidad de proteína buscada, sin embargo, no se obtuvo suficiente proteína en la fracción soluble (Figura 34).

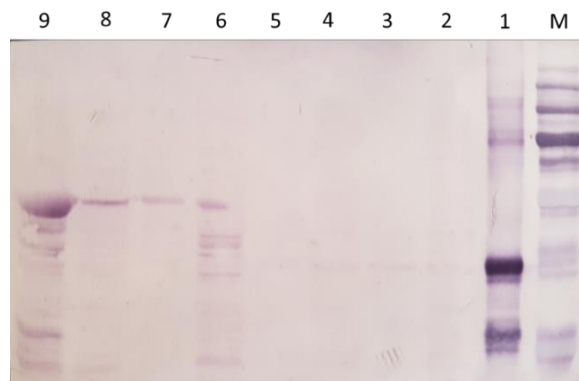


Figura 32 Western-Blot de la expresión de la bacteriocina en *E. coli* ROSETTA pET-22b-B2. M: marcador de peso molecular; 1: control positivo; 2: *E. coli* ROSETTA pET-22b SN s/OH; 3: *E. coli* ROSETTA pRT-22b PELLET s/OH; 4: *E. coli* ROSETTA pET-22b SN 1.5% OH; 5: *E. coli* ROSETTA pET-22b-B2 PELLET 1.5% OH; 6: *E. coli* ROSETTA pET-22b-B2 SN s/OH; 7: *E. coli* ROSETTA pET-22b-B2 PELLET s/OH; 8: *E. coli* ROSETTA pET-22b-B2 SN 1.5% OH; 9: *E. coli* ROSETTA pET-22b-B2 PELLET 1.5% OH

El gen de la bacteriocina fue clonado junto con la secuencia del péptido señal. Haciendo un análisis bioinformático en búsqueda de dominios transmembranales, se encontró un dominio de 41 aa el cuál formaba una hélice que el programa considera transmembranal como se muestra en la Figura 35; este dominio corresponde al péptido señal. Con estos resultados, se hipotetizó que la bacteriocina se encuentra translocada, sólo por el péptido señal, en la membrana plasmídica de *E. coli*.

Si la proteína estaba correctamente plegada y sólo estaba atrapada en la membrana por el péptido señal y el resto de la proteína se encontraba por fuera como lo indica el programa TMHMM (Figura 35), entonces la bacteriocina podría ser capaz de tener actividad.

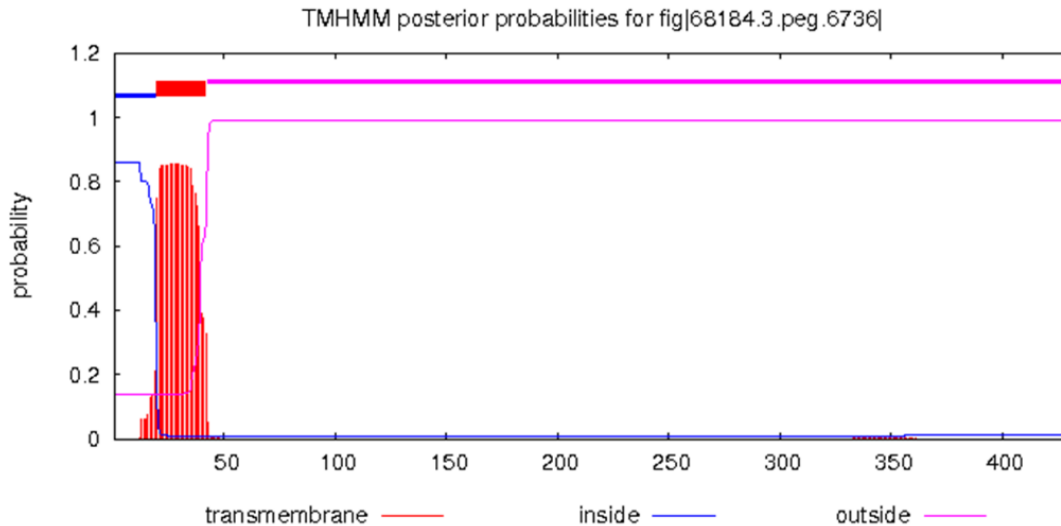


Figura 33 Análisis de dominios transmembranales por el servidor informático TMHMM. Línea azul: secuencia intracelular; línea roja: secuencia transmembranal; línea rosa: secuencia extracelular

h. Evaluación de la actividad del producto obtenido

I. Zimogramas

Se realizaron zimogramas utilizando la biomasa de cultivos esterilizados en autoclave de los siguientes microorganismos: *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* ROSETTA pET-22b-B2, *Pseudomonas* sp., *Streptomyces lividans*, *Streptomyces coelicolor* M1152, *Streptomyces scabrisporus* NF3 y *Saccharomyces cerevisiae*. Se hicieron tres repeticiones de los zimogramas por cada cepa; se utilizaron los extractos proteicos de sobrenadante y pellet de la cepa *E. coli* ROSETTA pET-22b vacío, y el sobrenadante del extracto proteico de *E. coli* ROSETTA pET-22b-B2 como controles negativos de la actividad lítica. Se utilizó la fracción insoluble del cultivo con 1.5% de etanol. En todos los casos se tomaron 40 µg de proteína total.

En la Figura 36 se muestra el zimograma contra *M. luteus* utilizando 40 µg de extracto total de proteína de la fracción insoluble. Se muestran los carriles de los controles negativos, así como el marcador de peso molecular para proteínas.

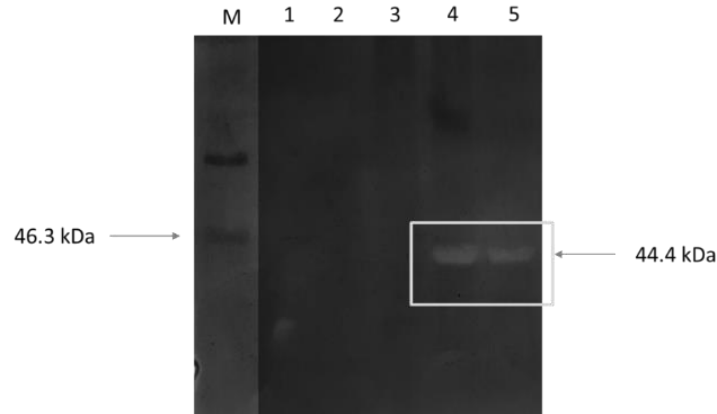


Figura 34 Zimograma de la actividad lítica de la bacteriocina contra *M. luteus*. M: marcador de peso molecular; 1: *E. coli* ROSETTA pET-22b SN; 2: *E. coli* ROSETTA pET-22b PELLET; 3: *E. coli* ROSETTA pET-22b-B2 SN; 4: *E. coli* ROSETTA pET-22b-B2 PELLET 1.5% OH; 5: *E. coli* ROSETTA pET-22b-B2 PELLET 3% OH

En la Tabla 8 se muestra el resumen de los resultados de los zimogramas realizados, así como la imagen de cada banda según el microorganismo correspondiente. En ninguno de los geles sale alguna banda en los controles negativos.

Tabla 8 Zimogramas de peptidoglucano hidrolasas contra diferentes microorganismos.

Microorganismo	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i> RO-SETTA	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>S. lividans</i>	<i>S. scabrisporus</i> NF3	<i>S. coelicolor</i> M1152	<i>S. cerevisiae</i>
Control – (pET22b)	x	x	x	x	x	x	x	x	✓
Bacteriocina	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Imagen									

Al obtener actividad lítica contra las paredes celulares de las bacterias probadas, se utilizó la biomasa esterilizada de *S. cerevisiae* como control negativo de la actividad lítica esperando la bacteriocina no rompiera su pared. Sin embargo, como se puede observar en la Tabla 8, hay actividad lítica. Incluso otra banda menor cerca de los

20 kDa, la cual se consideró como una hidrolasa de *E. coli* ya que también se encontraba presente en los otros carriles.

La razón de la actividad lítica de la bacteriocina en la levadura se puede explicar por la presencia de quitina, polímero de NAG el cual es cortado por las transglicosilasas (Cabib and Arroyo, 2013), sin embargo al no contar con una quitinasa como control positivo no se puede aseverar esta hipótesis.

Con estos resultados se pudo probar la actividad lítica de la bacteriocina del clúster 19 de *S. champavatii* L06 en *M. luteus*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* ROSETTA pET-22b-B2, *Pseudomonas* sp., *S. lividans*, *S. coelicolor* M1152, *S. scabrisporus* NF3 y *S. cerevisiae*.

II. Actividad de peptidoglucano hidrolasa (PGH) utilizando 4-Nitrofenil N-acetil- β - D-glucosamina

Se realizó un ensayo colorimétrico para medir la actividad de glucoaminidasa utilizando 4-nitrofenol N-acetil- β -D-glucosamina que al ser hidrolizado libera 4-nitrofenol. La reacción se vuelve de un color amarillo que puede ser cuantificado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 405 nm.

En el ensayo se utilizó la enzima β -N-acetilglucosaminidasa como control positivo y la lisozima como control negativo. Las muestras utilizadas fueron la fracción insoluble de los cultivos con etanol, tanto al 1.5% como al 3%, con 40 μ g de proteína total.

En la Figura 37 se puede ver que la proteína expresada tiene una alta actividad como glucoaminidasa. Como se puede observar, el porcentaje de etanol no afecta la actividad de la bacteriocina. El sitio de corte que realiza esta enzima en la cadena glucosídica de los peptidoglicanos es entre el NAG y el NAM, mientras que la lisozima corta el enlace entre el NAM y el NAG.

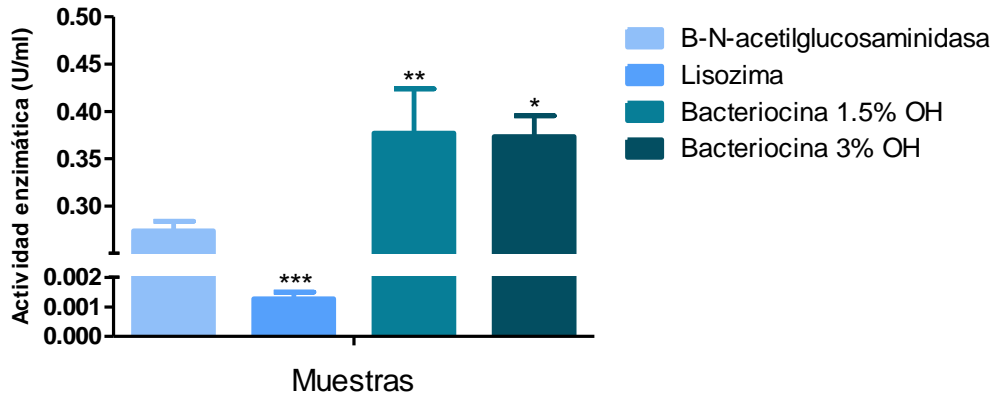


Figura 35 Actividad de peptidoglucano hidrolasa (PGH) utilizando 4-nitrofenol N-acetil- β -D-glucosamina. Con estos resultados se pudo probar la actividad catalítica del dominio de transglucosilasa, demostrando que la bacteriocina del clúster 19 de L06 es una peptidoglucano hidrolasa.

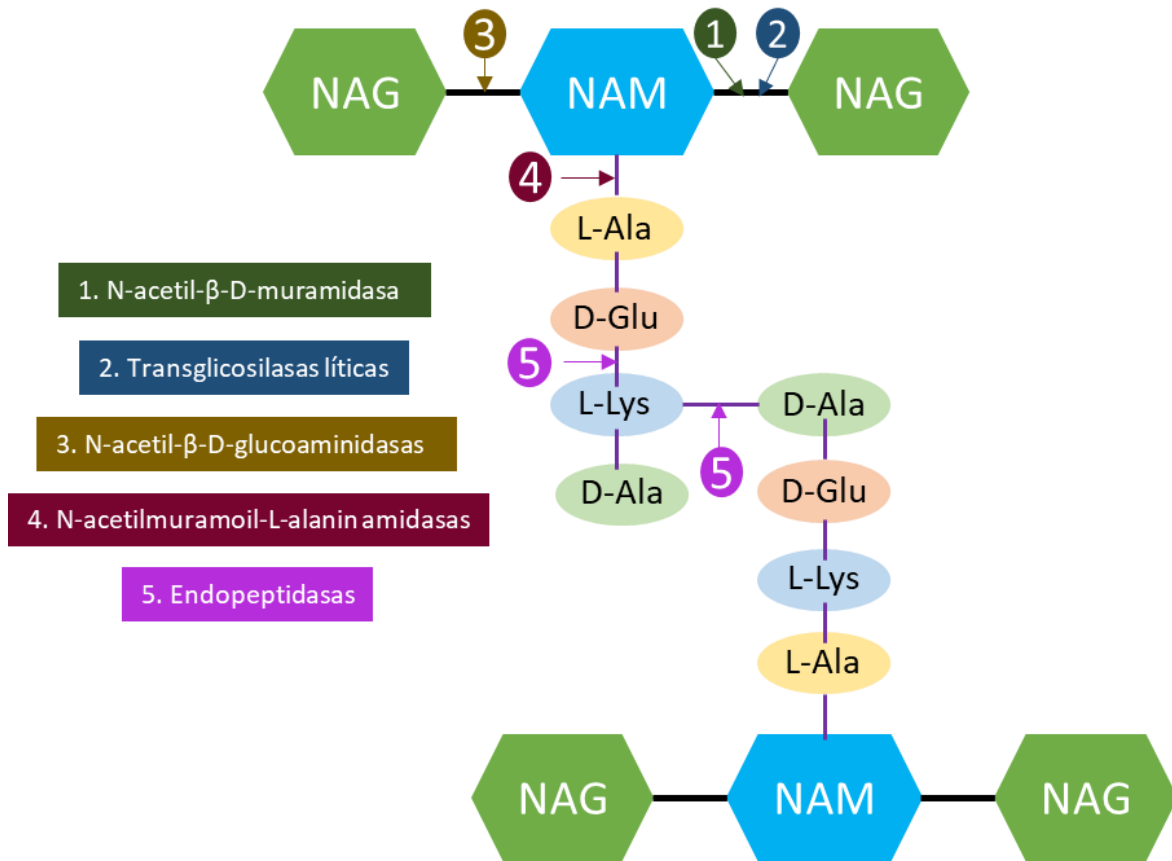


Figura 36 Sitios de corte de las peptidoglucano hidrolasas

Con los dos resultados obtenidos de la actividad de la bacteriocina, se le puede clasificar como una peptidoglucano hidrolasa. Según la Figura 38, en donde se indican los tipos de PGH, esta bacteriocina pertenece al grupo de la N-acetil- β -D-glucoaminidasa. Debido al dominio de Peptidasa M23 es posible que la bacteriocina también sea una endopeptidasa, como lo son la Zoocina A y la Lisostafina (Roces, Rodríguez and Martínez, 2012).

Durante este trabajo se lograron secuenciar, ensamblar y anotar dos genomas de *Streptomyces* aislados del árbol *A. adstringens*, los cuales fueron identificados como *S. champavatii* L06 y *S. scabrisporus* NF3. Fue evidente la diferencia en las herramientas bioinformáticas para llevar a cabo la anotación y la importancia de hacer una revisión manual de ésta.

Ambos genomas fueron analizados computacionalmente, encontrando características particulares en cada uno, como la capacidad de degradación de xenobióticos de *S. scabrisporus* NF3 y el sistema CRISPR-cas de *S. champavatii* L06. Aunque la revisión general del genoma dio como resultado los descubrimientos mencionados, aún es necesario un análisis más profundo para explotar el potencial de ambas.

Se encontraron 53 clústeres de genes biosintéticos en la cepa NF3 y 23 clústeres de genes biosintéticos en la cepa L06. Ambos genomas con PKS y NRPS, lantibióticos y lassopéptidos, los cuales son los clústeres más buscados por minería genómica. Entre estos clústeres, 6 de ellos fueron identificados como clústeres de genes para la producción de bacteriocinas tipo III o peptidoglucano hidrolasas. Hasta el momento de la escritura de este trabajo, no hay reportes de peptidoglucano hidrolasas se *Streptomyces* cuyo fin sea el uso como antimicrobiano, por lo que la decisión de expresar este tipo de clústeres daba la ventaja de un compuesto novedoso.

Se escogió el clúster 19 de la cepa L06, el cual también constaba en un conjunto de genes para la producción del pigmento indigoidina. De este clúster se seleccionó el gen de la bacteriocina tipo III identificado como una transglicosilasa de 44.4 kDa.

La selección de la cepa era algo de vital importancia, fue claro que la cepa de *E. coli* BL21 no fue la mejor elección debido a la preferencia de codones, algo que debe ser evaluado cuando se busca un hospedero heterólogo.

Se logró expresar esta cepa en *E. coli* ROSETTA aumentando su expresión con etanol. Sin embargo, la proteína permaneció en la fracción soluble; se hipotetizó que gracias al péptido señal la proteína estaba atrapada en la membrana celular y que era posible que aún tuviera actividad.

Se probó su actividad lítica contra la pared celular de 8 bacterias y una levadura, así como la actividad del dominio de transglicosilasa, identificándola como una N-acetil- β -D-glucoaminidasa.

Probando de esta forma la utilidad de la minería genómica en la búsqueda de productos naturales novedosos.

CONCLUSIONES

La resistencia a antibióticos nos ha obligado al uso de nuevas técnicas y la búsqueda en nuevos sitios de productos naturales.

En este trabajo la minería genómica permitió el descubrimiento de 76 clústeres de genes biosintéticos en total repartidos en dos *Streptomyces* endófitos. De estos 76 clústeres más del 50% son totalmente novedosos. Esto abre las puertas a la búsqueda de más de 40 compuestos cuya actividad puede ser de interés farmacológico y totalmente novedoso.

Aunque fue evidente que aún falta mucho por perfeccionar en las herramientas bioinformáticas para la búsqueda de BGCs, estas nos permitieron encontrar de manera más sencilla los 76 clústeres existentes. Con un análisis más detallado se podrían encontrar aún más clústeres como sucedió con el clúster del pigmento indigoidina.

En este trabajo se realizaron los 4 pasos de la minería genómica, gracias a esto fue posible expresar una bacteriocina tipo III y probar su actividad lítica contra varios microorganismos. Se pudo clasificar esta bacteriocina como la primera glucosaminidasa identificada y caracterizada para la familia Streptomicetaceae.

Este es el primer trabajo en el que se expresa heterológamente una bacteriocina tipo III de *Streptomyces*, así como el primero en demostrar que una PGH de este género es capaz de romper la pared celular de diferentes bacterias Gram-positivas, Gram-negativas e incluso levaduras.

La minería genómica no sólo permitió el descubrimiento de una nueva molécula con actividad antimicrobiana, también permitió el descubrimiento del potencial de degradación de xenobióticos de *Streptomyces scabrisporus* NF3, así como el sistema CRISPR-cas de *Streptomyces champavatii* L06.

La minería genómica abre las puertas a cientos de posibilidades con fines exitosos, haciendo de este trabajo, sólo una de ellas.

PROSPECTIVAS

- ❖ Purificar la proteína de la membrana celular de *E. coli* ROSETTA por medio de butanol para caracterizar su temperatura y pH óptimo. Así como para probar su actividad antimicrobiana ante cepas multirresistentes.
- ❖ Utilizar ambos genomas para nuevos proyectos involucrados con minería genómica.
- ❖ Investigar las capacidades de degradación de xenobióticos de *S. scabrisporus* NF3

REFERENCIAS

- Adnani, N., Rajski, S. R. and Bugni, T. S. (2017) 'Symbiosis-inspired approaches to antibiotic discovery', *Natural Product Reports*, 34(7), pp. 784–814. doi: 10.1039/C7NP00009J.
- Akesson, M. *et al.* (2007) 'Targeting of streptococci by zoocin A', *FEMS Microbiology Letters*, 270(1), pp. 155–161. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00669.x.
- Andersen, R. J. (2017) 'Sponging off nature for new drug leads', *Biochemical Pharmacology*, 139, pp. 3–14. doi: 10.1016/j.bcp.2017.04.012.
- Bali, V. and Panesar, P. (2014) 'Bacteriocins: Recent Trends and Potential Applications', *Critical reviews in food Science and Nutrition*, pp. 37–41. doi: 10.1080/10408398.2012.729231.
- Baltz, R. H. (2017) 'Gifted microbes for genome mining and natural product discovery', *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 44, pp. 573–588. doi: 10.1007/s10295-016-1815-x.
- Bamford, C. *et al.* (2010) 'Characterization of a novel family of fibronectin-binding proteins with M23 peptidase domains from *Treponoma denticola*', *Molecular Oral Microbiology*, 25(6), pp. 369–383. doi: 10.1038/jid.2014.371.
- Bastos, M. do C. de F., Coutinho, B. G. and Coelho, M. L. V. (2010) 'Lysostaphin: A staphylococcal bacteriolysin with potential clinical applications', *Pharmaceuticals*, 3, pp. 1139–1161. doi: 10.3390/ph3041139.
- Bentley, S. D. *et al.* (2002) 'Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2).', *Nature*, 417(6885), pp. 141–147. doi: 10.1038/417141a.
- Bérdy, J. (2005) 'Bioactive Microbial Metabolites', *The Journal of Antibiotics*, 58(1), pp. 1–26. doi: 10.1038/ja.2005.1.
- Biziulevičius, G. A., Biziulevičienė, G. and Kazlauskaitė, J. (2008) 'A list of enzyme preparations covered by the term enzybiotics should not be restricted to

bacteriophage-encoded peptidoglycan hydrolases (lysins)', *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 60(4), pp. 531–532. doi: 10.1211/jpp.60.4.0017.

Blin, K. *et al.* (2016) 'The antiSMASH database, a comprehensive database of microbial secondary metabolite biosynthetic gene clusters', *Nucleic Acids Research*, 45(October 2016), pp. 555–559. doi: 10.1093/nar/gkw960.

Blin, K. *et al.* (2017) 'antiSMASH 4.0—improvements in chemistry prediction and gene cluster boundary identification', *Nucleic Acids Research*, 45. doi: 10.1093/nar/gkx319.

Bonsor, D. A. *et al.* (2009) 'Allosteric beta-propeller signalling in TolB and its manipulation by translocating colicins.', *The EMBO journal*. European Molecular Biology Organization, 28(18), pp. 2846–57. doi: 10.1038/emboj.2009.224.

Brachmann, A. O. *et al.* (2012) 'Triggering the production of the cryptic blue pigment indigoidine from *Photobacterium luminescens*', *Journal of Biotechnology*. Elsevier, 157(1), pp. 96–99. doi: 10.1016/J.JBIOTEC.2011.10.002.

Brader, G. *et al.* (2014) 'Metabolic potential of endophytic bacteria', *Current Opinion in Biotechnology*, 27, pp. 30–37. doi: 10.1016/j.copbio.2013.09.012.

Bradford, M. M. (1976) 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.', *Analytical biochemistry*, 72, pp. 248–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>.

Brown, E. D. and Wright, G. D. (2016) 'Antibacterial drug discovery in the resistance era', *Nature*, 529, pp. 336–343. doi: 10.1038/nature17042.

Buist, G. *et al.* (2008) 'LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans', *Molecular Microbiology*, 68(4), pp. 838–847. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06211.x.

Cabib, E. and Arroyo, J. (2013) 'How carbohydrates sculpt cells: chemical control of morphogenesis in the yeast cell wall', *Nature Reviews Microbiology*, 11, pp. 648–655. doi: 10.1038/nrmicro3090.

- Carr, S. *et al.* (2000) 'The structure of TolB, an essential component of the tol-dependent translocation system, and its protein–protein interaction with the translocation domain of colicin E9', *Structure*, 8(1), pp. 57–66. doi: 10.1016/S0969-2126(00)00079-4.
- Carter, T. *et al.* (2017) 'The Type IVa Pilus Machinery Is Recruited to Sites of Future Cell Division.', *mBio*. American Society for Microbiology (ASM), 8(1). doi: 10.1128/mBio.02103-16.
- Centeno-Leija, S. *et al.* (2016) 'Different Approaches for Searching New Microbial Compounds with Anti-infective Activity', in *New Weapons to Control Bacterial Growth*, pp. 395–431. doi: 10.1007/978-3-319-28368-5_15.
- Challis, G. L. (2014) 'Exploitation of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) genome sequence for discovery of new natural products and biosynthetic pathways.', *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(2), pp. 219–32. doi: 10.1007/s10295-013-1383-2.
- Chaudhary, A. S. (2016) 'A review of global initiatives to fight antibiotic resistance and recent antibiotics' discovery', *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 6(6), pp. 552–556. doi: 10.1016/j.apsb.2016.06.004.
- Chavan, M. A. and Riley, M. A. (2007) *Bacteriocins*. Springer. doi: 10.1007/978-3-540-36604-1.
- Chen, L. *et al.* (2016) 'Genome mining reveals the biosynthetic potential of the marine-derived strain *Streptomyces marokkonensis* M10', *Synthetic and Systems Biotechnology*. Elsevier B.V., 1(1), pp. 56–65. doi: 10.1016/j.synbio.2016.02.005.
- Chhetri, G., Kalita, P. and Tripathi, T. (2015) 'An efficient protocol to enhance recombinant protein expression using ethanol in *Escherichia coli*', *MethodsX*. Elsevier B.V., 2, pp. 385–391. doi: 10.1016/j.mex.2015.09.005.
- Cimermancic, P. *et al.* (2014) 'Insights into Secondary Metabolism from a Global Analysis of Prokaryotic Biosynthetic Gene Clusters', *Cell*, 158, pp. 412–421. doi: 10.1016/j.cell.2014.06.034.

- Colpa, D. I., Fraaije, M. W. and van Bloois, E. (2014) 'DyP-type peroxidases: a promising and versatile class of enzymes', *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(1), pp. 1–7. doi: 10.1007/s10295-013-1371-6.
- Cotter, P. D., Hill, C. and Ross, R. (2005) 'BACTERIOCINS: DEVELOPING INNATE IMMUNITY FOR FOOD', *Nature reviews. Microbiology*, 3, pp. 777–788. doi: 10.1038/nrmicro1240.
- Darzentas, N. (2010) 'Circoletto: visualizing sequence similarity with Circos', *Bioinformatics*, 26(20), pp. 2620–2621. doi: 10.1093/bioinformatics/btq484.
- Demain, A. L. and Sanchez, S. (2009) 'Microbial drug discovery: 80 years of progress', *The Journal of Antibiotics*, 62, pp. 5–16. doi: 10.1038/ja.2008.16.
- Desriac, F. *et al.* (2010) 'Bacteriocin as weapons in the marine animal-associated bacteria warfare: Inventory and potential applications as an aquaculture probiotic', *Marine Drugs*, 8(4), pp. 1153–1177. doi: 10.3390/md8041153.
- Dinesh, R. *et al.* (2017) 'Endophytic actinobacteria: Diversity, secondary metabolism and mechanisms to unsilence biosynthetic gene clusters', *Critical reviews in microbiology*. doi: 10.1080/1040841X.2016.1270895.
- Durfee, T. *et al.* (2008) 'The Complete Genome Sequence of Escherichia coli DH10B: Insights into the Biology of a Laboratory Workhorse', *Journal of Bacteriology*, 190(7), pp. 2597–2606. doi: 10.1128/JB.01695-07.
- Fernandes, P. and Martens, E. (2017) 'Antibiotics in late clinical development', *Biochemical Pharmacology*, 133, pp. 152–163. doi: 10.1016/j.bcp.2016.09.025.
- Finn, R. D. *et al.* (2016) 'The Pfam protein families database: towards a more sustainable future', *Nucleic Acids Research*, 44. doi: 10.1093/nar/gkv1344.
- Fleming, A. (1929) 'On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to their Use in the Isolation of B. influenzae', *British journal of experimental pathology*. Wiley-Blackwell, 10(3), p. 226. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2048009/> (Accessed: 14 October 2017).

Ganesan, P. *et al.* (2017) 'Antimicrobial activity of some actinomycetes from Western Ghats of Tamil Nadu, India', *Alexandria Journal of Medicine*, 53, pp. 101–110. doi: 10.1016/j.ajme.2016.03.004.

García-Cano, I. *et al.* (2015) 'Expression, purification, and characterization of a bifunctional 99-kDa peptidoglycan hydrolase from *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(20), pp. 8563–8573. doi: 10.1007/s00253-015-6593-2.

Gasteiger, E. *et al.* (2005) 'Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server', in *The Proteomics Protocols Handbook*. Available at: http://web.expasy.org/docs/expasy_tools05.pdf.

Gillor, O., Etzion, A. and Riley, M. A. (2008) 'The dual role of bacteriocins as anti-and probiotics', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(4), pp. 591–606. doi: 10.1007/s00253-008-1726-5.

Gomez-Escribano, J. P. and Bibb, M. J. (2011) 'Engineering *Streptomyces coelicolor* for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters', *Microbial Biotechnology*, 4(2), pp. 207–215. doi: 10.1111/j.1751-7915.2010.00219.x.

Gomez-Escribano, J. P. and Bibb, M. J. (2014) 'Heterologous expression of natural product biosynthetic gene clusters in *Streptomyces coelicolor*: From genome mining to manipulation of biosynthetic pathways', *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(2), pp. 425–431. doi: 10.1007/s10295-013-1348-5.

Grabowska, M. *et al.* (2015) 'High resolution structure of an M23 peptidase with a substrate analogue', *Scientific reports*, pp. 1–8. doi: 10.1038/srep14833.

Güllüce, M., Karadayı, M. and Barış, Ö. (2013) 'Bacteriocins: Promising Natural Antimicrobials', *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*, 2, pp. 1016–1027. doi: 10.13140/2.1.5014.5606.

Guzmán-Trampe, S. *et al.* (2015) 'Evaluation of the potential bioactivity of an endophytic bacteria isolated from *Magnolia dealbata* Zucc', *International Journal of*

Current Microbiology and Applied Sciences, 4(4), pp. 515–525. Available at: [https://www.ijcmas.com/vol-4-4/S.Guzman Trampe, et al.pdf](https://www.ijcmas.com/vol-4-4/S.Guzman%20Trampe,%20et%20al.pdf).

Haiser, H. J., Yousef, M. R. and Elliot, M. A. (2009) 'Cell wall hydrolases affect germination, vegetative growth, and sporulation in *Streptomyces coelicolor*', *Journal of Bacteriology*, 191(21), pp. 6501–6512. doi: 10.1128/JB.00767-09.

Hammami, R. *et al.* (2013) 'Anti-infective properties of bacteriocins: an update', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70, pp. 2947–2967. doi: 10.1007/s00018-012-1202-3.

van Heel, A. J. *et al.* (2013) 'BAGEL3: Automated identification of genes encoding bacteriocins and (non-)bactericidal posttranslationally modified peptides.', *Nucleic Acids Research*, 41, pp. W448–W453. doi: 10.1093/nar/gkt391.

Herrmann, K. M. and Weaver, L. M. (1999) 'THE SHIKIMATE PATHWAY', *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50(1), pp. 473–503. doi: 10.1146/annurev.arplant.50.1.473.

Hyatt, D. *et al.* (2010) 'Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification.', *BMC bioinformatics*, 11, p. 119. doi: 10.1186/1471-2105-11-119.

Ikeda, H. *et al.* (2003) 'Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*', *Nature Biotechnology*, 21(5), pp. 526–531. doi: 10.1038/nbt820.

Ikeda, H., Shin-Ya, K. and Omura, S. (2014) 'Genome mining of the *Streptomyces avermitilis* genome and development of genome-minimized hosts for heterologous expression of biosynthetic gene clusters', *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(2), pp. 233–250. doi: 10.1007/s10295-013-1327-x.

Jensen, P. R. (2016) 'Natural Products and the Gene Cluster Revolution', *Trends in Microbiology*, 24(12), pp. 968–977. doi: 10.1016/j.tim.2016.07.006.

Kaul, S., Sharma, T. and K Dhar, M. (2016) "'Omics"; Tools for Better Understanding the Plant-Endophyte Interactions.', *Frontiers in plant science*,

7(955). doi: 10.3389/fpls.2016.00955.

Kawashima, H. *et al.* (1984) 'Functional domains of Escherichia coli recA protein deduced from the mutational sites in the gene.', *Molecular & general genetics : MGG*, 193(2), pp. 288–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6363880>.

Kealey, C. *et al.* (2017) 'New approaches to antibiotic discovery', *Biotechnology Letters*, 39(6), pp. 805–817. doi: 10.1007/s10529-017-2311-8.

Keep, N. H. *et al.* (2006) 'Wake up! Peptidoglycan lysis and bacterial non-growth states', *Trends in Microbiology*, 14, pp. 271–276. doi: 10.1016/j.tim.2006.04.003.

Kolter, R. and van Wezel, G. P. (2016) 'Goodbye to brute force in antibiotic discovery?', *Nature Microbiology*, 1. doi: 10.1039/C5NP00092K.

Koonin, E. V and Rudd, K. E. (1994) 'A conserved domain in putative bacterial and bacteriophage transglycosylases.', *Trends in biochemical sciences*, 19(3), pp. 106–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8203016>.

Koraimann, G. (2003) 'Lytic transglycosylases in macromolecular transport systems of Gram-negative bacteria', *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 60(11), pp. 2371–2388. doi: 10.1007/s00018-003-3056-1.

Krogh, A. *et al.* (2001) 'Predicting Transmembrane Protein Topology with a Hidden Markov Model: Application to Complete Genomes', *Journal of Molecular Biology*, 305, pp. 567–580. Available at: https://ac.els-cdn.com/S0022283600943158/1-s2.0-S0022283600943158-main.pdf?_tid=96225e54-af74-11e7-a226-00000aab0f27&acdnat=1507830273_60cccf2bb9ae1c6ac7498cc9d2de23ca.

Kumar, J. K. (2008) 'Lysostaphin: An antistaphylococcal agent', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80, pp. 555–561. doi: 10.1007/s00253-008-1579-y.

Kusari, S., Singh, S. and Jayabaskaran, C. (2014) 'Biotechnological potential of plant-associated endophytic fungi: hope versus hype', *Trends in Biotechnology*, 32(6), pp. 297–303. doi: 10.1016/j.tibtech.2014.03.009.

Laemmli, U. K. (1970) 'Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4', *Nature*, 227(5259), pp. 680–685. doi: 10.1038/227680a0.

Lai, A. Y., Tran, S. and Simmonds, R. S. (2002) 'Functional characterization of domains found within a lytic enzyme produced by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*', *FEMS Microbiology Letters*, 215(1), pp. 133–138. doi: 10.1016/S0378-1097(02)00919-9.

Leclerc, D. and Asselin, A. (1989) 'Detection of bacterial cell wall hydrolases after denaturing polyacrylamide gel electrophoresis.', *Canadian journal of microbiology*, 35(8), pp. 749–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2819603>.

Li, L., Jiang, W. and Lu, Y. (2017) 'New strategies and approaches for engineering biosynthetic gene clusters of microbial natural products', *Biotechnology Advances*. doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.03.007.

Lima, S. M. A. *et al.* (2017) 'Characterization of the biochemical, physiological, and medicinal properties of *Streptomyces hygroscopicus* ACTMS-9H isolated from the Amazon (Brazil)', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(2), pp. 711–723. doi: 10.1007/s00253-016-7886-9.

Lin, H. H. and Liao, Y. C. (2015) 'Evaluation and validation of assembling corrected pacbio long reads for microbial genome completion via hybrid approaches', *PLoS ONE*, 10(12), pp. 1–13. doi: 10.1371/journal.pone.0144305.

Liu, L. *et al.* (2016) 'Genome mining unveils widespread natural product biosynthetic capacity in human oral microbe *Streptococcus mutans*', *Scientific reports*. doi: 10.1038/srep37479.

Loman, N. J. and Pallen, M. J. (2015) 'Twenty years of bacterial genome sequencing', *Nature Reviews Microbiology*, 13, pp. 1–9. doi: 10.1038/nrmicro3565.

Machado, H. *et al.* (2015) 'Genome mining reveals unlocked bioactive potential of marine Gram-negative bacteria', *BMC Genomics*, 16, p. 158. doi: 10.1186/s12864-015-1365-z.

Maciejewska, M. *et al.* (2016) 'A Phenotypic and Genotypic Analysis of the Antimicrobial Potential of Cultivable Streptomyces Isolated from Cave Moonmilk Deposits. A Phenotypic and Genotypic Analysis of the Antimicrobial Potential of Cultivable Streptomyces Isolated from Cave Moonmilk D', *Frontiers in Microbiology*, 7. doi: 10.3389/fmicb.2016.01455.

Martinez-klimova, E., Centeno-leija, S. and Sánchez, S. (2016) 'Modern approaches to genome mining for the development of new anti-infectives : in silico gene prediction and experimental methodologies', in *Frontiers in Clinical Drug Research-Anti Infectives*, pp. 1–52.

Martinez-Klimova, E., Rodríguez-Peña, K. and Sánchez, S. (2016) 'Endophytes as sources of antibiotics', *Biochemical Pharmacology*. Elsevier Inc., 134, pp. 1–17. doi: 10.1016/j.bcp.2016.10.010.

Matsumoto, A. and Takahashi, Y. (2017) 'Endophytic actinomycetes: promising source of novel bioactive compounds', *The Journal of antibiotics*, 70, pp. 514–519. Available at: <https://www.nature.com/ja/journal/v70/n5/pdf/ja201720a.pdf> (Accessed: 3 May 2017).

Medema, M. H. *et al.* (2011) 'AntiSMASH: Rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences', *Nucleic Acids Research*, 39(SUPPL. 2), pp. 339–346. doi: 10.1093/nar/gkr466.

Medema, M. H. (2015) 'Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster', *Nature chemical biology*, 11, pp. 625–631.

van der Meij, A. *et al.* (2017) 'Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes', *FEMS Microbiology Reviews*, 41, pp. 392–416. doi: 10.1093/femsre/fux005.

Mercer, J. A. M. *et al.* (2016) 'Chemical Synthesis and Self-Assembly of a Ladderane Phospholipid', *Journal of the American Chemical Society*. American Chemical Society, 138(49), pp. 15845–15848. doi: 10.1021/jacs.6b10706.

- Mesnage, S. *et al.* (2014) 'Molecular basis for bacterial peptidoglycan recognition by LysM domains', *Nature Communications*, 5. doi: 10.1038/ncomms5269.
- Miller, I. J., Chevrette, M. G. and Kwan, J. C. (2017) 'Interpreting microbial biosynthesis in the genomic age: Biological and practical considerations', *Marine Drugs*, 15(6), pp. 1–24. doi: 10.3390/md15060165.
- Mo, T. *et al.* (2017) 'Biosynthetic Insights into Linaridin Natural Products from Genome Mining and Precursor Peptide Mutagenesis', *ACS Chemical Biology*, 12(6), pp. 1484–1488. doi: 10.1021/acscchembio.7b00262.
- Moloney, M. G. (2016) 'Natural Products as a Source for Novel Antibiotics', *Trends in Pharmacological Sciences*, 37(8), pp. 689–701. doi: 10.1016/j.tips.2016.05.001.
- Mushegian, A. R. *et al.* (1996) 'A family of lysozyme-like virulence factors in bacterial pathogens of plants and animals.', *PNAS*, 93(14), pp. 7321–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8692991>.
- Nah, H.-J. *et al.* (2017) 'Cloning and Heterologous Expression of a Large-sized Natural Product Biosynthetic Gene Cluster in Streptomyces Species', *Frontiers in Microbiology*, 8(394). doi: 10.3389/fmicb.2017.00394.
- Najjari, A. *et al.* (2016) 'Phenotypic and genotypic characterization of peptidoglycan hydrolases of *Lactobacillus sakei*', *Journal of Advanced Research*, 7, pp. 155–163. doi: 10.1016/j.jare.2015.04.004.
- Nalini, M. S. and Prakash, H. S. (2017) 'Diversity and bioprospecting of actinomycete endophytes from the medicinal plants', *Letters in Applied Microbiology*, 64(4), pp. 261–270. doi: 10.1111/lam.12718.
- Nordahl Petersen, T. *et al.* (2011) 'SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions', *Nature methods*, 8(10), pp. 785–786. doi: 10.1038/nmeth.1701.
- Olano, C. *et al.* (2014) 'Activation and identification of five clusters for secondary metabolites in *Streptomyces albus*J1074', *Microbial Biotechnology*, 7(3), pp. 242–256. doi: 10.1111/1751-7915.12116.

- Olivera Ortega, A. G. *et al.* (1999) 'Phytochemical study of cuachalalate (Amphiptherygium adstringens, Schiede ex Schlecht)', *Journal of Ethnopharmacology*, 68(1–3), pp. 109–113. doi: 10.1016/S0378-8741(99)00047-1.
- Ostash, B. *et al.* (2010) 'Properties of lanK-based regulatory circuit involved in landomycin biosynthesis in Streptomyces cyanogenus S136.', *Genetika*, 46(5), pp. 604–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20583594>.
- Overbeek, R. *et al.* (2014) 'The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST)', *Nucleic Acids Research*, 42, pp. D206–D214. doi: 10.1093/nar/gkt1226.
- Passari, A. K. *et al.* (2015) 'Isolation, abundance and phylogenetic affiliation of endophytic actinomycetes associated with medicinal plants and screening for their in vitro antimicrobial biosynthetic potential', *Frontiers in Microbiology*, 6(273). doi: 10.3389/fmicb.2015.00273.
- Paulus, C. *et al.* (2017) 'New natural products identified by combined genomics-metabolomics profiling of marine Streptomyces sp. MP131-18', *Scientific Reports*, 7. doi: 10.1038/srep42382.
- Putu Sudiarta, I., Fukushima, T. and Sekiguchi, J. (2010) 'Bacillus subtilis CwIP of the SP-B Prophage Has Two Novel Peptidoglycan Hydrolase Domains, Muramidase and Cross-linkage Digesting DD-Endopeptidase', *The Journal of Biological Chemistry*, 285(53), pp. 41232–41243. doi: 10.1074/jbc.M110.156273.
- Qin, S. *et al.* (2015) 'Biodiversity and plant growth promoting traits of culturable endophytic actinobacteria associated with Jatropha curcas L. growing in Panxi dry-hot valley soil', *Applied Soil Ecology*, 93, pp. 47–55. doi: 10.1016/j.apsoil.2015.04.004.
- Ren, H., Wang, B. and Zhao, H. (2017) 'Breaking the silence: new strategies for discovering novel natural products', *Current Opinion in Biotechnology*, 48, pp. 21–27. doi: 10.1016/j.copbio.2017.02.008.
- Riley, M. A. and Chavan, M. A. (2007) *Bacteriocins: Ecology and Evolution*.

- Roces, C., Rodríguez, A. and Martínez, B. (2012) 'Cell Wall-active Bacteriocins and Their Applications Beyond Antibiotic Activity', *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4, pp. 259–272. doi: 10.1007/s12602-012-9116-9.
- Rodríguez-Rubio, L. *et al.* (2013) 'Bacteriophage virion-associated peptidoglycan hydrolases: potential new enzybiotics', *Critical Reviews in Microbiology*, 39(4), pp. 427–434. doi: 10.3109/1040841X.2012.723675.
- Rutledge, P. J. and Challis, G. L. (2015) 'Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters', *Nature Reviews Microbiology*, 13(8), pp. 509–523. doi: 10.1038/nrmicro3496.
- Sabala, I. *et al.* (2012) 'Anti-staphylococcal activities of lysostaphin and LytM catalytic domain', *BMC Microbiology*, 12(97). doi: 10.1186/1471-2180-12-97.
- Sambrook, J. and Russel, D. (2000) 'Molecular Cloning, 3-Volume Set : A Laboratory Manual', *Cold Spring Harboc Laboratory Press*, p. 999. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24532655>.
- Scheffler, R. J. *et al.* (2013) 'Antimicrobials, drug discovery, and genome mining', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(3), pp. 969–978. doi: 10.1007/s00253-012-4609-8.
- Schindler, C. (1965) 'The role of NaCl in the Lysis of Staphylococcus aureus by Lysostaphin', *Journal of General Microbiology*, 40(2), pp. 199–205. doi: 10.1097/MD.0b013e3181d5453d.
- Schmelcher, M., Donovan, D. M. and Loessner, M. J. (2012) 'Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials', *Future Microbiology*, 7(10), pp. 1147–1171. doi: 10.2217/fmb.12.97.
- Seemann, T. (2014) 'Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation', *Bioinformatics*, 30(14), pp. 2068–2069. doi: 10.1093/bioinformatics/btu153.
- Sexton, D. L. *et al.* (2015) 'Resuscitation-promoting factors are cell wall-lytic enzymes with important roles in the germination and growth of streptomyces coelicolor', *Journal of Bacteriology*, 197(5), pp. 848–860. doi: 10.1128/JB.02464-

14.

Shockman, G. D. *et al.* (1996) 'Peptidoglycan Hydrolases, Autolysins, and Autolysis', *Microbial Drug Resistance*, 2(1), pp. 95–99.

Sievers, F. *et al.* (2014) 'Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega', *Molecular Systems Biology*, 7(1), pp. 539–539. doi: 10.1038/msb.2011.75.

Simmonds, R. S., Simpson, W. J. and Tagg, J. R. (1997) 'Cloning and sequence analysis of zooA, a Streptococcus zooepidemicus gene encoding a bacteriocin-like inhibitory substance having a domain structure similar to that of lysostaphin', *Gene*, 189(2), pp. 255–261. doi: 10.1016/S0378-1119(96)00859-1.

Singh, S. B., Young, K. and Silver, L. L. (2017) 'What is an "ideal" antibiotic? Discovery challenges and path forward', *Biochemical Pharmacology*, 133, pp. 63–73. doi: 10.1016/j.bcp.2017.01.003.

Singh, V. K., Carlos, M. R. and Singh, K. (2010) 'Physiological Significance of the Peptidoglycan Hydrolase, LytM, in Staphylococcus aureus', *FEMS microbiology letters*, 311(2), pp. 167–175. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.02087.x.

Skinnider, M. A. *et al.* (2015) 'Genomes to natural products Prediction Informatics for Secondary Metabolomes (PRISM)', *Nucleic Acids Research*, 43(20), pp. 9645–9662. doi: 10.1093/nar/gkv1012.

Spaink, H. P. (2004) 'Specific recognition of bacteria by plant LysM domain receptor kinases', *Trends in Microbiology*, 12(5), pp. 201–204. doi: 10.1016/j.tim.2004.03.001.

Strobel, G. A. (2003) 'Endophytes as sources of bioactive products', *Microbes and Infection*, 5, pp. 535–544. doi: 10.1016/S1286-4579(03)00073-X.

Sugano, Y. *et al.* (2000) 'Efficient heterologous expression in Aspergillus oryzae of a unique dye-decolorizing peroxidase, DyP, of Geotrichum candidum Dec 1.', *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), pp. 1754–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10742277>.

Sutter, M. *et al.* (2008) 'Structural basis of enzyme encapsulation into a bacterial nanocompartment', *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(9), pp. 939–947. doi: 10.1038/nsmb.1473.

Szweda, P. *et al.* (2012) 'Peptidoglycan hydrolases-potential weapons against *Staphylococcus aureus*', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96, pp. 1157–1174. doi: 10.1007/s00253-012-4484-3.

Tanvir, R., Javeed, A. and Bajwa, A. G. (2017) 'Endophyte bioprospecting in South Asian medicinal plants: an attractive resource for biopharmaceuticals', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101, pp. 1831–1844. Available at: <http://download.springer.com/static/pdf/248/art%253A10.1007%252Fs00253-017-8115-x.pdf?originUrl=http%3A%2F%2Flink.springer.com%2Farticle%2F10.1007%2Fs00253-017-8115-x&token2=exp=1493822054~acl=%2Fstatic%2Fpdf%2F248%2Fart%25253A10.1007%252Fs00253-017-8115-x> (Accessed: 3 May 2017).

Taylor, R. G., Walker, D. C. and McInnes, R. R. (1993) 'E.coli host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing', *Nucleic Acids Research*, 21(7), pp. 1677–1678. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC309390/pdf/nar00056-0173.pdf> (Accessed: 12 October 2017).

Thunnissen, A. M. *et al.* (1995) 'Structure of the 70-kDa soluble lytic transglycosylase complexed with bulgecin A. Implications for the enzymatic mechanism.', *Biochemistry*, 34(39), pp. 12729–37. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7548026> (Accessed: 14 October 2017).

Tiwari, R. *et al.* (2014) 'Enzybiotics: New Weapon in the Army of Antimicrobials: A Review', *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. Available at: <http://docsdrive.com/pdfs/academicjournals/ajava/0000/62178-62178.pdf>.

Trenado, M. (2016a) *Identificación de metabolitos secundarios antibacterianos producidos por actinomicetos endófitos de la planta *Amphipterygium adstringens**.

UNAM.

Trenado, M. (2016b) *Identificación de metabolitos secundarios antibacterianos producidos por actinomicetos endófitos de la planta Amphipterygium adstringens.*

Ugai, T. *et al.* (2016) 'Genome mining approach for harnessing the cryptic gene cluster in *Alternaria solani*: production of PKS-NRPS hybrid metabolite, didymellamide B', *Tetrahedron Letters*, 57, pp. 2793–2796. doi: 10.1016/j.tetlet.2016.05.043.

Valdes-Stauber, N. and Scherer, S. (1996) 'Nucleotide sequence and taxonomical distribution of the bacteriocin gene *lin* cloned from *Brevibacterium linens* M18.', *Applied and environmental microbiology*, 62(4), pp. 1283–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8919789> (Accessed: 14 October 2017).

Valdés-Stauber, N. and Scherer, S. (1994) 'Isolation and characterization of Linocin M18, a bacteriocin produced by *Brevibacterium linens*.' , *Applied and environmental microbiology*. American Society for Microbiology (ASM), 60(10), pp. 3809–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7986050> (Accessed: 14 October 2017).

Vazquez-Hernandez, M. *et al.* (2017) 'Draft Genome Sequence of *Streptomyces scabrisporus* NF3, an Endophyte Isolated from *Amphipterygium adstringens*' , *Genome Announcements*, 5, pp. e00267-17. doi: <https://doi.org/10.1128/genomeA.00504-17>.

Ventura, M. *et al.* (2007) 'Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum', *Microbiology and molecular biology reviews*, 71(3), pp. 495–548. doi: 10.1128/MMBR.00005-07.

Wattam, A. R. *et al.* (2014) 'PATRIC, the bacterial bioinformatics database and analysis resource', *Nucleic Acids Research*, 42, pp. D581–D591. doi: 10.1093/nar/gkt1099.

Watve, M. G. *et al.* (2001) 'How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*?' , *Archives of Microbiology*, 176(5), pp. 386–390. doi:

10.1007/s002030100345.

Wehbi, H. *et al.* (2011) 'The peptidoglycan-binding protein FimV promotes assembly of the *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus secretin.', *Journal of bacteriology*. American Society for Microbiology (ASM), 193(2), pp. 540–50. doi: 10.1128/JB.01048-10.

Wilson, M. R., Zha, L. and Balskus, E. P. (2017) 'Natural Product Discovery from the Human Microbiome', *Journal of Biological Chemistry*, (12), p. jbc.R116.762906. doi: 10.1074/jbc.R116.762906.

Wittekind, M. *et al.* (2016) 'Cell wall hydrolases and antibiotics: exploiting synergy to create efficacious new antimicrobial treatments', *Current Opinion in Microbiology*, 33, pp. 18–24. doi: 10.1016/j.mib.2016.05.006.

Wohlleben, W. *et al.* (2016) 'Antibiotic drug discovery', *Microbial Biotechnology*, 9(5), pp. 541–548. doi: 10.1111/1751-7915.12388.

Xu, F., Gage, D. and Zhan, J. (2015) 'Efficient production of indigoidine in *Escherichia coli*', *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 42(8), pp. 1149–1155. doi: 10.1007/s10295-015-1642-5.

Yang, X., Fu, B. and Yu, B. (2011) 'Total Synthesis of Landomycin A, a Potent Antitumor Angucycline Antibiotic', *Journal of the American Chemical Society*. American Chemical Society, 133(32), pp. 12433–12435. doi: 10.1021/ja205339p.

Yount, N. Y. and Yeaman, M. R. (2013) 'Peptide antimicrobials: Cell wall as a bacterial target', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1277(1), pp. 127–138. doi: 10.1111/nyas.12005.

Yu, D. *et al.* (2013) 'An indigoidine biosynthetic gene cluster from *Streptomyces chromofuscus* ATCC 49982 contains an unusual IndB homologue', *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 40(1), pp. 159–168. doi: 10.1007/s10295-012-1207-9.

Zhang, M. M. *et al.* (2016) 'Engineering microbial hosts for production of bacterial natural products', *Natural product reports*, 33, pp. 907–1022. Available at:

<http://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2016/np/c6np00017g> (Accessed: 7 June 2017).

Zhang, M. M. *et al.* (2017) 'CRISPR–Cas9 strategy for activation of silent *Streptomyces* biosynthetic gene clusters', *Nature Chemical Biology*. doi: 10.1038/nchembio.2341.

ANEXO

Anexo 1: Medios de cultivo

YMG

Extracto de levadura	4.0 g/L
Extracto de malta	10.0 g/L
Glucosa	4.0 g/L

YEME

Extracto de levadura	3.0 g/L
Extracto de malta	3.0 g/L
Peptona	5.0 g/L
Glucosa	4.0 g/L
Sacarosa	150 g/L

LB

Extracto de levadura	5 g/L
NaCl	8 g/L
Bacto-Triptona	10 g/L

TSB

Digerido pancreático de caseína	17.0 g/L
Digestión enzimática de harina de soya	3.0 g/L
Dextrosa	2.5 g/L
Fosfato dipotásico	2.5 g/L

DNA

Extracto de carne	30 g/L
Peptona	5 g/L
Agar	15 g/L

YPD

Glucosa	20 g/L
Peptona	20 g/L
Extracto de levadura	10 g/L
Agar	20 g/L

Buffer P

Sacarosa	103 g/L
K ₂ SO ₄	0.25 g/L
MgCl ₂	2.02 g/L
Elementos traza	2 mL
Agua	llevar hasta 800 mL

Alicuotar en 80 mL y esterilizar. Antes de usar se añaden las siguientes soluciones:

Por cada 100 mL:

KH ₂ PO ₄ al 0.5%	1 mL
CaCl ₂ al 3.68%	10 mL
Buffer TES al 5.73% pH 7.2	10 mL

Elementos traza

ZnCl ₂	40 g/L
FeCl ₃	200 g/L
CuCl ₂	10 g/L
MnCl ₂	10 g/L
Na ₂ B ₄ O ₇	10 g/L
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	10 g/L

SET

Sacarosa	8%
Tris HCl	0.05M
EDTA	0.05M pH 8.0

Solución II

SDS 2%

NaOH 0.4 M

Se prepara en el momento, y primero se agrega el NaOH

Solución III

Acetato de sodio anhidro 3M

Gel de policacrilamida al 10% (2 geles)

H ₂ O	3.9 mL
Acrilamida 30%	3.3 mL
Tris pH 8.8 2.5 M	2.5 mL
SDS 10%	0.1 mL
APS 10%	0.13 mL
TEMED	5 µL

Gel concentrador

H ₂ O	2.5 mL
Acrilamida 30%	0.53 mL
Tris pH 6.8 1.5 M	1 mL
SDS 10%	0.4 mL
APS 10%	0.4 mL
TEMED	5 µL

Anexo 2 Protocolo de extracción de ADN para *Streptomyces* L06

2. Vaciar el contenido de los matraces en tubos Falcon de 50 mL
3. Centrifugar a 8400 x g por 10 min a 4°C. Desechar sobrenadante
4. Lavar con 50 mL de sacarosa al 10.3%
5. Centrifugar como en el paso 2.
6. Añadir 20 mL de Buffer de Fosfatos y lisozima (20 mg/mL)
7. Incubar a 37°C con agitación suave por 5 h
8. Centrifugar a 6800 x g por 10 min a 4°C.
9. Resuspender en 10 mL de sacarosa al 10.3% y repartir en tubos Eppendorf de 1.5 mL
10. Centrifugar como en el paso 7. Retirar sobrenadante.
11. Añadir 200 µL de sacarosa al 10.3% y resuspender el pellet. Se añaden 5 µL de EDTA (0.1 M, pH 8.0), 80 µL SDS 10% y 25 µL de RNAsa (10 µg/mL). Mezclar en vortex. Incubar 1 h.
12. Añadir 300 µL de NaCl 6M y dejar en agitación constante O/N a 4°C.
13. Añadir 300 µL de acetato de sodio 3M pH 4.75. Mezclar por inversión. Incubar 1 h.
14. Centrifugar 17,900 x g por 30 min a 4°C.
15. Recuperar sobrenadante en tubos nuevos. Repetir si es necesario.
16. Agregar isopropanol hasta 1.5 mL. Incubar 4°C por 4 h.
17. Centrifugar como en el paso 13.
18. Desechar sobrenadante. Añadir 1 mL de etanol al 70%.
19. Centrifugar como en el paso 13. Desechar sobrenadante.
20. Secar los tubos en SpeedVac. Resuspender en 250 µL de Tris pH 8.0.

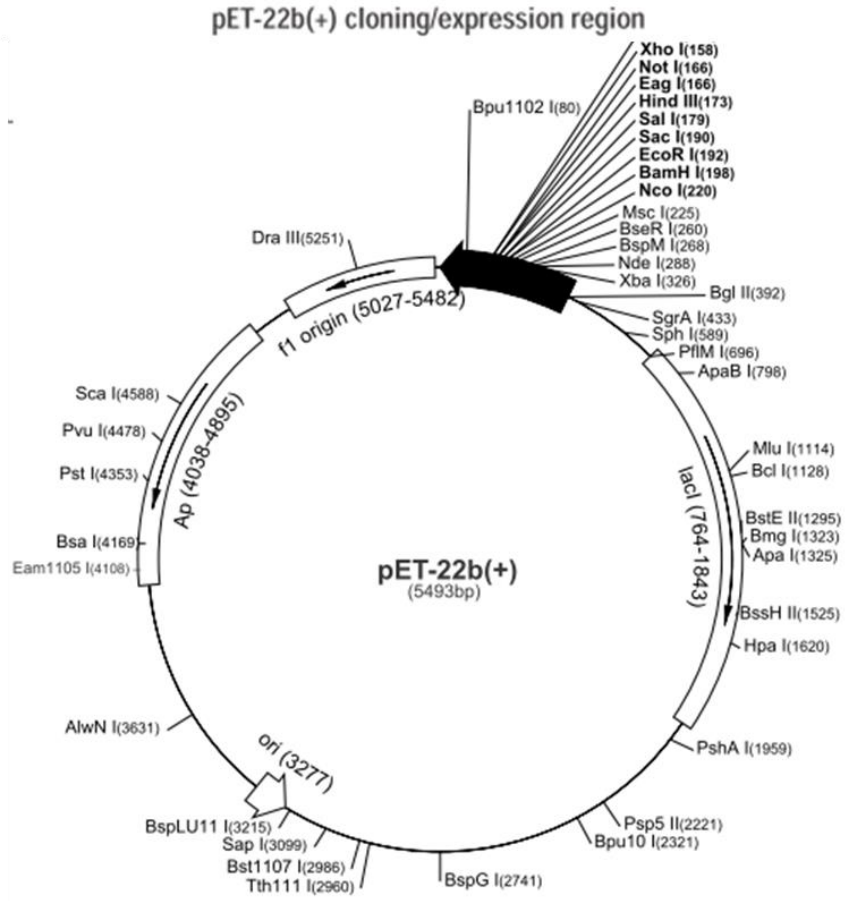
Anexo 3: Protocolo de extracción de ADN para *Streptomyces scabrissporus* NF3

1. Inocular en medio YMG por 48 h
2. Pasar a un tubo Falcon de 50 mL. Centrifugar a 8500 rpm por 10 min
3. Resuspender en 5 mL de PBS 1x
4. Inocular 2.5 ml de la suspensión en 50 ml de medio YEME por 24 h
5. Pasar a un tubo Falcon de 50 mL. Centrifugar a 8,400 x g por 10 min a 4°C
6. Desechar sobrenadante y lavar con 15 mL de sacarosa 10.3%
7. Centrifugar a 8,400 x g por 10 min a 4°C
8. Desechar sobrenadante. Añadir 5 mL de buffer P y lisozima (20 mg/mL)
9. Incubar a 37°C en el Rocker. Disgregar cada 15 min con micropipeta de 1 mL. Buscar la presencia de protoplastos en el microscopio.
10. Centrifugar a 6,800 x g por 10 min a 4°C
11. Desechar sobrenadante. Resuspender en 10 mL de sacarosa 10.3%, 200 µl EDTA 0.5M pH 8, 4 mL SDS 10%, 15 mL NaCl 6M. Incubar por 30 min a 4°C.
12. Centrifugar a 10,000 rpm por 30 min a 4°C
13. Recuperar sobrenadante. Añadir 1 volumen isopropanol. Incubar 1 hora a temperatura ambiente.
14. Centrifugar a 17,900 x g por 30 min a 4°C
15. Desechar sobrenadante. Añadir 1 mL de etanol 70%.
16. Centrifugar a 17,900 x g por 30 min a 4°C
17. Desechar sobrenadante y dejar secando los tubos.
18. Resuspender el pellet en 5 mL de agua miliQ estéril, o Tris-HCl 50 mM.

Correr el gel de electroforesis para ver la calidad y la presencia de RNA. En el caso de que haya RNA:

19. Agregar un volumen igual de fenol:cloroformo (1:1) al tubo
20. Centrifugar a 10,000 rpm por 10 min
21. Recuperar fase acuosa. Agregar un volumen igual de cloroformo.
Centrifugar a 10,000 rpm por 10 mi.
22. Repetir el paso anterior una vez más.

Anexo 4: Mapa del plásmido pET-22b (+)



Anexo 5: Condiciones térmicas de la PCR para la amplificación

A5-1: Condiciones térmicas de la PCR para la amplificación de los genes 16s ribosomal				A5-3: Condiciones térmicas de la PCR para la amplificación del gen B1			
Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos	Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94	30 s	1	Desnaturalización inicial	94	30 s	1
Desnaturalización	94	30 s	25	Desnaturalización	94	30 s	25
Alineamiento	64	30 s		Alineamiento	68	30 s	
Extensión	68	2 min		Extensión	68	2 min	
Extensión final	68	3 min	1	Extensión final	68	3 min	1
A5-3: Condiciones térmicas de la PCR para la amplificación del gen B2				A5-4: Condiciones térmicas de la PCR para la amplificación del gen TPT			
Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos	Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94	30 s	1	Desnaturalización inicial	94	30 s	1
Desnaturalización	94	30 s	35	Desnaturalización	94	30 s	25
Alineamiento	72	30 s		Alineamiento	65.8	30 s	
Extensión	68	2 min		Extensión	68	1 min	
Extensión final	68	3 min	1	Extensión final	68	3 min	1
A5-5: Condiciones térmicas de la PCR para la amplificación de los genes B1-TPT				A5-6: Condiciones térmicas de la PCR para la amplificación del clúster de genes "indigo"8			
Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos	Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94	30 s	1	Desnaturalización inicial	94	30 s	1
Desnaturalización	94	30 s	25	Desnaturalización	94	30 s	25
Alineamiento	68	30 s		Alineamiento	50.6	30 s	
Extensión	68	3 min		Extensión	68	5 min	
Extensión final	68	3 min	1	Extensión final	68	3 min	1

Anexo 6: Preparación de células eléctro-competentes

1. A partir de un stock de glicerol de las cepas de interés, inocular 4 mL de células en medio LB en un tubo de vidrio de 15 mL, e incubar a 37°C y 180 rpm O/N.
2. Inocular 100 mL del medio LB contenido en un matraz de 500 mL, y llevarlo a una O.D._{600nm} 0.1 con el cultivo saturado y crecer a 37°C a 250 rpm.
3. Preenfriar la centrífuga, las camisas de centrífuga, el agua miliQ, el glicerol al 10% y lo tubos Falcon y Eppendorf.
4. Cosechar las células entre 0.5-0.8 O.D._{600nm}. Antes de cosecharlas, colocar el cultivo en hielo por 15 min, pasar a tubos Falcon de 50 mL y centrifugar a 4000 rpm a 4°C durante 10 min. Desechar sobrenadante.
5. Lavar el pellet con 5 mL de agua miliQ fría, y centrifugar como en el paso 4.
6. Repetir el lavado y centrifugar a 6800 rpm por 5 min a 4°C y decantar.
7. Resuspender el pellet en 2 mL de glicerol al 10% frío, centrifugar como en el paso 4 y eliminar el sobrenadante con punta.
8. Resuspender las células en 250 µL de glicerol 10% frío.
9. Alicuotar 50 µL en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Almacenar a -70°C.

Es importante realizarlo todo en hielo.

Anexo 7: Protocolo de extracción de plásmido

1. Centrifugar 1.5 mL de cultivo a 17900 x g por 1 min. Eliminar sobrenadante (Repetir hasta que el cultivo se acabe).
2. Lavar con 1 mL de agua miliQ, vortexear. Centrifugar a máxima velocidad por un minuto.
3. Desechar sobrenadante. Repetir el paso anterior con SET
4. Desechar sobrenadante. Resuspender en 150 µL de SET más lo correspondiente de RNAsa, vortexear. Dejar incubando una hora a 37°C.
5. Agregar 350 µL de sol. II y mezclar por inversión hasta que la solución se vea clara.
6. Incubar 10 min en hielo y pre-enfriar el acetato
7. Agregar 250 µL de sol III fría, mezclar por inversión
8. Incubar 15 min en hielo
9. Centrifugar 10 min a máxima velocidad
10. Recuperar sobrenadante
11. Agregar 650 µL de isopropanol. Mezlar por inversión.
12. Centrifugar 10 min a máxima velocidad. Eliminar sobrenadante
13. Agregar 1 mL de etanol 70%. Mezclar por inversión, con mucho cuidado dos veces
14. Centrifugar 10 min a máxima velocidad. Eliminar sobrenadante
15. Secar pellet en SpeedVac
16. Resuspender en 50 µL de agua

Anexo 8: Protocolo de sonicación para células de *Escherichia coli*

El siguiente protocolo es para cultivos de 50 mL.

1. Resuspender las células en 300 μ L de amortiguador con inhibidor de proteasas (Anexo 1)
2. Sonicar 10 s a 60 de Amplitud. Dejar reposar 1 min en hielo. Repetir 3 veces.
3. Centrifugar a 5000 rpm por 10 min a 4°C.
4. El sobrenadante se recupera en un tubo y se adiciona 50 μ L Tritón X100 al 20% y se ajusta a 250 μ L con amortiguador.
5. Se resuspende el pellet en amortiguador, se vortexea y se sónica por 20 s a 60 de Amplitud, descansando 1 min en hielo. Se repite 3 veces.
6. Repetir paso 3 y 4.
7. Resuspender el pellet con 100 μ L de Tritón al 20% y 500 μ L de amortiguador.

Anexo 9: Protocolo para Western-Blot

1. Se prepara el amortiguador de transferencia al momento.
2. El equipo y el gel desnaturizante se resuspenden en el amortiguador por 10 min. La membrana se resuspende 10 min en metanol para activarla.
3. Se realiza un “sándwich” en el siguiente orden: fibra, filtro, membrana, gel desnaturizante, fibra, carga negativa. No se debe dejar ninguna burbuja de aire entre la membrana y el gel.
4. Se coloca el “sándwich” en el equipo de electroforesis.
5. La transferencia se realiza a 4°C a 60 V por 90 min.
6. Se saca la membrana y se lava con TSB + Tween20 al 0.1%.
7. Se prepara TSB + Tween20 al 0.1% más leche descremada al 3% por 30 min para bloquear la membrana.
8. Se agrega el primer anticuerpo (anti-His) en proporción 1:5000. Se incuba 1 h con agitación suave y a RT.
9. Se realizan 3 lavados con TSB + Tween20 al 0.1%.
10. Se prepara el segundo anticuerpo con TSB + Tween20 al 0.1% más leche descremada al 3%, se resuspende la membrana en ésta. Se incuba por una 1 h en agitación suave a temperatura ambiente.
11. Se lava 3 veces con TSB + Tween20 al 0.1%.
12. Se le agrega 1 mL de la solución reveladora hasta que se observen las bandas.
13. Se lava con agua destilada y se deja secar.

Anexo 10: Secuencias de ADN del gel 16S ribosomal

>L06

GAcGGcggctaacACAtGCAaGcGaacGAaTGAACCGCTTTCGGGCGGGGAaTAGT
GGCGAaCGGGTGAGTAACACGTGGGCAAtcGCCcTGCActCtGGGACAAGCCC
TGGAACGGGGTCTAATACCGGATAtGActGTCCGCCGCATGGTGGAtGGTGT
AAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTtGTTGGTGAGG
TAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGGCGACCGG
CCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG
GAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGAT
GACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACG
GTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGC
GGCTTGTACGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGT
CGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAG
CGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTC
TGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTA
gATACCCTGGTAGTCCACGCCGTaaACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACAT
TCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGGAGT
ACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGG
CGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGA
CATAACCGGAAACGTccGAGAcAGGCGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGT
GGTGCATGGCTGTCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA
ACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGCTGGGG
ACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCA
AGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTA
CAATGAGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAG
TTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATC
GCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCC
CGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAAACCCCTTG
TGGGAAGGGaAGCTGTCgagaGGTGGGGACTGGCgaATTGGGGACGaAAGTcgt
acaaagtaagCCcCggagtGCc

>NF3

tctTaGCtGGatcCGCTtATTCTCgGcTGAACCCTTcGgtGGATGAGTGGCGAACGG
GTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCCTGCACTCTGGGATAACTTCGGGAAAC
CGGAGCTAATACCGGATAACATCCTCCTCCGCATGGTGGGGGGTTGAAAGTT
CCGGCGGTGCAGGATGGGCCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAGTG
GCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACA
CTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
TTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGG
CCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAGAGTGACGGTACC
TGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG
GGTGCAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCCT
GTCGCGTCGGATGTGAaAACTCGGGGCTTAACCCCGAGCCTGCATTGATAC
GGGCAGGCTAGAGTTCGGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGA
AATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCC
GATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACC
CTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGAACTAGGTGTGGGCGAcATTCCACG
TCGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCC
GCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGAGGCGGAGC
ATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACAC
CGGAAACATCTGGAGACAGGTGCCCTTTTGGTTCGGTGTACAGGTGGTGCAT
GGCTGTTCGTTCAGCTCGTGTTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG
CAACCCTCGTTCTGTGTTGCCAGCATGCCTTTCGGGGTGTGGGGACTCACA
GGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATC
ATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAG
CTGCGATACCGCAAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGAT
CGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCTCTAGTAATCGCAGATC
AGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACG
TCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACTCGCAAGAGGGGG
AGCCGTGCAAGGTGGGACCAGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCC
GTACCGaagtc

Anexo 11: Secuencias de aminoácidos de Bacteriocinas tipo III encontradas en las cepas de *Streptomyces* L06 y NF3

>L06_c7

MRIARTLAVAGSGSAALALPLMGAANAHAAEKSAPEAVAVQQAVAAAQQQAPNN
AAADAGTYEVVVG DYLA KIADEQHVDGGWEQLYQDNREVVGSNPNLILPGMKLS
VDGTAAEAPKPAPAKPQSAPKQAAPKADTGASTAQKTETAPKPAAPAKPETEQA
EQPAASGDWVRPVEASTSTAYRASGGSWSSGYHTGVDFSASSGTSVKAIGAGT
VVSAGWSGSYGNEVVIKHADGKYSQY AHLSSLSVSSGQSVTPGQQIGLSGSTGN
STGPHLHFEVRTGPSYGS DIDPLAYLRGHGVS V

>L06_c14

MSKRATNLNLASPQLRTRVAVLAAGLGASAM LGVGVASAATGADTAPGAAAGAV
AAQADAQSKAATAVKHAEQSKKEAPKGKPAEKKAEKKPESKPAKKKSAWTIPVN
NATISATYGTGGDRWANKHSGQDYAVSVGTDVHSAAGGT VVKAGGNGAGDGP
AYGNAV VVKHTDNTYTQY AHL SQIN VSPGQTVKEGQKIALSGNTGNSSGPHLHF
EVRTSPNYGSAIDPAAFLRSKGL

>L06_c19

MAVRGRHRRRQQSRINRASLTVTAGGAGLALPLVAAGTADAASADTWAKVAAC
ESSGDWSINTGNGYYGGLQFKQSTWEAYGGGAYASRADLASKDQQIAVAEKVL
DGQGP GAWPACSQKAGLTRGGPAPA APEAAPP RPAPAKAPAATPTTTPQSKAGT
AEMYTVVRGDTLSQIAEEQRVKGGWQRLYQANRERVGTDPDLIVPGQRLQLKP
GAATPPKDRPAPRAKDRTGPEPTGKQAAAKAAEAKKAADAKKAAEARKAAEARK
AAA AKKAAEAKKAAA AKKAAEAKKVSAPSSPRFSSPVDAGTGTPYRASGSSWS
KGYHTGVDFPVPTGTSV KAAASGTVVSAGWGGSYGYQVVIKHTDGKYSQY A HL
SALT VRSGQSVQAGQRIARSGSTGNSTGPHLHFEVRTGPGFGSDIDPLAYLRGG
GVKV

>L06_c20

MNNLHCDLAPVSAAAWAEIEDEVRRTFKEHLAGRRVVDVDGPTGPDRAAVTTGH
LTEITSPGDGLRARLHASLPLIELRRPFTLKRQDIDDVERGSRNSDWDPAKDAAR
AMATAEDRAVFEGWPTASVTGIRGGSSHPELHLPEAVTDYPDLVSQALTALRLA
GVAGPYALLLGATAYTAVNETSDHGY PVL SHLARLLGDGQIIWAPGIEGGAVVSL
RGGDFSLYLGQDLSIGYLDHDADTVRLYLQETLTFSLDSPEAGVALRPA

>NF3_c15

VGEGKIFVQS FITPARKPKNARLALTLGMAGAIVAAPLITGFATSATAAPVSVWDK
VAMGESSGNWHINTGNGFYGGLQFTQSTWNEFFGGQYAPRADLATKDQQAIA
EKVLAVQGP GAWPNTSGPAGLTRGGAAPAVSPNAKSGSTKSTVKVAPKVAEKP

AESAPAPKAPKIEVVPAETKATTTTYSVVKGDTLSKIAAAKDVAGGWHKLYADN
KSVIGGNPNLILVGQKLSLSGKAAATTKTEAAPKAEAKVETKTETKPTASVKVAPK
PVTKEKAPVVAKDSSAKAGSTAVNSSGYVAPVNGSLGTAFGTGGSMWSSGSHT
GQDFVVGTTGTSVKAITSGTVVSAGNGGAYGNEVVIKHADGKYSQY AHLSSIGVR
AGQTVSTGQQIGLSGATGNVTGPHLHFEIRTPNYGSGINPVTYLRAHGVNL

>NF3_c32

MLSGTGRHRRRSTSRTRRLIAAAGVAGVGVAMPIIGAGTAQAASVSTWDKVAQC
ESTGNWKINTGNGFYGGLQFTQSTWNEFGGSQY AARADQATKSQQIAIAEKVLK
SQGPGAWPVCSVKAGLTRGGAAPDLDTGSAGGKTAPKTAPKTESAKPAPKTET
AKPKIEVKSEAPKTEAPKDETPKTEAPKAAKTAATGSYVVVAGDTLSQIANARNV
PGGWPKLYEANKSVVGENPDLIFPGQQLTVDGKAAPAAETKTETKTEPKAEAPK
AETPKAEAKTEVKPAAAPKTTVKSESTKADSSAKGSEQASGSYVAPVSGATLTAS
FGSGGSRWSSGHHTGQDFAVSTGTTVRAVTS GTVVSAGWGGAYGNEVVIRHA
DGKYTQY AHLSSISVKAGMKVQTGQKIALSGATGNVTGPHLHFEVRTTPNYGSA
VNPMTWLRSHGVNV