



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN CLÚSTER BIOSINTÉTICO ASOCIADO A LASSO
PÉPTIDOS DE *STREPTOMYCES SCABRIPORUS* NF3.

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

STEFANY DANIELA RODRÍGUEZ LUNA

DR. SERGIO SANCHEZ ESQUIVEL

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

DR. JULIO CESAR CARRERO SÁNCHEZ

Instituto De Investigaciones Biomédicas, UNAM.

DR. ADELFO ESCALANTE LOZADA

Instituto de Biotecnología, UNAM.

Ciudad Universitaria, CDMX, Septiembre 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

DRA. ROMINA MA DE LA PAZ RODRÍGUEZ SANOJA	PRESIDENTE
DR. LUIS DAVID ALCARAZ PERAZA	VOCAL
DR. JOSÉ GUILLERMO AGUILAR OSORIO	VOCAL
DRA. CARMINA MONTIEL PACHECO	VOCAL
DR. GERARDO ALFONSO CORZO BURGUETE	SECRETARIO

ESTA TESIS FUE DESARROLLADA BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL Y LA ASESORÍA DE LA DRA. CORINA DIANA CEAPĂ, EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL, DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA, EN EL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.

FINANCIAMIENTO

DURANTE LA REALIZACIÓN DE ESTE PROYECTO SE RECIBIÓ UNA BECA POR PARTE DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA CON EL NÚMERO 854897. ASÍ MISMO PARTE DE ESTE TRABAJO FUE FINANCIADO POR PAPIIT DGAPA, UNAM IN202216 Y POR EL PROGRAMA NUATEI DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.

AGRADECIMIENTOS

A LA DRA. CORINA DIANA CEAPĂ POR ESTAR SIEMPRE APOYÁNDOME, POR TODOS LOS CONSEJOS Y SUGERENCIAS, POR EL INCANSABLE IMPULSO QUE ME DIO A LO LARGO DE ESTOS DOS AÑOS, PORQUE SIN SU APOYO ESTO NO HUBIERA SIDO POSIBLE.

AL DR. SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL POR ACEPTARME EN SU LABORATORIO, POR SU EXTENSA TUTORÍA Y POR SER EL PILAR EN MI DESARROLLO PROFESIONAL.

A MI COMITÉ TUTOR, EL DR. JOSÉ ADELFO ESCALANTE Y EL DR. JULIO CESAR CARRERO POR SUS RECOMENDACIONES Y COMENTARIOS DURANTE LA REALIZACIÓN DE ESTE PROYECTO.

A LA DRA. SILVIA IVONNE MORA, POR SU APOYO EN EL ANÁLISIS POR MASAS DEL PÉPTIDO Y POR EL GRAN INTERÉS QUE MOSTRO EN QUE ESTE PROYECTO SALIERA ADELANTE.

A LA DRA. BEATRIZ RUIZ POR SU GRAN ASESORÍA TÉCNICA.

A LA M. EN C. NIDIA MALDONADO CARMONA POR SIEMPRE DARME SU APOYO Y COMPARTIRME SU CONOCIMIENTO, SIN NINGÚN INTERÉS MÁS QUE DE AYUDARME A CRECER COMO CIENTÍFICA.

A LA M. EN C. MELISSA VÁZQUEZ HERNÁNDEZ POR EL AISLAMIENTO DEL DNA PERTENECIENTE A *S. SCABRISPORUS* NF3.

AL PROGRAMA DE APOYO A LOS ESTUDIOS DEL POSGRADO (PAEP) POR SU APOYO PARA ASISTIR A UN CONGRESO INTERNACIONAL.

DEDICATORIAS

PARA MIS PADRES ELSA Y JOSÉ, QUIENES ME HAN DADO TODO, ME HAN APOYADO SIEMPRE, POR ELLOS ES QUE ESTOY AQUÍ Y QUE SÉ QUE PUEDO APUNTAR MÁS ALTO.

PARA MI CÓMPLICE ALEJANDRO, QUIEN HA ESTADO AHÍ EN CADA MOMENTO, QUIEN ME HA ALENTADO E IMPULSADO AL MÁXIMO, SIEMPRE CREYENDO EN MÍ Y HACIÉNDOME SABER QUE JUNTOS LO PODEMOS TODO. TE AMO POR SIEMPRE.

PARA MI TÍO PONCHO, QUE ME ACOMPAÑO EN ESTE CAMINO Y LO TORNO MÁS FÁCIL, BRINDÁNDOME SIEMPRE TODO SU APOYO.

PARA MI HERMANA PAMELA, POR ENSEÑARME EL VALOR DE LA FORTALEZA, POR TODO SU CARIÑO Y LOS BUENOS MOMENTOS QUE HEMOS PASADO JUNTAS.

PARA MI SOBRINA MÍA, QUE CON SU SONRISA Y OCURRENCIAS ALEGRABA MIS DÍAS Y HACIA MÁS LIVIANA LA CARGA.

PARA MIS AMIGOS, DAFNE, JANETH, URIEL, QUE CREYERON SIEMPRE EN MÍ Y ESTUVIERON SIEMPRE PRESENTES, AYUDÁNDOME A NO RENDIRME.

PARA DIANA POR SU GRAN COMPAÑERISMO Y AMISTAD, POR TODO SU APOYO DURANTE EN SU ESTANCIA Y PORQUE ME ENSEÑÓ A TRANSMITIR LO QUE HE APRENDIDO.

PARA MIS COMPAÑEROS DE LABORATORIO, QUE DURANTE MI ESTANCIA TODOS SIN EXCEPCIÓN EN ALGÚN MOMENTO ME BRINDARON SU APOYO Y CONOCIMIENTO CORI, SILVIA †, MONE, OSIRIS, BERE, NIDIA, MELISSA, PAU, NAT, OMAR, AJIT, AUGUSTO, BETY, BRENDA, KAT, SARAI, DULCE, KAREN, LENIN.

1 CONTENIDO

1	CONTENIDO.....	6
A.	ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
B.	ÍNDICE DE TABLAS	13
C.	TABLA DE ABREVIATURAS	14
2	RESUMEN	15
3	ABSTRACT	16
4	MARCO TEORICO	17
1.	PRODUCTOS NATURALES COMO FUENTE DE MOLÉCULAS BIOACTIVAS.	19
1.1	MICROORGANISMOS ENDÓFITOS	19
1.2	PRODUCTOS NATURALES SINTETIZADOS RIBOSOMALMENTE Y POSTRADUCCIONALMENTE MODIFICADOS.....	22
1.3	ESTRATEGIAS PARA EL DESCUBRIMIENTO DE NUEVAS MOLÉCULAS BIOACTIVAS.....	31
1.4	EXPRESIÓN HETEROLOGA DE CLÚSTERES BIOSINTÉTICOS.....	34
5	ANTECEDENTES	38
6	JUSTIFICACIÓN	39
7	HIPÓTESIS.....	40
8	OBJETIVO	41
9	METODOLOGÍA	42
1)	CEPAS UTILIZADAS.....	43
2)	ENSAYOS DE ANTIBIOSIS CON LA CEPA SSNF3	43
3)	BÚSQUEDA DE CLÚSTERES BIOSINTÉTICOS Y ANÁLISIS DE LOS MISMOS.	44
4)	EXPRESIÓN DE HETERÓLOGA DEL CLÚSTER DE INTERÉS.	45

4.2	TRADUCCIÓN DE LAS PROTEÍNAS EN <i>E. COLI</i> ROSETTA (DE3) Y <i>S. LIVIDANS</i> TK24.....	53
5)	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL PRODUCTO OBTENIDO.....	58
10	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
1)	ENSAYOS DE ANTIBIOSIS CON LA CEPA SSNF3.....	60
2)	BÚSQUEDA DE CLÚSTERES BIOSINTÉTICOS Y ANÁLISIS DE LOS MISMOS. ...	61
3)	EXPRESIÓN DE HETERÓLOGA DEL CLÚSTER DE INTERÉS.....	68
4)	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL PRODUCTO OBTENIDO	85
11	CONCLUSIONES.....	92
12	PERSPECTIVAS.....	93
13	REFERENCIAS	94
14	MATERIAL SUPLEMENTARIO	104
a.	ANEXO S1. Medios de cultivo utilizado y soluciones.	104
b.	ANEXO S2. Aislamiento de DNA genómico de <i>Streptomyces scabrisporus</i> NF3.....	108
c.	ANEXO S3. Condiciones de reacción para la PCR de amplificación.....	109
d.	ANEXO S4. Vectores para traducción de las proteínas asociadas a la formación del lasso péptido y la producción del mismo.....	110
e.	ANEXO S5. Preparación de células electrocompetentes y electrotransformación	111
f.	ANEXO S6. Protocolo para conjugación de <i>Streptomyces lividans</i> TK24 con <i>E. coli</i> ET12576.....	112
g.	ANEXO S7. Protocolo de extracción de plásmido.	114
h.	ANEXO S8. Protocolo de sonicación para células de <i>E. coli</i> Rosetta y <i>S. lividans</i> TK24. 115	
i.	ANEXO S9. Cebadores del clúster para verificación y secuenciación.....	116
j.	ANEXO S10. Soluciones para SDS- PAGE y Mini-PROTEAN® Tris-Tricina.	117
k.	ANEXO S11. Vector p RARE.....	121

A. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Relación entre el descubrimiento de antibióticos y el desarrollo de la resistencia a estos. R- resistente, RMA- Resistente a múltiples antibióticos, RTA- Resistente a todos los antibióticos. Modificado de Ventola, 2015.	18
Figura 2. Interacción simbiótica bacteria planta (a) Quitinasa familia 18 (PDB 4Q22), (b) Sideróforo, (c) hormonas vegetales, (d) espermidina, (e) Bacteriocina (aquí un lasso péptido). Figura de Ceapă <i>et al.</i> , 2018.	20
Figura 3. Representación del ciclo de vida de una Actinobacteria. (Figura de Barka <i>et al.</i> , 2016).	21
Figura 4. Lasso péptidos de distintas clases. (Figura de Tietz <i>et al.</i> , 2017).	23
Figura 5. Algoritmo de RODEO para elegir los precursores de lasso péptido (Modificado de Tietz <i>et al.</i> , 2017).....	24
Figura 6. Estabilidad térmica y a degradación enzimática de lasso péptidos (Figura de Hegemann <i>et al.</i> , 2015).	26
Figura 7. Organización estructural de los genes asociados a los clústeres funcionales conocidos para lasso péptidos (Figura de Hegemann <i>et al.</i> , 2015).....	27
Figura 8. Estructura cristalizada de la microcina J25 (PDB 1PP5), a partir de expresión heteróloga en <i>E. coli</i> , obtenida por NMR.	29
Figura 9. Mecanismo propuesto para la formación de un lasso péptido (Figura de Hegemann <i>et al.</i> , 2015.).....	30
Figura 10. Motivos conservados presentes en el péptido líder de un lasso péptido. T -2, sitio de corte, (Figura de Hegemann <i>et al.</i> , 2015).....	31
Figura 11. Utilidad de la minería apoyada de las ciencias ómicas en el descubrimiento de nuevas moléculas bioactivas (Modificado de Ziemert y Weber, 2016).	32
Figura 12. Expresión heteróloga de BGC en distintos hospederos heterólogos como <i>E. coli</i> o <i>Streptomyces</i> , para la expresión de clústeres biosintéticos de más de 10 kpb (Figura de Nah <i>et al.</i> , 2017).....	35
Figura 13. Puntos clave para llevar a cabo la expresión heteróloga (Modificado de Harvey <i>et al.</i> , 2018).....	36
Figura 14. Modelo de ensayo de antibiosis.	44

Figura 15. Estrategia de clonación del clúster de interés en pIJ6902 y pET22b.	49
Figura 16. Modelo de ensayo de antibiosis por difusión en placa.	59
Figura 17. Ensayo de antibiosis de SSNF3 frente: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (SC), <i>Bacillus subtilis</i> (BS), <i>Escherichia coli</i> (EC), <i>Micrococcus luteus</i> (ML).....	60
Figura 18. Localización de los metabolitos secundarios en el genoma de <i>Streptomyces scabrisporus</i> NF3 (Modificado de Ceapă <i>et al.</i> , 2018).....	61
Figura 19. Análisis bioinformático de los clústeres biosintéticos del genoma de SSNF3, con el programa AntiSMASH (Weber <i>et al.</i> , 2017).....	61
Figura 20. a) Clústeres biosintéticos de los lasso péptidos anotados en el genoma de SSNF3. b) Precursores peptídicos de los lasso péptidos anotados en el genoma de SSNF3. Lasso péptido I, consta de 4045 pb. Lasso péptido II, consta de 2822 pb ubicados en el contig 3 del genoma de estudio.	63
Figura 21. Representación esquemática de las posibles estructuras del lasso péptido. A) Lasso péptido con extremo carboxilo terminal libre. B) Lasso péptido con extremo carboxilo terminal estabilizándose mediante interacción estérica con el anillo.....	64
Figura 22. Modelado tridimensional A) Proteína C perteneciente al clúster ciclasa 450 residuos (63% de su secuencia) fueron modelados con 100.0% de confianza con relación al modelo con mayor similitud, la cual fue un sintetasa de carbapenem de <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>Carotovorum</i> . B) Proteína B perteneciente al clúster, proteasa putativa, 41 residuos (24% de su secuencia) fueron modelados con 94.8% de confianza con relación al modelo con mayor similitud, la cual fue una estructura cristalizada de una cisteína proteasa putativa el <i>Citofago hutchinsonii</i> . C) Proteína E perteneciente al clúster isoaspartato-o-metiltransferasa, 310 residuos (78% de su secuencia) fueron modelados con 100.0% de confianza con relación al modelo con mayor similitud, la cual fue una isoaspartato-o-metiltransferasa de <i>Thermotoga maritima</i> cepa ATCC 43589.....	65
Figura 23. Predicción de hélices transmembranales, provenientes de la secuencia de aminoácidos asociada a la proteína C (ciclasa).	66
Figura 24. Predicción de los sitios de unión a ligando con ayuda de 3D ligand, asociada a la proteína C (ciclasa), ligando- moléculas verdes, aminoácidos de los sitios de unión identificados con colores.	66

Figura 25. Predicción de los sitios de unión a ligando con ayuda de 3D ligand, asociada a la proteína isoaspartato-o-metiltransferasa, ligando- moléculas verdes, aminoácidos del sitio de unión identificados con morado y azul.....	67
Figura 26. a) Aislamiento de DNA cromosomal de SSNF3. b) PCR accuprime para clonación del clúster Lass1 (4045 pb), protocolo en tres pasos con temperatura de alineamiento de 60°C.	69
Figura 27. a) Verificación de la construcción Lass1 en pET22b mediante DRE <i>EcoR1/NdeI</i> , 1 h a 37°C de las Colonias positivas para la transformación en <i>E. coli</i> DH5α. Control 1. Vector sin cortar (pET22b). Control 2: vector cortado con cada una de las enzimas en las mismas condiciones pET22b/ <i>EcoR1</i> y pET22b/ <i>NdeI</i> . b) PCR de colonia para verificación de la construcción con <i>Phire</i> plant polimerasa <i>E. coli</i> DH5α con cebadores internos (1897 pb).....	69
Figura 28. a) Ensayos de restricción de pIJ6902 con <i>EcoR1</i> y <i>BamH1</i> con incubación de 3 h en las condiciones óptimas de acción de cada enzima. b) Verificación de la clona: Restricción de los plásmidos aislados provenientes de las colonias positivas para la transformación de la construcción con Lass 1 en el vector pIJ6902 (SP1-7) en <i>E. coli</i> DH5α con <i>BspH1</i>	70
Figura 29. (a) Verificación de la clona mediante PCR <i>Phire</i> plant Tm: 60°C con cebadores internos para Lass1 SP6 en <i>E. coli</i> ET12576 (1897pb). (c) PCR de colonia (<i>taq</i> platinum) con cebadores internos (1897 pb) de <i>Streptomyces lividans</i> TK24.....	71
Figura 30. Secuenciación de DNA asociado al péptido lasso conjugado en SLITK24.	72
Figura 31. Apariencia macroscópica <i>Streptomyces lividans</i> TK24. A) Transformada con el vector pIJ6902. B) Transformada con la construcción de Lasso péptido 1. Microscopio óptico binocular Spencer ®, aumento 20X.....	72
Figura 32. Apariencia macroscópica <i>Streptomyces lividans</i> TK24. A) Transformada con el vector pIJ6902. B) Transformada con la construcción de Lasso péptido 1.....	73
Figura 33. a) SDS- PAGE de 12% de acrilamida, con las proteínas asociadas al clúster lasso péptido I en la inducción dentro de <i>E. coli</i> Rosetta teñidos con azul de Coomassie	74
Figura 34. a) SDS- PAGE de 12% de acrilamida, con las proteínas asociadas al clúster lasso péptido I en la inducción dentro de <i>S. lividans</i> TK24, teñidos con azul de Coomassie.	75
Figura 35. Geles de Tris-tricina para la identificación del lasso péptido, producido mediante la inducción del clúster biosintético en <i>E. coli</i> Rosetta.	77

Figura 36. Geles de Tris-tricina para la identificación del lasso péptido, producido mediante la inducción del clúster biosintético en *S. lividans* TK24. 78

Figura 37. Carga neta del lasso péptido dependiente del pH (BACHEM- Peptide calculator).79

Figura 38. Cromatograma de UPLC-MS asociado a la masa $(M+4H)^{4+}$ del lasso péptido ciclado, (Tabla 9), se indica con una flecha el tiempo de retención donde fue localizada (6.58 min). a) Lass 1 extraído con MeOH. b) pET22b (vector vacío) extraído con MeOH, como control negativo. c) Medio M9 sin inocular extraído con MeOH, como control negativo, provenientes de la traducción de las proteínas del clúster en *E. coli* Rosetta. 80

Figura 39. Identificación de la masa asociada al péptido ciclado en su forma $(M+4H)^{4+}$ (Tabla 9), señalada con una línea en el cromatograma, la cual se encontró en el pico indicado en la figura 38 provenientes de la traducción de las proteínas del clúster en *E. coli* Rosetta, comparándose con sus controles negativos pET22b y el medio M9 sin inocular, extraídos bajo las mismas condiciones..... 81

Figura 40. Sumatoria de las 4 ionizaciones del péptido ciclado $(M+4H)^{4+}$ (Tabla 9) proveniente de la traducción de las proteínas del clúster en *E. coli* Rosetta, asociada a la ionización descrita en la figura 39, señalado con una flecha se encuentra la sumatoria asociada a la masa total del péptido ciclado 3385 Da..... 82

Figura 41.Cromatograma de UPLC- MS asociado a la masa $(M+3H)^{3+}$ y $(M+4H)^{4+}$ del Lasso péptido ciclado (Tabla 9) se indica con una flecha el tiempo de retención donde fueron localizadas (3.4 min). a) Lass 1 extraído con MeOH. b) pIJ6902 (vector vacío) extraído con MeOH como control negativo, provenientes de la traducción de las proteínas del clúster en *S. lividans* TK24. 83

Figure 42. Identificación de las masas asociadas al péptido ciclado en su forma $(M+3H)^{3+}$ y $(M+4H)^{4+}$ las cuales se indican con una flecha (Tabla 9), ambas se encontraron en el pico indicado en la figura 41 provenientes de la traducción de las proteínas del clúster en *S. lividans* TK24. 83

Figura 43. Identificación de la masa asociada al péptido ciclado en su forma $(M+3H)^{3+}$ (Tabla 9) señalada con una línea en el espectro de masas. Se encontró en el pico indicado en la figura 41 proveniente de la traducción de las proteínas del clúster en *S. lividans* TK24, comparándose contra su control pIJ6902, extraído bajo las mismas condiciones. 84

Figura 44. Sumatoria de las 3 ionizaciones del péptido ciclado (M+3H) ³⁺ (Tabla 9) proveniente de la traducción de las proteínas del clúster en <i>S. lividans</i> TK24, asociada a la ionización descrita en la figura 43, señalado con una flecha se encuentra la sumatoria de la masa total del péptido ciclado 3385 Da.	84
Figura 45. Ensayos de antibiosis frente a bacterias Gram negativas y positivas, patógenas y levaduras por acción del extracto precipitado con metanol proveniente de la inducción de las proteínas asociadas al clúster Lass1 en <i>E. coli</i> Rosetta. L Lasso péptido (Muestra), C- pET22b vacío, C+ apramicina 200 µg/mL.	86
Figura 46. Ensayos de antibiosis del extracto obtenido de la producción de lasso péptido 1 en <i>S. lividans</i> TK24 y en <i>E. coli</i> Rosetta frente a bacterias Gram-negativas, Gram-positivas y patógenas.....	87
Figura 47. Halos de inhibición asociados al extracto purificado con MeOH, de lass1 y su control provenientes de la inducción en <i>S. lividans</i> TK24, frente a <i>S. aureus</i>	88
Ecuación 1. Ecuación de t-student (pareada).....	59
Ecuación 2. Ecuación de t-student (pareada) para determinar si existe diferencia significativa entre el halo de inhibición producido por la muestra en comparación con el producido por el control en el extracto purificado con MeOH, proveniente de la inducción <i>S. lividans</i> TK24 frente a <i>S. aureus</i>	88

B. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clases de lasso péptidos identificadas actualmente, con información de Hegemann <i>et al.</i> , 2015; Maksimov <i>et al.</i> , 2012 y Tietz, <i>et al.</i> , 2017.....	23
Tabla 2. Distribución taxonómica de los lasso péptidos en diferentes géneros de bacterias, obtenidos mediante el algoritmo de utilizado por RODEO (Modificado de Tietz <i>et al.</i> , 2017)..	25
Tabla 3. Ejemplos de los lasso péptidos producidos y a los cuales se les ha identificado actividad biológica. (Recopilación de Hegemann <i>et al.</i> , 2015; Maksimov <i>et al.</i> , 2012; Gavrish <i>et al.</i> , 2014, Li <i>et al.</i> , 2015).	27
Tabla 4. Cepas utilizadas, medios de cultivo y condiciones de crecimiento.	43
Tabla 5. Cebadores utilizados en la amplificación del lasso péptido I de interés por PCR.....	48
Tabla 6. Condiciones para digestión con enzimas de restricción.	50
Tabla 7. Condiciones de la reacción de ligación.....	51
Tabla 8. Gradiente de solventes utilizado en la corrida del UPLC-MS para el lasso péptido en hospederos heterólogos.	56
Tabla 9. Masas teóricas asociadas al lasso péptido en sus distintas conformaciones, y en sus distintas ionizaciones (Fragment ion calculator).	57
Tabla 9A. Secuencias de aminoácidos asociadas al lasso péptido en sus distintas conformaciones.....	57
Tabla 10. Moléculas asociadas al sitio de unión a ligando de la proteína C (ciclasa).	67
Tabla 11. Moléculas asociadas al sitio de unión a ligando de la proteína isoaspartato-o-metiltransferasa.	68

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla S 1. Medio M9	107
Tabla S 2. Condiciones de PCR para lasso péptido I.....	109
Tabla S 3. Cebadores internos del clúster para verificación.....	116
Tabla S 4. Cebadores para secuenciación.....	116

C. TABLA DE ABREVIATURAS

BGC	Clúster de genes biosintéticos
μL	Microlitro
mL	Mililitro
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
mM	Milimolar
μM	Micromolar
cm	Centímetros
NRPS	Sintasa de péptidos no ribosomales
PKS	Policetido sintasa
O/N	Toda la noche
Min	Minuto
rpm	Revoluciones por minuto
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
ms	Milisegundo
M	Molar
pb	Pares de bases
kDa	Kilodalton
TEMED	Tetrametiendiamina
SSNF3	<i>Streptomyces scabrissporus</i> NF3
RiPPs	Productos naturales sintetizados ribosomalmente y postraduccionalmente modificados
SIiTK24	<i>Streptomyces lividans</i> TK24

2 RESUMEN

En las últimas décadas, la resistencia de los microorganismos a los antibióticos ha aumentado de manera alarmante. Lo cual ha hecho que actualmente esto constituya un gran problema para el sistema de salud pública. El creciente surgimiento de microorganismos patógenos multirresistentes a los antibióticos, demanda la búsqueda urgente de nuevas moléculas bioactivas para su control.

Los microorganismos endófitos son una fuente potencial para la identificación de nuevas moléculas bioactivas. En nuestro laboratorio, nos encontramos interesados en la aplicación de la minería genómica para la búsqueda de metabolitos secundarios inéditos, como una nueva alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas de origen bacteriano.

Los ensayos de antibiosis en la cepa *Streptomyces scabrissporus* SS NF3 sugirieron que esta podría producir compuestos activos contra bacterias Gram-negativas, en condiciones de laboratorio. La minería genómica de esta Actinobacteria, mostró la presencia de varios lasso péptidos nuevos. Los lasso péptidos son péptidos pequeños con topología de lasso, que han mostrado una gran variedad de actividades biológicas, como antibacterianos, antagonistas de receptores o inhibidores de algunas enzimas; además de que exhiben estabilidad térmica y a la degradación enzimática.

Se seleccionó un operón que codifica para la síntesis de un lasso péptido, consta de 4045 pb. Dicho operón, fue clonado en *Escherichia coli* DH5 α , para posteriormente ser traducido en *E. coli* Rosetta y en *Streptomyces lividans* TK24. Este lasso péptido llamado Lunamicina: 1,5-dihidroxi-2-(hidroximetil)-2,5,7-trimetilspiro[1*H*-indeno-6,1'-ciclopropano]-4-ona, es el primero que ha sido descrito a partir de una Actinobacteria, el cual presentó una serina en lugar de una treonina conservada en el sitio catalítico.

3 ABSTRACT

In the last decades, the resistance to antibiotics has increased alarmingly and currently constitutes a huge public health problem. The endophytes microorganisms could be a potential source for the identification of novel bioactive molecules, such as lasso peptides. In our lab, we are interested in the application of genome mining to bacteria, as a way to look for novel secondary metabolites, with potential for the treatment of infectious diseases of bacterial origin. Genome mining of the newly sequenced *Streptomyces scabrisporus* NF3 (SS NF3) revealed the presence of several unusual lasso peptides.

Antibiosis assays in SS NF3 indicate that the bacteria can produce compounds active against Gram-negative bacteria and against fungi, in laboratory conditions. Lasso peptides in the past showed varied biological activities, including antibacterial, receptor antagonist or enzyme inhibitor, exhibiting also thermal and proteolytic stability. Due to their multiple mechanisms of action, they present very little resistance from their targets.

The operon of interest, that encodes the synthesis of a lasso peptide, consists of 4045bp. This operon was cloned into *E. coli* DH5 α , and translates in *E. coli* Rosetta and *Streptomyces lividans* TK24.

This lasso peptide, termed Lunamycin 1,5-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)-2,5,7-trimethylspiro[1*H*-indene-6,1'-cyclopropane]-4-one, is the first lasso peptide described from an Actinobacteria that presents a serine instead of a conserved threonine in the catalytic site.

4 MARCO TEÓRICO

La automedicación, el sobreuso y la administración excesiva al ganado de antibióticos son las principales causas de la resistencia a estos (de Lima *et al.*, 2012) (Magouras, 2017), ya que se subministran sin restricción. Se estima que si esta tendencia continua para el año 2050 el número de muertos por esta causa aumente a 10 millones (de Kraker *et al.*, 2016).

Simultáneamente, se ha observado un incremento mundial en la demanda de compuestos bioactivos para el tratamiento de otras enfermedades, como el cáncer (metotrexato), la diabetes (metformina) y la hipercolesterolemia (captopril) (Demain y Sánchez, 2015). Aunado a esto se observó un claro declive en la investigación y descubrimiento de antimicrobianos por parte de las grandes industrias farmacéuticas, por ello la importancia del estudio y descubrimiento de nuevas moléculas bioactivas por el lado de la academia, se convierte en un esfuerzo crucial (Jagusztyn-Krynicka y Wszyńska, 2008).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), ha publicado una lista de los microorganismos que representan una amenaza crítica para la población *Acinetobacter baumannii*, resistente a carbapenem antibiótico de última generación perteneciente al grupo de los Beta lactámicos, *Pseudomonas aeruginosa*, también resistentes a carbapenem, y algunas *Enterobacteriaceae*, como *Klebsiella*, *E. coli*, *Serratia*, y *Proteus*, que de igual forma son resistentes a carbapenem, indicando que tienen una resistencia de espectro extendido frente a estos, (Van Duin y Paterson, 2016).

Para todos ellos la última línea de defensa es la colistina, sin embargo estudios recientes han reportado la existencia de un gen denominado mcr-1, que es transmitido mediante transferencia horizontal y le confiere a la bacteria resistencia a la lisis inducida por colistina en Gram negativas (McNair *et al.*, 2018), lo que demuestra que las bacterias tienen la capacidad de generar resistencia casi inmediata a los antibióticos como se muestra en la figura 1.

A la fecha la gran mayoría de los antibióticos utilizados en la medicina actual, provienen de la modificación química de antibacterianos previamente aislados de hongos como la penicilina y de estreptomicetos como la estreptomcina (Lewis, 2013). Como se puede observar el desarrollo de antibióticos debe centrarse en las características bioquímicas de las moléculas,

para que estas no generen resistencia frente a los patógenos más comunes, además de que no sean citotóxicas para las células humanas.

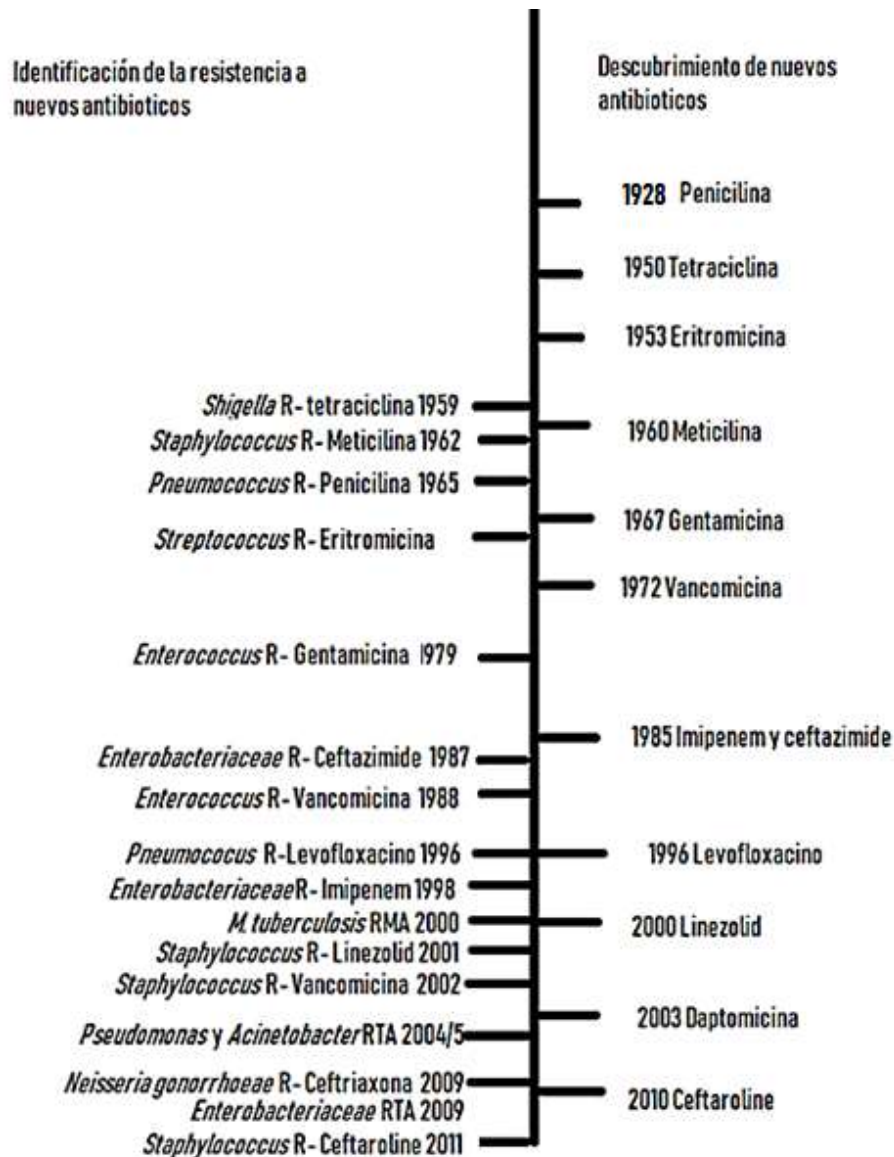


Figura 1. Relación entre el descubrimiento de antibióticos y el desarrollo de la resistencia a estos. R- resistente, RMA- Resistente a múltiples antibióticos, RTA- Resistente a todos los antibióticos. Modificado de Ventola, 2015.

1. PRODUCTOS NATURALES COMO FUENTE DE MOLÉCULAS BIOACTIVAS.

Con la aparición de la penicilina en 1928, surgió la época de oro en el descubrimiento de moléculas orgánicas bioactivas provenientes de bacterias, hongos y plantas principalmente. Tales moléculas, fueron empleadas primordialmente como antimicrobianas, antitumorales e hipocolesteromiantes. Esto propició un aumento en la esperanza de vida, debido a la disminución en el número de muertes ocasionadas por enfermedades infecciosas de todo tipo (Aminov, 2010).

Las fuentes más importantes de las cuales han sido aislados numerosos microorganismos productores de antibióticos son la tierra y el agua. Desafortunadamente, compuestos bioactivos novedosos son cada vez más difíciles de aislar a partir de estas fuentes, debido a la sobreexplotación de las mismas, lo que genera el redescubrimiento de moléculas ya conocidas (Lewis, 2013).

Con base en lo mencionado anteriormente, se requiere la búsqueda de nuevas especies de microorganismos en fuentes no convencionales con la expectativa de que produzcan metabolitos secundarios desconocidos.

1.1 MICROORGANISMOS ENDÓFITOS

Recientemente, se han descubierto una gran diversidad de microorganismos en ambientes marinos profundos o en el interior de árboles y plantas (Gouda *et al.*, 2016). Estos últimos, denominados endófitos, producen muchos tipos de moléculas bioactivas. La mayoría de estos microorganismos son hongos como *Cytonaema* sp. y bacterias como *Streptomyces*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium* por mencionar algunos, los cuales viven en los espacios intercelulares de los tejidos de las plantas y pueden encontrarse en las raíces, semillas y hojas, además de que se cree que son inocuos para la planta (Strobel, 2003) (Martínez-Klimova *et al.*, 2017).

Esta interacción positiva permite que los microorganismos se encuentren protegidos del medio ambiente y tengan fácil acceso a los nutrientes, a cambio de proporcionar beneficios al huésped como lo son la transformación de proteínas complejas en formas digeribles para el huésped, la síntesis de vitaminas o aminoácidos esenciales, además de llevar a cabo la adquisición de nitrógeno, fósforo y hierro, la degradación de xenobióticos y la protección contra patógenos (Ceapă *et al.*, 2018). Algunas de las moléculas que otorgan estos beneficios se encuentran citadas en la figura 2. Uno de los principales grupos de bacterias productoras de moléculas bioactivas y que también poseen la capacidad de ser endófitos son las Actinobacterias.

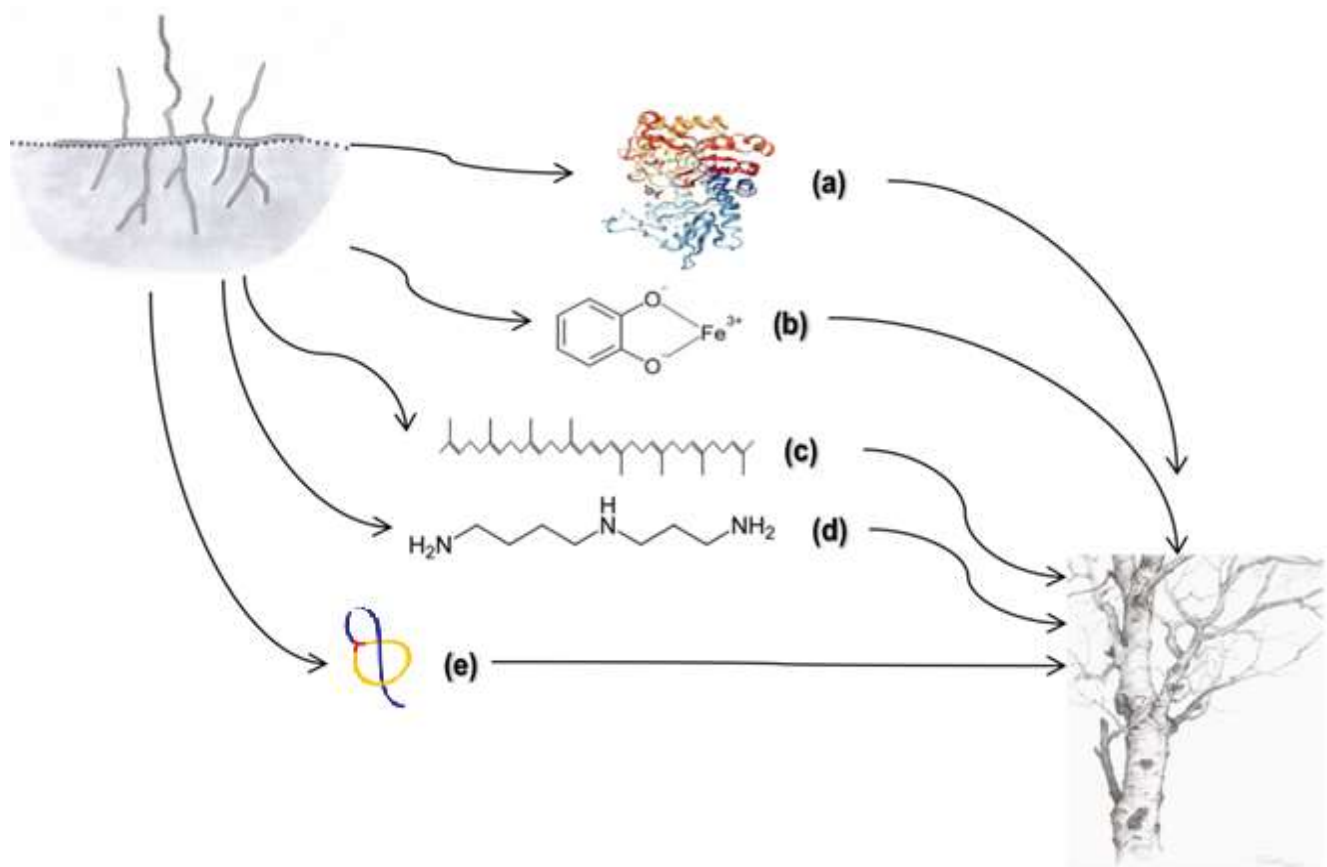


Figura 2. Interacción simbiótica bacteria planta (a) Quitinasa familia 18 (PDB 4Q22), (b) Sideróforo, (c) hormonas vegetales, (d) espermidina, (e) Bacteriocina (aquí un lasso péptido). Figura de Ceapă *et al.*, 2018.

1.1.1 ACTINOBACTERIAS

Se sabe que una de las fuentes más importantes para la producción de compuestos bioactivos son los sistemas microbianos y de entre ellos, las Actinobacterias representan el *phylum* más importante biotecnológicamente hablando. Estas bacterias son Gram-positivas en su mayoría filamentosas, con un alto contenido (69-73%) de guanina y citosina (G + C) en su DNA (Berdy, 2015). En la mayoría de los casos estas bacterias presentan hifas y el crecimiento de estas es ramificado (Figura 3); la mayor parte de las Actinobacterias son mesófilas presentando su temperatura óptima de crecimiento ente 25°C y 30°C y un pH óptimo de crecimiento que se encuentra alrededor de la neutralidad, pudiendo crecer en pH de 6 a 9 (Barka *et al.*, 2016).

Un error común es que estas se encuentran clasificadas como la transición entre bacterias y hongos, pero la clasificación taxonómica definitiva nos indica que son bacterias; además se encuentran en distintos hábitats, desde sedimentos marinos, suelo, agua y dentro de las plantas (Martínez-Klimova *et al.*, 2017).

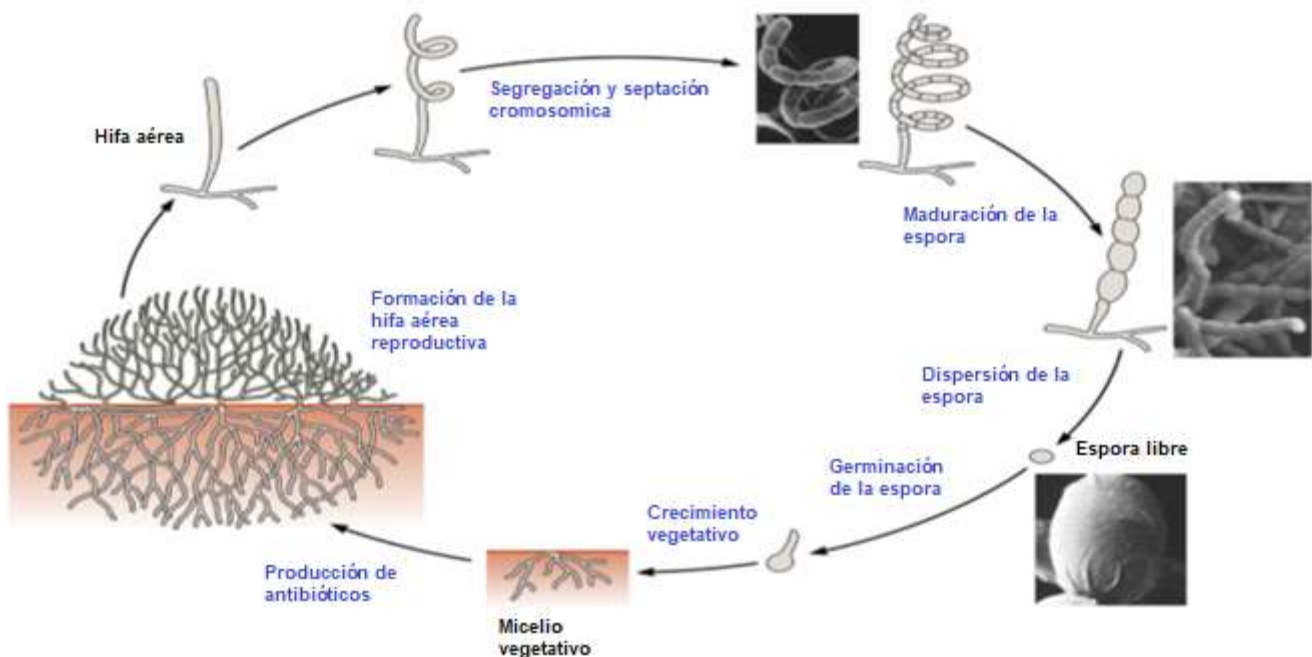


Figura 3. Representación del ciclo de vida de una Actinobacteria. (Figura de Barka *et al.*, 2016).

De la totalidad de antibióticos producidos por el *phylum* Actinobacteria, el género *Streptomyces* es el principal productor de antibióticos bacterianos (con aproximadamente el 80%), utilizados en la medicina humana (Watve *et al.*, 2001).

Se ha determinado que los estreptomicetos endófitos presentan interacciones benéficas con las plantas, por medio de la síntesis de moléculas que ayudan a esta cuando se encuentra bajo estrés abiótico, como la espermidina, la putrescina y la trehalosa (Ceapă *et al.*, En preparación). Algunos estreptomicetos endófitos, logran generar más de 50 metabolitos secundarios distintos derivados de más de 40 clústeres de genes biosintéticos (BCG) (Ceapă *et al.*, 2018), muchos de estos se encuentran crípticos en condiciones de laboratorio, lo que hace difícil obtener compuestos nuevos a partir de ellos, esto nos lleva a buscar estrategias distintas para la obtención de compuestos bioactivos novedosos, como lo son los productos naturales sintetizados ribosomalmente y postraduccionalmente modificados.

1.2 PRODUCTOS NATURALES SINTETIZADOS RIBOSOMALMENTE Y POSTRADUCCIONALMENTE MODIFICADOS.

En esta superfamilia se encuentran incluidos los siguientes miembros: lasso péptidos, lantipéptidos, microcinas, microviridinas, cianobactinas y tiopéptidos (Maksimov *et al.*, 2012). Los péptidos incluidos en esta clasificación se sintetizan inicialmente como un péptido precursor más largo, típicamente de entre 20 y 110 residuos de aminoácidos, codificados por un único gen estructural (Arnison *et al.*, 2014).

1.2.1 LASSO PÉPTIDOS

1.2.1.1 DEFINICIÓN, DESCUBRIMIENTO Y CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES.

Los lasso péptidos llevan este nombre debido a que su topología es similar a la de un lazo enroscado. Consisten en un anillo macro lactámico, compuesto de 7 a 9 residuos de aminoácidos y un péptido terminal (tallo) en la región C-terminal. El anillo se forma entre el

grupo α -amino N-terminal y una cadena lateral de aspartato o glutamato (Hegemann, *et al.*, 2015). Esta estructura es predominantemente estabilizada por interacciones estéricas, principalmente por aminoácidos voluminosos tales como tirosina, triptófano o arginina (Figura 4), o en ocasiones mediante la presencia de puentes disulfuro (Tabla 1) (Tietz, *et al.*, 2017).

Tabla 1. Clases de lasso péptidos identificadas actualmente, con información de Hegemann *et al.*, 2015; Maksimov *et al.*, 2012 y Tietz, *et al.*, 2017.

Clase	Descripción
I	Se estabiliza mediante 2 enlaces disulfuro.
II	No presenta enlaces disulfuro, estabilización por puentes de hidrogeno e interacciones de Van der Waals.
III	Presenta un puente disulfuro.
IV	Presenta un puente disulfuro, en el extremo C-terminal.

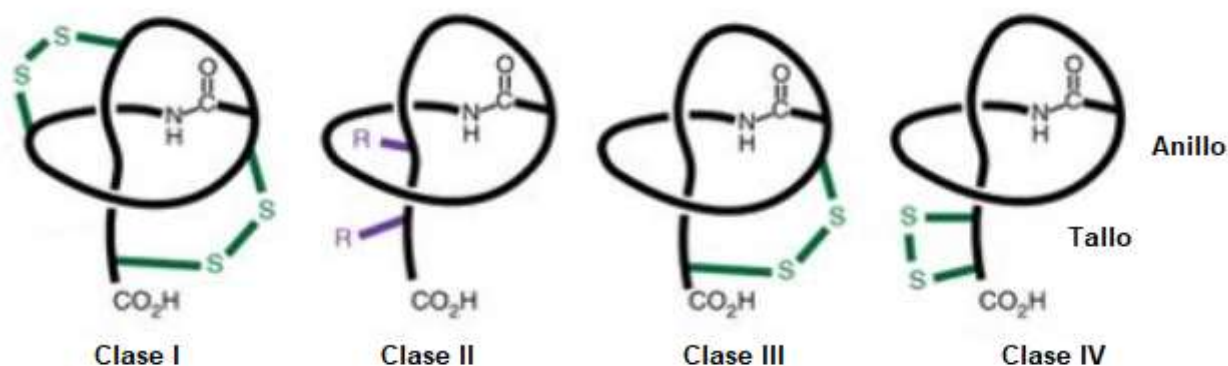


Figura 4. Lasso péptidos de distintas clases. (Figura de Tietz *et al.*, 2017).

El primer lasso péptido que se descubrió fue en 1991 y desde entonces se han caracterizado 38, de los cuales 35 son de clase II, 2 de clase I y 1 de clase III (Hegemann *et al.*, 2015). Además, se han identificado mediante la herramienta bioinformática RODEO (Rapid ORF

Description and Evaluation Online) el cual utiliza un algoritmo descrito en la figura 5, para el análisis de BGC pertenecientes a RIPPs,

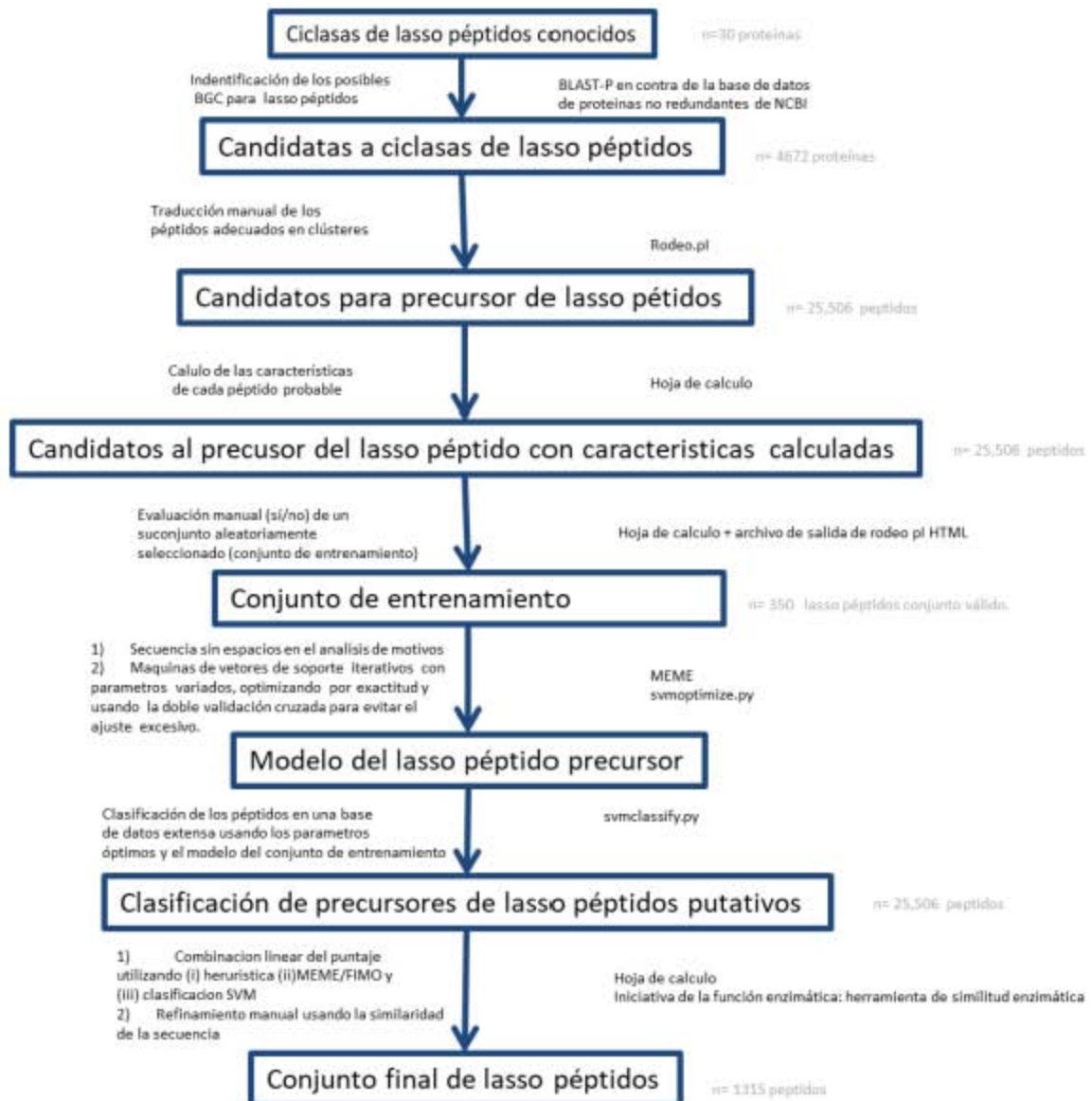


Figura 5. Algoritmo de RODEO para elegir los precursores de lasso péptido (Modificado de Tietz *et al.*, 2017).

A partir de ese algoritmo se obtuvo como resultado que más de 1400 clústeres biosintéticos codifican para enzimas homólogas necesarias para formación de un lasso péptido, las cuales provienen de diferentes géneros de microorganismos (Tabla 2) (Tietz *et al.*, 2017).

Tabla 2. Distribución taxonómica de los lasso péptidos en diferentes géneros de bacterias, obtenidos mediante el algoritmo de utilizado por RODEO (Modificado de Tietz *et al.*, 2017).

Genero	Cuenta	Porcentaje
<i>Streptomyces</i>	328	26.1
<i>Bacillus</i>	109	8.7
<i>Paenibacillus</i>	77	6.1
<i>Burkholderia</i>	65	5.2
<i>Mesorhizobium</i>	57	4.5
<i>Sphingobium</i>	38	3.0
<i>Sphingopyxis</i>	36	2.9
<i>Sphingomonas</i>	33	2.6
<i>Xanthomonas</i>	31	2.5
<i>Frankia</i>	26	2.1
<i>Streptococcus</i>	26	2.1
<i>Novosphingobium</i>	24	1.9
<i>Nocardiopsis</i>	21	1.7
<i>Stenotrophomonas</i>	17	1.4
<i>Clostridium</i>	17	1.4
<i>Brevundimonas</i>	13	1.0
<i>Enterococcus</i>	13	1.0
<i>Amycolatopsis</i>	12	1.0
<i>Caulobacter</i>	10	0.8
<i>Rhodanobacter</i>	10	0.8
<i>Butyrivibrio</i>	10	0.8

Estos genes se encuentran distribuidos a lo largo del dominio de las bacterias, específicamente de Proteobacterias y Actinobacterias, aunque también se han encontrado clústeres de genes biosintéticos presentes en otros *phyla* (Hegemann *et al.*, 2015).

Los lasso péptidos presentan fuerte estabilidad térmica de hasta 95°C por 4h (Zimmermann *et al.*, 2014) y bioquímica a la degradación frente a proteasas (Figura 6). Por ello, se ha investigado el potencial de los lasso péptidos para la introducción de epítopes específicos, lo que puede dar como resultado la creación de antagonistas de diversos receptores a través de mutaciones sitio dirigidas en ellos (Knappe *et al.*, 2011).

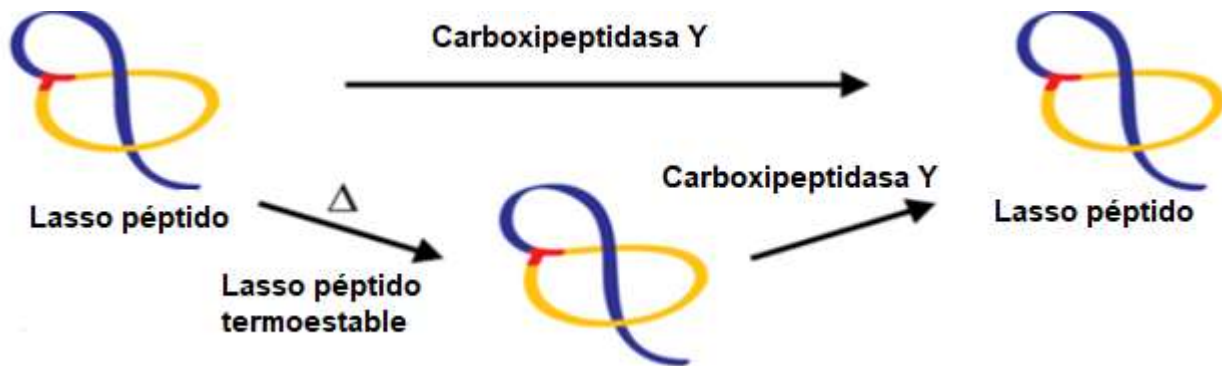


Figura 6. Estabilidad térmica y a degradación enzimática de lasso péptidos (Figura de Hegemann *et al.*, 2015).

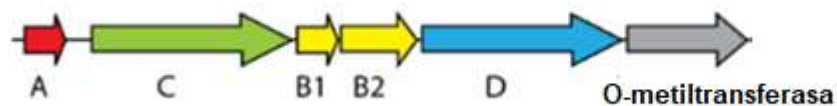
1.2.1.2 ARQUITECTURAS DE LOS CLÚSTERES IMPLICADO EN LA PRODUCCIÓN DE LASSO PÉPTIDOS.

Para que el clúster de un lasso péptido sea funcional requiere al menos 3 genes, los cuales codifican para un precursor peptídico A, una proteasa B y una ciclasa C; estas dos últimas son interdependientes entre sí, formando una sintetasa dependiente de ATP (Zimmermann *et al.*, 2014). La proteasa en ocasiones puede estar codificada genéticamente en dos proteínas pequeñas, aquella que se origina en el dominio N-terminal se denomina B1 y la que se produce en el dominio C-terminal se le denomina B2 (Zhu *et al.*, 2016) los cuales constituyen el core del clúster.

Además se le han identificado 3 arquitecturas distintas, las cuales constan de core + transportador (el cual le confiere autoinmunidad mediada por una bomba de eflujo), core + isopeptidasa (son parte de un grupo que contiene genes que codifican para un supuesto receptor dependiente de TonB y un par de factor σ / anti- σ implicados en la captación de sideróforos y la regulación de la transcripción de los genes correspondientes), core + genes que codifican para modificaciones postraduccionales (fosforilación, metilación, acetilación, sulfonación) (Figura 7). (Li *et al.*, 2015).



Organización del clúster para astexin-1, rhodanodin, rubrivinodin, sphingonodin I, sphingonodin II, sphingopyxin I, sphingopyxin II, syanodin I, xanthomonin III, zucinodin



Organización del clúster para lassomycin

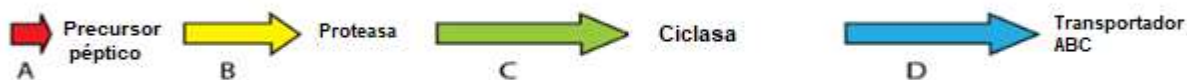


Figura 7. Organización estructural de los genes asociados a los clústeres funcionales conocidos para lasso péptidos (Figura de Hegemann *et al.*, 2015).

1.2.1.3 BIOACTIVIDAD

Se ha encontrado que los lasso péptidos pueden ser bioactivos, siendo la inhibición o el antagonismo de distintos receptores los más reportados (Hegemann *et al.*, 2015). Las principales actividades biológicas y microorganismos productores de los lasso péptidos conocidos se enlistan en la tabla 3.

Tabla 3. Ejemplos de los lasso péptidos producidos y a los cuales se les ha identificado actividad biológica. (Recopilación de Hegemann *et al.*, 2015; Maksimov *et al.*, 2012; Gavriš *et al.*, 2014, Li *et al.*, 2015).

Lasso péptido	Inhibidor/antagonista de	Bacterias sensibles (MIC μ M)	Microorganismo productor
Clase I			
Siamicina I/II/MS271/NP06	Replicación y fusión VIH, cinasa de cadena ligera de miosina	<i>Bacillus subtilis</i> (0.7-2.4) <i>Enterococcus faecium</i> (2.4) <i>Enterococcus faecalis</i> (5) <i>Micrococcus luteus</i> (0.7) <i>Staphylococcus aureus</i> (1.4-2.8)	<i>Streptomyces sp.</i>
RP 71955/aboricina	Proteinasa de aspartico de VIH	<i>Bacillus brevis</i> (11.5) <i>Bacillus subtilis</i> (9.2) <i>Staphylococcus aureus</i> (6.9) <i>Streptomyces viridochromogenes</i> (0.9) <i>Pseudomonas saccharophila</i> (6.9)	<i>Streptomyces sp.</i>
Clase II			
Anantina	Factor atrial natriuretico	-	<i>Streptomyces coeruleus</i>
Capistrulina	RNA polimerasa de gram negativos, canal secundario	<i>Burkholderia caledonica</i> (12) <i>Burkholderia caribensis</i> (150) <i>Burkholderia ubonensis</i> (150) <i>Burkholderia vietnamiensis</i> (100) <i>Escherichia coli</i> 363 (25) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (50)	<i>Burkholderia thailandensis</i>
Lariatina A/B	-	<i>Mycobacterium smegmatis</i> (2.8, 1.5) <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (0.2)	<i>Rhodococcus sp. K01-B0171</i>
Lassomicina	Chaperona de la familia hsp100 clpc1 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv 0.41-0.83 <i>Mycobacterium smegmatis</i> 0.41-1.06	<i>Rhodococcus sp. K01-B0171</i>
Microcina J25	RNA polimerasa de gram negativos, a nivel de absorción de NTP	<i>Escherichia coli</i> (0.05-1) <i>Shigella flexneri</i> <i>Salmonella enteritidis</i> (2.10-3) <i>Salmonella newport</i> (5.10-3) <i>Salmonella heidelberg</i> <i>Salmonella paratyphi</i> (4.10-3)	<i>E. coli</i> AY25
Propeptina	Prolilendopeptidasa	Poca actividad frente <i>Mycobacterium phlei</i> <i>Xanthomonas oryzae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Microbispora sp. SNA-115</i>
Tipo RES-701-3/ RES-701-3	Receptor endotelial tipo B	-	<i>Streptomyces sp. RE-701</i>
Sungsapina	A549 línea celular de cáncer de pulmón	-	<i>Streptomyces sp.</i>
Astexin -1	-	Poca actividad frente <i>Caulobacter crescentus</i>	<i>Asticcacaulis excentricus</i>
Clase III			
BI-32169	Receptor de glucagón	-	<i>Streptomyces sp.</i>

Entre los lasso péptidos más estudiados se encuentra la microcina J25 (MccJ25), que fue la primera en ser identificada y por ello la que está mejor caracterizada (Figura 8). Su mecanismo de acción antibiótica radica principalmente en la inhibición de la RNA polimerasa proveniente de Gram negativos, inhibiendo la transcripción de la unión de nucleósido trifosfato (NTP) por RNAP en el canal secundario (Mukhopadhyay *et al.*, 2004)

Además del mecanismo de acción descrito, existe un segundo que juega un papel importante en su actividad contra *Salmonella spp.* y *Escherichia coli* que sobreexpresan el transportador de ferrocromo en la membrana exterior (FhuA). En estos casos, MccJ25 parece interactuar con la membrana y por lo tanto la despolariza, disminuyendo el consumo de oxígeno. Aparentemente, esto es causado porque la MccJ25 activa la producción de superóxido. La estructura cristalina elucidada de MccJ25 demuestra cómo esta imita la unión de sideróforos en el receptor FhuA. Por lo tanto, es capaz de ingresar a las células por medio de este mecanismo, en el cual también participa el sistema de energía para la transducción de señales del receptor FhuA, que está implicado además en la generación de la fuerza protón motriz (Duquesne *et al.*, 2007).

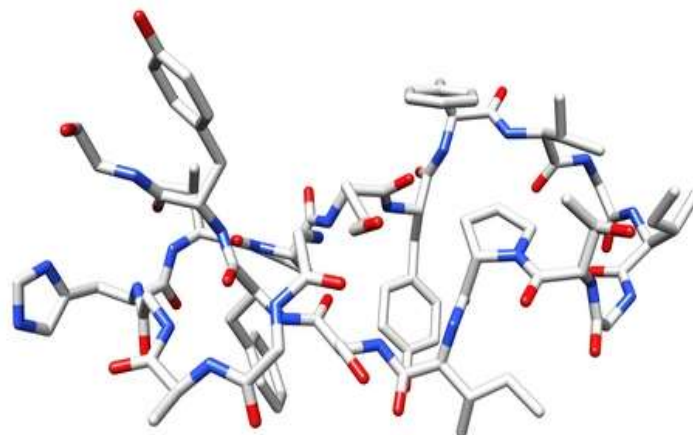


Figura 8. Estructura cristalizada de la microcina J25 (PDB 1PP5), a partir de expresión heteróloga en *E. coli*, obtenida por NMR.

1.2.1.4 MECANISMO DE FORMACIÓN DE LASSO PÉPTIDO.

Para tener una idea global del mecanismo de síntesis de éstos compuestos, es necesario comprender cuales son las proteínas necesarias para la formación de un lasso péptido, es decir, las que forman el core. El mecanismo de formación propuesto de los lasso péptidos, está dividido en varias etapas. Primero se procesa el precursor peptídico A por la proteasa B, que escinde el péptido líder. Posteriormente la proteína C que es una enzima formadora de adenilato cataliza la formación de enlace isopeptídico entre la glicina N-terminal del péptido central y la cadena lateral en un glutámico o aspártico (posición de 7 a 9 partiendo del N-terminal) con costo de un ATP (Figura 9) (Duquesne *et al.*, 2007; Hegemann *et al.*, 2015).

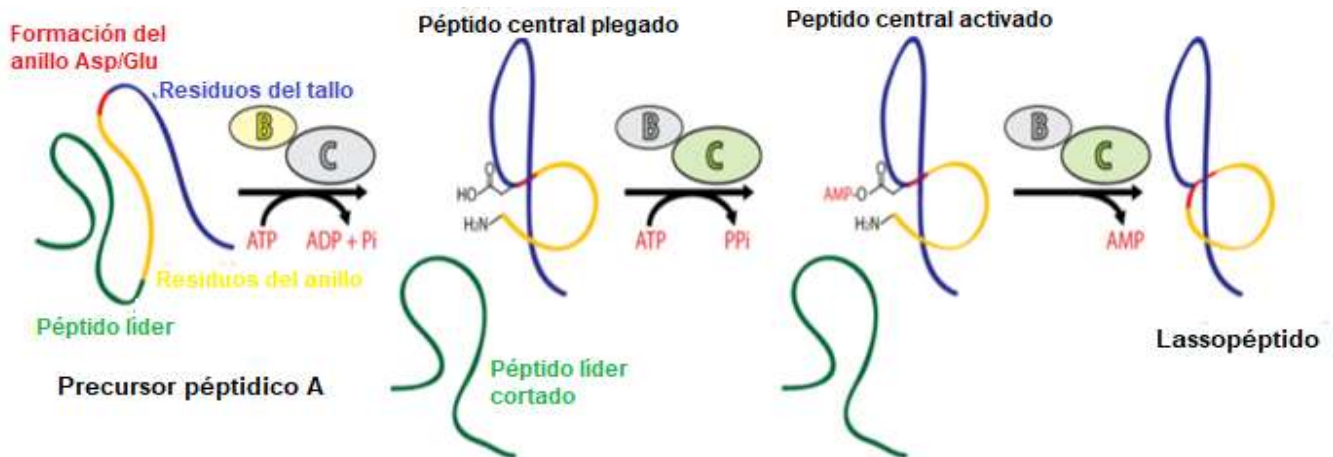


Figura 9. Mecanismo propuesto para la formación de un lasso péptido (Figura de Hegemann *et al.*, 2015.)

Otro punto importante a considerar son los sitios conservados para el procesamiento y formación del lasso péptido, donde define que la treonina (T) ubicada en -2, se encuentra asociada al sitio de corte de la proteasa B (Figura 10) (Hegemann *et al.*, 2015).



Figura 10. Motivos conservados presentes en el péptido líder de un lazo péptido. T -2, sitio de corte, (Figura de Hegemann *et al.*, 2015).

Para poder caracterizar las moléculas anteriormente descritas, las cuales presentan potencial actividad antimicrobiana, es necesario utilizar estrategias en las cuales se puedan identificar los compuestos críticos o que se producen en pequeñas concentraciones durante la fermentación bacteriana.

1.3 ESTRATEGIAS PARA EL DESCUBRIMIENTO DE NUEVAS MOLÉCULAS BIOACTIVAS

Hasta la fecha, la estrategia mayormente utilizada en el descubrimiento de nuevas moléculas, es el fraccionamiento de extractos provenientes de fermentaciones de bacterias productoras de metabolitos secundarios, lo cual puede llevar al redescubrimiento de lo que ya se encuentra reportado.

Cuando se lleva a cabo una fermentación con microorganismos productores, estos generan un compuesto mayoritario, opacando la producción de otros metabolitos que pudieran encontrarse en concentraciones menores, y por consiguiente el compuesto más abundante es el que se obtiene como producto en el fraccionamiento del extracto (Zerikly y Challis, 2009).

Una opción más reciente surge a partir de la secuenciación masiva de genomas microbianos, cuyo análisis permite descubrir a través de la minería genómica, el potencial biosintético de los microorganismos (Challis y Rutledge, 2015).

1.3.1 MINERÍA GENÓMICA

En los últimos 10 años, la minería genómica ha representado una alternativa útil en la búsqueda de moléculas bioactivas y novedosas en diferentes microorganismos (Fischbach y Medema, 2015). Esta técnica (Figura 11) consiste en el uso de la bioinformática, genética molecular y química analítica de compuestos naturales para acceder al producto metabólico del clúster de genes encontrados en el genoma de un organismo (Gómez-Escribano y Bibb, 2014).



Figura 11. Utilidad de la minería apoyada de las ciencias omicas en el descubrimiento de nuevas moléculas bioactivas (Modificado de Ziemert y Weber, 2016).

Mediante esta estrategia, se evidencian los clústeres de genes biosintéticos para metabolitos secundarios inéditos que además, suelen estar co-regulados y co-localizados, y en condiciones de laboratorio se encuentran crípticos o silenciosos. Es decir, ya que los precursores para su producción se encuentran dirigidos hacia la producción del metabolito secundario mayoritario en la fermentación, por lo que los promotores de la producción de los metabolitos crípticos no se encuentran activados (Gupta *et al.*, 2017).

1.3.1.2 HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS.

Las herramientas bioinformáticas, en combinación con la minería genómica, son una herramienta fundamental en el descubrimiento de nuevas moléculas bioactivas. Algunos ejemplos de estas herramientas incluyen el Patric (Wattam *et al.*, 2017), Bagel3 (Van Heel *et al.*, 2013), Prism (Skinnider *et al.*, 2015) y AntiSMASH (Weber *et al.*, 2015).

Estas plataformas han permitido localizar dentro de un genoma los clústeres de genes que codifican para la síntesis de metabolitos secundarios, además de que en algunos casos, logran predecir su estructura. De entre estos, hay los que codifican para metabolitos secundarios algunos derivados de la ruta de las policétido sintetasas (PKS), otros del sistema de proteínas no ribosomales (NRPS), además de algunos tipos de bacteriocinas y de entre ellos los péptidos ribosomales postraduccionalmente modificados (RiPPs) (Yang *et al.*, 2011). Por lo tanto, representan una nueva oportunidad para la investigación y para la creación de nuevos antibióticos mediante métodos sintético-biológicos.

AntiSMASH, (antibiotics and Secondary Metabolite Analysis Shell) es una plataforma capaz de identificar en una base de datos distintos locus biosintéticos de toda la gama de metabolitos secundarios conocidos (policétidos, péptidos no ribosomales, terpenos, aminoglucósidos, aminocoumarinas, indolocarbazoles, lantibioticos, bacteriocinas, nucleósidos, betalactámicos, butirrolactonas, sideróforos y otros). Alinea las regiones identificadas con los genes de homólogos más cercanos desde una base de datos que contiene todos los otros grupos de genes conocidos, e integra o enlaza todos los métodos de análisis de genes específicos de metabolitos secundarios (Medema *et al.*, 2011).

BAGEL3 (BActeriocin GEnome mining tool) es una plataforma que utiliza un enfoque de identificación que combina la minería directa para el gen y la minería indirecta a través de genes de contexto. Especialmente para péptidos muy modificados como lantipéptidos, sactipéptidos, glicocinas y otros (Van Heel *et al.*, 2013).

PRISM, (prediction informatics for secondary metabolomes) es una plataforma para identificar agrupaciones de genes biosintéticos, para la predicción de péptidos no ribosómicos

codificados genéticamente y policétidos de tipo I y II. Implementa nuevos algoritmos que lo hacen capaz de predecir policétidos de tipo II, azúcares desoxigenados y unidades de inicio, lo que lo convierte en un motor completo de predicción de la estructura química guiado por genoma (Skinnider *et al.*, 2015).

1.4 EXPRESIÓN HETEROLOGA DE CLÚSTERES BIOSINTÉTICOS.

Con ayuda de los programas bioinformáticos, se ha logrado la producción dirigida de moléculas específicas mediante la expresión heteróloga de los genes asociados a clústeres biosintéticos, evitando con ello los complejos controles transcripcionales que presentan. Además, se logra sobre expresar el BGC de interés siendo más fácil la identificación, producción, extracción, purificación y caracterización de metabolitos que en condiciones de laboratorio no se expresan (Nah *et al.*, 2017).

Entre las principales características de la expresión heteróloga de metabolitos podemos mencionar que, en el hospedero elegido se tendrán presentes todas las herramientas necesarias para la expresión y ensamble de la molécula, además de tener resistencia a la molécula de interés, ya que en la mayoría de las ocasiones la producción de estas se encuentra acoplada a un péptido líder que exporta la molécula al espacio periplásmico (Harvey *et al.*, 2018).

El género *Streptomyces* posee un gran número de clústeres de genes biosintéticos. A pesar de ello, la regulación de la producción de estos BGC no es completamente conocida, por lo que buscar las condiciones de cultivo para producir algún metabolito específico a partir del hospedero original, puede ser una tarea muy compleja. Por ello, se ha buscado hacer uso de hospederos heterólogos del mismo género o en sistemas conocidos como *E. coli*, del cual su regulación se encuentra bastante estudiada (Figura 12).

Los hospederos del género *Streptomyces*, han sido producidos mediante la eliminación de los BGC con una producción mayoritaria ya comprobada en dicha cepa. Algunos de los hospederos más utilizados son *Streptomyces coelicolor* M1152, a este hospedero le han sido deletados los genes que codifican para la síntesis de actinorodina (Δact), undecilprodigiosina

(Δred), de un antibiótico policetídeo (Δcpk) y otro dependiente de calcio (Δcda) (Gómez-Escribano y Bibb, 2014).

Se encuentra también el *Streptomyces avermitidis* SUKA17 (Ikeda *et al.*, 2014) al cual se le deletó también su clúster de mayor expresión y por último *Streptomyces lividans* TK24, el cual produce pocas cantidades de undecilprodigiosina y actinorodina, además de una baja producción de proteasas lo que lo hace un buen candidato para la expresión heteróloga de moléculas nuevas (Rückert *et al.*, 2015).

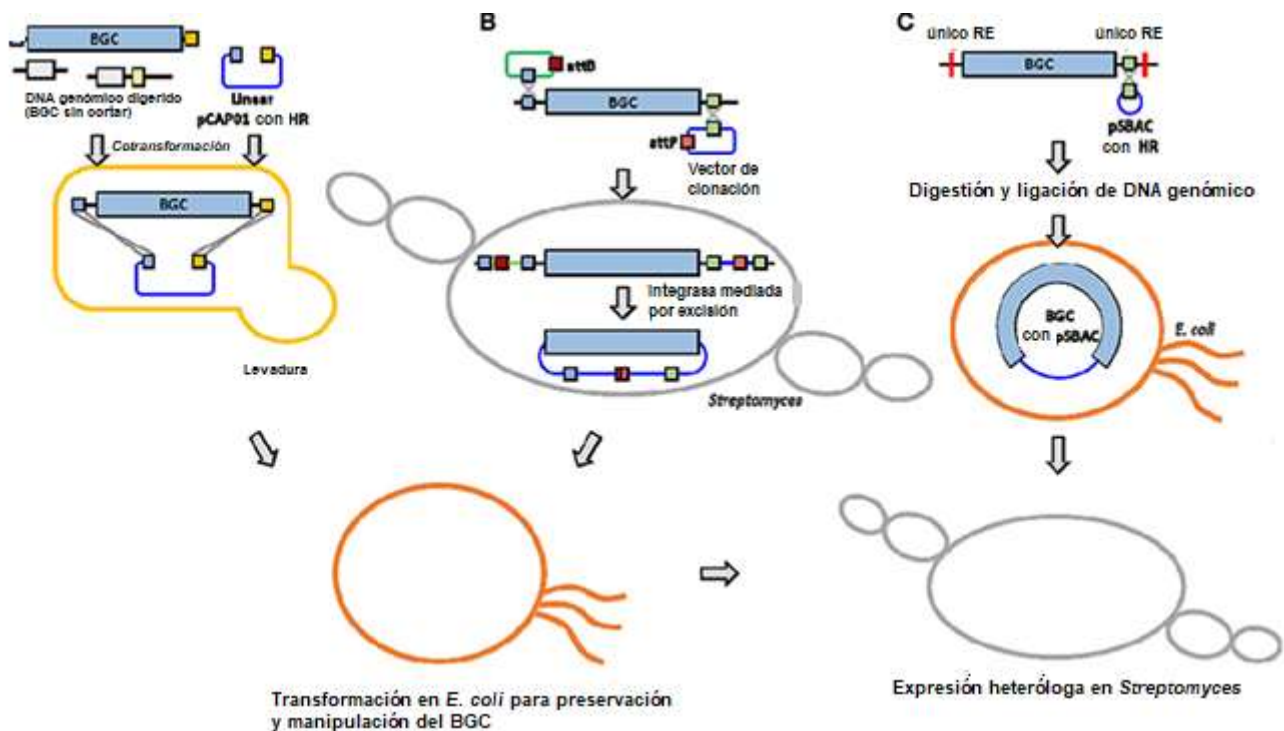


Figura 12. Expresión heteróloga de BGC en distintos hospederos heterólogos como *E. coli* o *Streptomyces*, para la expresión de clústeres biosintéticos de más de 10 kpb (Figura de Nah *et al.*, 2017).

Una opción para cuando los clústeres biosintéticos son grandes y sobrepasan los 10 kpb, es utilizar la recombinación mediada por integrasa, la construcción de bibliotecas genómicas, el

sistema de recombinación asociada a la transformación (TAR), y el sistema de cromosoma artificial bacteriano de *Streptomyces* (pSBAC) (Figura 12) (Nah *et al.*, 2017).

Los puntos clave para la correcta expresión del clúster de interés mediante expresión heteróloga (Figura 13), involucran la elección de un hospedero que tenga similitud genética con el productor nativo, que además presente herramientas genéticas que faciliten la producción del metabolito de interés, como lo son deficiencia de proteasas y poca producción de moléculas bioactivas por el hospedero heterólogo (Rückert *et al.*, 2015). Es de vital importancia la presencia de los precursores necesarios para la vía de síntesis del metabolito. Una vez que se corroboró lo anterior, se procede a la clonación de clúster biosintético de interés, mediante el ensamblado de los fragmentos de DNA o mediante PCR a partir del DNA genómico (Harvey *et al.*, 2018).

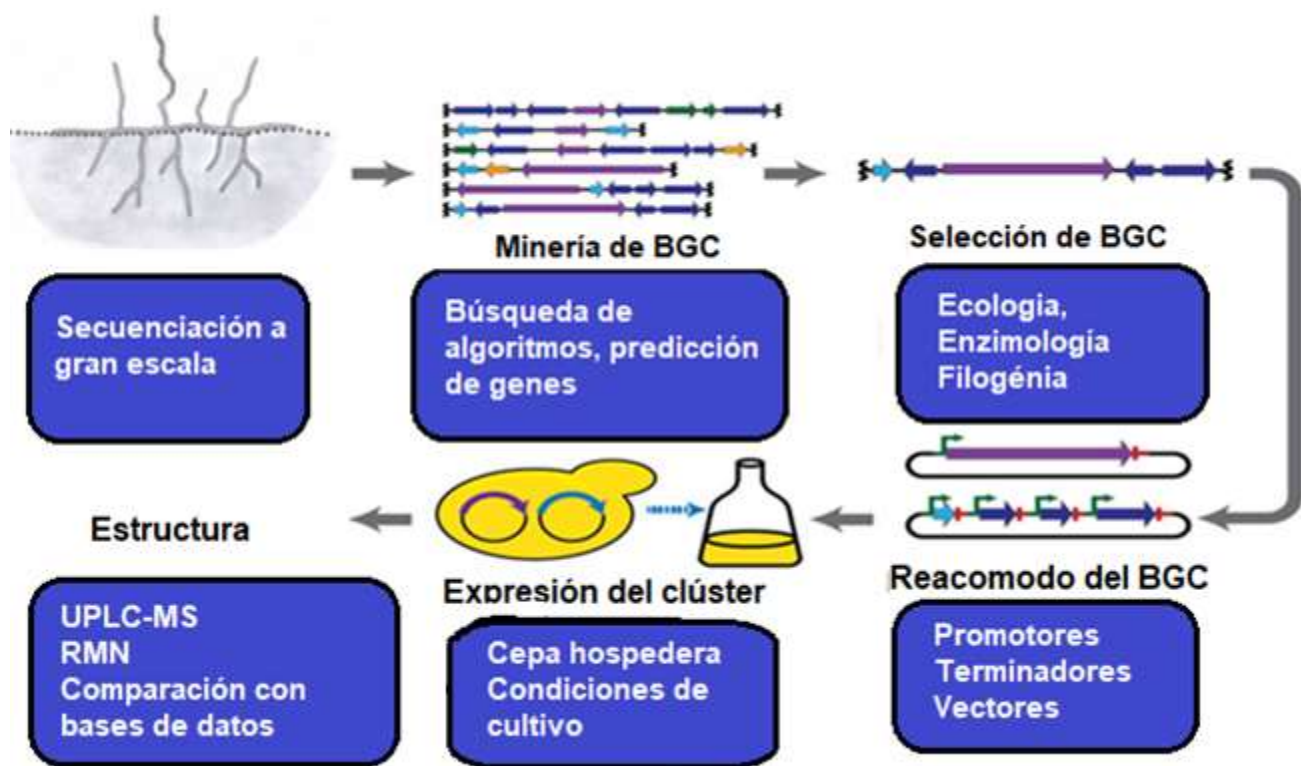


Figura 13. Puntos clave para llevar a cabo la expresión heteróloga (Modificado de Harvey *et al.*, 2018).

Si es necesario se puede hacer una combinación de distintos promotores o delección de genes de poca importancia en la expresión del BCG. Posteriormente, se realiza la transferencia del plásmido a un hospedero heterólogo por transformación, este plásmido puede ser de tipo autónomo o integrativo (Huang *et al.*, 2005). Como paso siguiente se lleva a cabo la expresión del clúster en las condiciones adecuadas para la producción, y por último la detección del metabolito por UPLC acoplado a masas o resonancia magnética nuclear (Zhang *et al.*, 2014).

De los metabolitos identificados, se eligió como modelo de estudio un RiPP en específico un lasso péptido. Esto debido a su facilidad de clonaje, a su pequeño tamaño, su variada actividad biológica y a la resistencia de estos compuestos frente a altas temperaturas y a distintas peptidasas (Hegemann *et al.*, 2015).

5 ANTECEDENTES

Recientemente se aisló en nuestro laboratorio una Actinobacteria endófitas del árbol *Amphipterygium adstringens*, mejor conocido como Cuachalalate, planta endémica de México. La recolección de las muestras del árbol se hizo en el poblado de Barranca Honda en Yauatepec, Morelos. Se aislaron diferentes cepas de hongos y bacterias.

Dentro de las bacterias aisladas se detectaron 4 Actinobacterias, de las cuales una fue identificada como *Streptomyces scabrisporus* cepa NF3 (Rodríguez-Peña *et al.*, 2018), llevándose a cabo la secuenciación, ensamble y anotación de su genoma (Vázquez-Hernández *et al.*, 2017). La anotación basada en RAST reveló la presencia de 10491 genes potenciales, entre los cuales 413 genes se asociaron a la biosíntesis de metabolitos secundarios. Haciendo uso de esta información, se identificaron 45 clústeres biosintéticos de los cuales 6 son T1PKS; 2 son T2PKS; 1 es T3PKS; 10 son híbridos KS/NRPS; 6 son Terpenos; 11 son NRPS; 3 son Sideróforos y 16 son bacteriocinas.

Otras cepas de esta especie microbiana han sido aisladas de suelos de países asiáticos. Se ha descubierto que producen distintos compuestos bioactivos, tales como el antibiótico hitachimicina (Ping *et al.*, 2004), y la alborixina, que presenta actividad antitumoral (Shah *et al.*, 2016). Por lo cual es de interés analizar el genoma de otras cepas de la especie y llevar a cabo la expresión heteróloga de algunos metabolitos secundarios no caracterizados.

6 JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, la resistencia bacteriana a los antibióticos de uso clínico representa un problema para el sistema de salud pública. Esta situación demanda la búsqueda de nuevas alternativas para el descubrimiento de nuevos compuestos con propiedades antimicrobianas.

La aplicación de la minería de genomas ha permitido la identificación y producción de nuevos compuestos bioactivos con potencial farmacológico. Los lasso péptidos son moléculas de bajo peso molecular que han mostrado actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas y negativas, bioactividad frente a virus y antagonismo de receptores tales como el de glucagón, además de gran estabilidad térmica y resistencia a la degradación enzimática, haciéndolos ideales para el proceso de producción industrial.

El genoma de *Streptomyces scabrisporus* NF3 posee clústeres que parecen codificar para la síntesis de un lasso péptido. La clonación y traducción de alguno de estos clústeres representa una oportunidad para encontrar un nuevo compuesto con actividad antimicrobiana.

7 HIPÓTESIS

La clonación y traducción de un clúster de *Streptomyces scabrisporus* NF3 que parece codificar para un lasso péptido resultará en el descubrimiento de un nuevo principio con actividad antimicrobiana.

8 OBJETIVO

➤ **Objetivo general:**

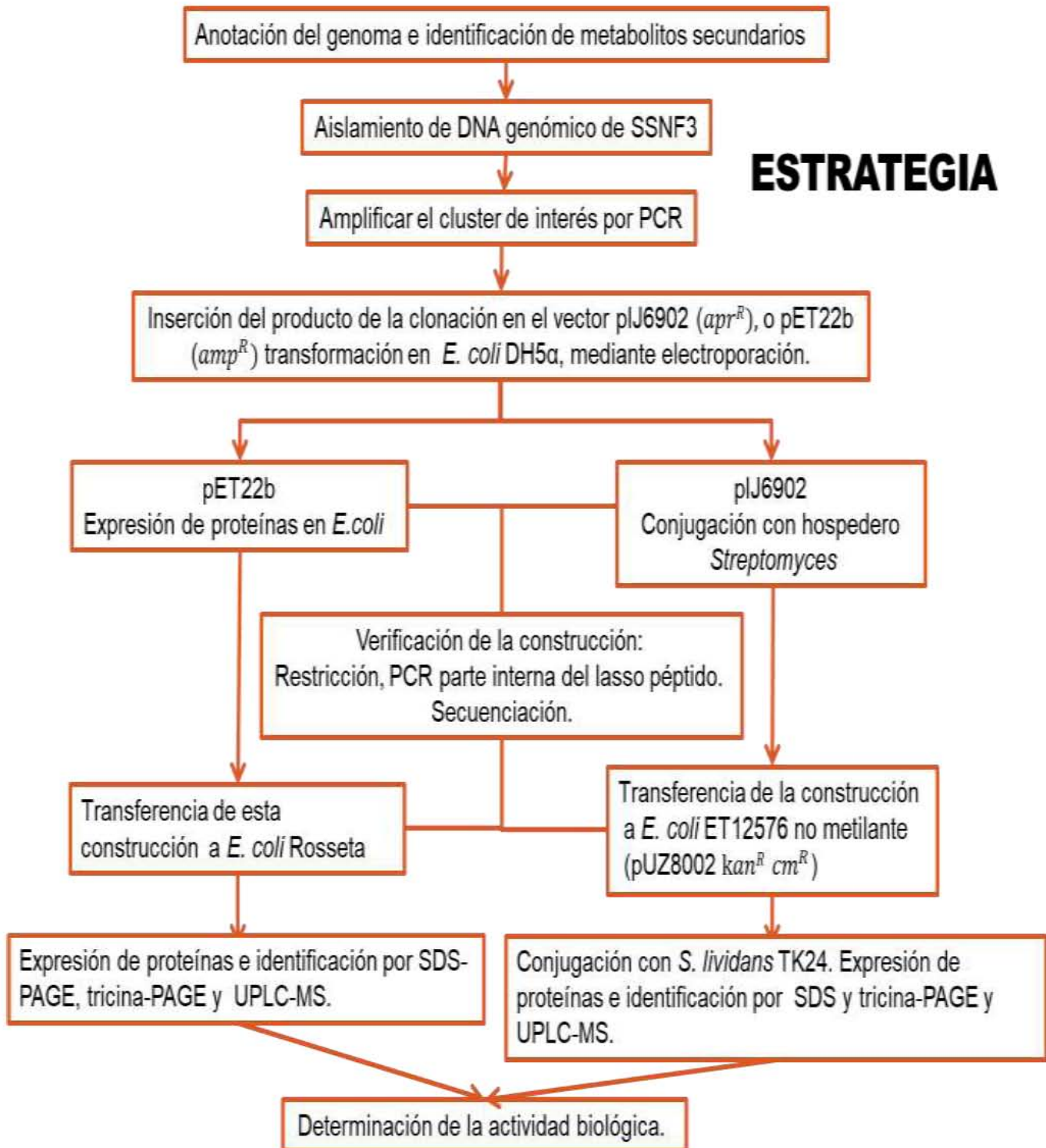
Identificar y caracterizar biológicamente un operón inédito, a partir de su clonación y posterior traducción, el cual está presente en el genoma de *Streptomyces scabrisporus* cepa NF3, implicado en la producción de un lasso péptido.

➤ **Objetivos particulares:**

- ✓ Analizar y definir los clústeres de genes que codifican para la producción de lasso péptidos.
- ✓ Producir el lasso péptido seleccionado de manera heteróloga.
- ✓ Caracterizar la actividad anitibacteriana del lasso péptido obtenido.

9 METODOLOGÍA

ESTRATEGIA



1) CEPAS UTILIZADAS

En la tabla 4 se describen las cepas utilizadas, sus condiciones y medio de cultivo óptimo para su crecimiento, la criopreservación se hizo en glicerol al 30% a -80°C, para reactivar la cepa se utilizó 1 mL de medio de cultivo óptimo para su crecimiento.

Tabla 4. Cepas utilizadas, medios de cultivo y condiciones de crecimiento.

Cepa	Medio de Cultivo	Condiciones de crecimiento
<i>Escherichia coli</i> DH5α	LB	1 día, 37°C
<i>Escherichia coli</i> ET12576	LB	1 día, 37°C
<i>Escherichia coli</i> Rosetta	LB	1 día, 37°C
<i>Listeria monocytogenes</i>	LB	1 día, 37°C
<i>Pseudomonas aureginosa</i> PAO1	LB	1 día, 37°C
<i>Pseudomonas flourescens</i>	LB	1 día, 37°C
<i>Staphylococcus aureus</i>	LB	1 día, 37°C
<i>Bacillus subtilis</i>	LB	1 día, 37°C
<i>Micrococcus luteus</i>	LB	2 días, 29°C
<i>Streptomyces lividans</i> TK24	MYM	2 días, 29°C
<i>Streptomyces scabrissporus</i> NF3	MYM	3 días, 29°C
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	LB	2 días, 29°C

2) ENSAYOS DE ANTIBIOSIS CON LA CEPA SSNF3

Se realizó un ensayo de antibiosis de la cepa SSNF3 para corroborar que esta presenta actividad antimicrobiana frente a diversos microorganismos, haciendo un ensayo cualitativo.

Se reactivó la cepa en medio liquido YMG con 200 µL de cultivo reactivado, posteriormente se inoculó 50 µL en medio YMG en un extremo de la caja y se incubó 5 días hasta esporulación.

La actividad antimicrobiana se probó contra: *Escherichia coli* DH5α, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* y *Saccharomyces cerevisiae*.

Los microorganismos utilizados se inocularon en sus respectivos medios de cultivo y a la temperatura de crecimiento óptima (Tabla 4), después de los cinco días de la inoculación de SSNF3, se inocularon los microorganismos de prueba perpendicularmente al estreptomiceto (Figura 14).

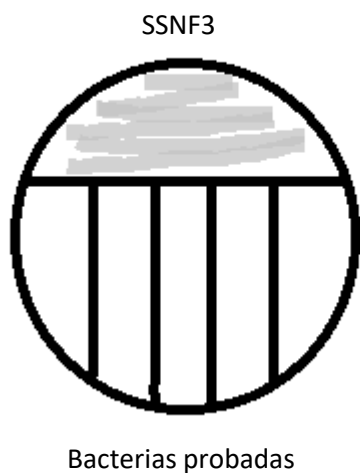


Figura 14. Modelo de ensayo de antibiosis.

Se procedió a incubar el tiempo y a la temperatura optima necesaria para el crecimiento de cada bacteria indicada en la tabla 4, para ver si existe una inhibición de las bacterias probadas frente a SSNF3.

3) BÚSQUEDA DE CLÚSTERES BIOSINTÉTICOS Y ANÁLISIS DE LOS MISMOS.

La caracterización de los operones presentes en el genoma de SSNF3, se realizó con ayuda de herramientas bioinformáticas como PRISM (Skinnider *et al.*, 2015), Bagel3 (Van Heel *et al.*, 2013) y AntiSMASH 4.0 (Weber *et al.*, 2015). Estas plataformas permitieron localizar en el genoma los clústeres de genes que codifican para la síntesis de metabolitos secundarios. Para plataforma de AntiSMASH es necesario introducir la secuencia de nucleótidos en formato Genbank y como parámetros adicionales se selecciona BLAST frente a clústeres de metabolitos secundarios conocidos, análisis del clúster por familias de proteínas y el buscador de sitio activo. PRISM requiere de igual forma como archivo de entrada la secuencia de nucleótidos en formato FASTA, se corre en la interfaz web bajo los parámetros predeterminados, para la última plataforma utilizada Bagel3 se requiere el mismo archivo de

entrada que en la anterior y bajo el mismo formato de secuencia. AntiSMASH y PRISM nos predice la estructura de algunos metabolitos y asimismo generó resultados con un enfoque hacia la caracterización de metabolitos de tipo NRPS y PKS. En cambio el análisis con Bagel3 definió BGCs que codifican para bacteriocinas, desde péptidoglicano hidrolasas hasta lasso péptidos. De este modo se caracterizaron los operones en cuanto a su tipo y función.

Una vez que se analizaron, se eligió el clúster debido a su facilidad de clonación, a su homología reducida frente a lo ya reportado, a su variada actividad biológica y a la probabilidad de que la expresión heteróloga sea exitosa debido a su tamaño. Mediante este proceso se seleccionaron algunos de los clústeres de genes de interés, los cuales cumplieron con dichas características. Para fines prácticos solo se describirá un grupo específico de metabolitos, el cual ya se describió en la introducción.

Se llevó a cabo un análisis de los dominios de cada una de las proteínas presentes en los tres clústeres identificados como pertenecientes a este grupo, con la plataforma Pfam (Finn *et al.*, 2016), para poder definir qué tipos de dominios de proteínas se encuentran codificadas y la función específica que estas realizan, comprobando así que la anotación generada por las plataformas bioinformáticas coincide con ello, esto se realiza mediante el alineamiento de secuencias con proteínas homologas ya caracterizadas y anotadas presentes en la base de datos de Pfam.

Para definir las características de las proteínas asociadas al clúster que se decidió expresar, se utilizó la herramienta de ExPASy ProtParam (Artimo *et al.*, 2012), el cual nos proporciona el peso molecular de cada una de las proteínas asociadas al clúster.

Se modelaron las proteínas LunB, LunC y LunE, pertenecientes al clúster biosintético que procesan el lasso péptido 1, mediante modelado por homología, con el programa bioinformático Phyre2, (**P**rotein **H**omology/**a**nalog**Y** **R**ecognition **E**ngine V 2.0) (Kelley *et al.*, 2015), en donde se introduce la secuencia de aminoácidos en formato FASTA y como modo de modelado en tipo normal.

4) EXPRESIÓN DE HETERÓLOGA DEL CLÚSTER DE INTERÉS.

Se llevó a cabo la traducción de 4 genes que se encuentran presentes en el clúster biosintético de uno de los lasso péptidos identificados, el cual presenta la arquitectura más completa.

4.1 AMPLIFICACIÓN DEL BGC Y CLONACIÓN EN *ESCHERICHIA COLI* DH5A CON EL PLÁSMIDO pET22B Y pIJ6902.

4.1.1 PLÁSMIDOS Y CEPAS UTILIZADAS.

Para la clonación de este clúster se utilizó el sistema pET (pET system, Novagen) y el plásmido pIJ6902; se llevó a cabo la clonación de ambas construcciones en la cepa de *E. coli* DH5 α .

Se utilizó el plásmido pET22b (+), el cual tiene un tamaño de 5493pb; presenta un poderoso sistema para la clonación y traducción de proteínas en *E. coli*, esto debido a que tiene la RNA polimerasa T7, la cual está bajo el promotor del bacteriófago T7 que se puede inducir por IPTG y la selección se llevó a cabo mediante la resistencia a ampicilina. Además de que puede activar casi todos los recursos de la célula para la traducción del gen diana; por lo tanto, el producto deseado puede comprender más del 50% de la proteína celular total unas pocas horas después de la inducción (Novagen).

El plásmido pIJ6902 es un vector integrativo de expresión, utilizado para conjugar con el género *Streptomyces*, el cual tiene un tamaño de 7406pb. Este posee el gen de resistencia a apramicina, que se utiliza para la detección de transformantes tanto en *E. coli* como en *Streptomyces* y se encuentra regulado por el promotor TipA que es inducible por tiostreptón (Huang *et al.*, 2005).

La cepa de *E. coli* DH5 α fue utilizada como huésped de no expresión, ya que fue desarrollada con múltiples mutaciones que le permiten transformaciones de alta eficiencia. Dichas mutaciones son *lacZ* Δ M15 que da como resultado el cribado azul-blanco para identificar las células recombinantes, *endA1* que genera una menor degradación por las endonucleasas, lo

que garantiza tasas de transferencia de plásmidos más elevadas y *recA1* que reduce la recombinación homóloga para una inserción más estable (Kawashima *et al.*, 1984).

Además de que esta no contiene el gen de la RNA polimerasa T7, eliminando así la inestabilidad del plásmido debido a la producción de proteínas potencialmente tóxicas para la célula huésped. Otro beneficio importante de este sistema es su capacidad para mantener los genes diana transcripcionalmente silenciosos en el estado no inducido (Durfee *et al.*, 2008).

Para la expresión de la construcción con el vector pET22b(+) fue utilizada la cepa Rosetta de *E. coli*, que es el huésped más ampliamente utilizado para la expresión génica. Este contiene una copia cromosómica del gen de la RNA polimerasa de T7 bajo control promotor *lacUV5* y la expresión se induce mediante la adición de IPTG (Studier y Moffatt, 1986).

Además, es una cepa derivada de *E. coli* BL21, la cual es deficiente en la proteasa *lon* y *ompT* de la membrana externa, estas podrían degradar las proteínas durante la purificación (Grodberg y Dunn, 1988). Adicionalmente presenta un contenido de codones raramente usado en *E. coli*, puesto que esta es suplementado con tRNAs para los codones AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA. Por lo tanto, las cepas de Rosetta proporcionan una traducción "universal" que, de lo contrario, estaría limitada por el uso de codones de *E. coli*. Estos genes tRNA son impulsados por sus promotores nativos (Merk®).

Para el vector pIJ6902, se requiere una transformación intermedia en la cepa de *E. coli* ET12576, que contiene el vector pUZ8002 Kan^R Cm^R. Este intermediario evitará que nuestra construcción se metile, además de que posee la capacidad de realizar conjugación con el género *Streptomyces*, específicamente con la cepa de *Streptomyces lividans* TK24 (Rückert *et al.*, 2015).

Streptomyces lividans TK24 es una cepa derivada de *S. lividans* 66 libre de plásmidos, que produce pequeñas cantidades de antibióticos policétidos como actinorodina y undecilprodigiosina durante la fase estacionaria de su curva de crecimiento. Además, muestra resistencia a muchos antibacterianos debido a varios sistemas de eflujo. *S. lividans* posee una baja actividad proteolítica, lo que la ha convertido en un huésped popular para la clonación y para la expresión heteróloga de diversos antibióticos y otros metabolitos secundarios (Rückert *et al.*, 2015).

4.1.2 EXTRACCIÓN DE DNA CROMOSOMAL DE STREPTOMYCES SCABRISPORUS NF3

Se llevó a cabo la extracción de DNA conforme a lo descrito en el anexo 2.

4.1.3 DISEÑO DE CEBADORES

Se diseñaron tres cebadores que flanquean a los 4 genes biosintéticos, un cebador forward para cada uno de los vectores y se comparte el cebador reverse (Figura 15). Se le insertaron las secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción enlistadas en la tabla 5 las cuales se encuentran en letras itálicas y en minúsculas se encuentran adaptadores para que la polimerasa reconozca el cebador. Los cebadores mencionados fueron sintetizados en la unidad de síntesis y secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología, UNAM. Se realizaron diluciones de cada cebador hasta una concentración de 10 µM.

Tabla 5. Cebadores utilizados en la amplificación del lasso péptido I de interés por PCR.

Nombre	Secuencia	Tm	Enzima de restricción	Tamaño esperado
pIJ6902				
SSNF3_	5'-aca GGATCC ATGGACGAGTACACGCAGCACA-	64°C	<i>Bam</i> H1	4045pb
Lass1_F	3'			
pET22b				
SSNF3_	5'-ctctc GAATTC GTGATCGTGGCCGGGTTGC-3'	64°C	<i>Eco</i> R1	4045pb
Lass1_R				
pET22b				
SSNF3_	5'-aacctt CATATG GACGAGTACACGCAGCACA-3'	64°C	<i>Nde</i> 1	4042pb
Lass1R				

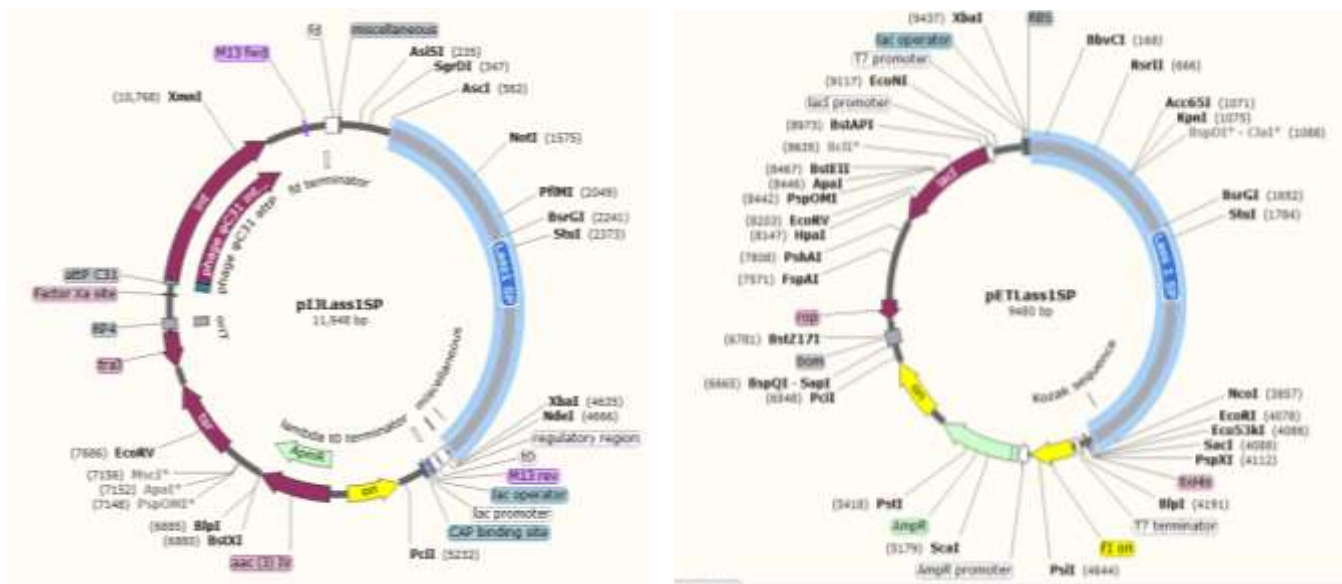


Figura 15. Estrategia de clonación del clúster de interés en pIJ6902 y pET22b.

4.1.4 AMPLIFICACIÓN DEL CLÚSTER DE INTERÉS

La amplificación de los 4 genes involucrados en la formación del lasso péptido I, se llevaron a cabo 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 utilizaron 200 ng del DNA extraído de la cepa SSNF3, con una concentración final de 0.3 μ M para cada cebador utilizado dentro de la reacción, una concentración de 5% de DMSO, 1 U de enzima y 1x del buffer II de reacción para dicha enzima. Se adiciono la cantidad de agua que baste para 50 μ L. Condiciones de la reacción de PCR anexo 2.

Los productos de PCR se confirmaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v), utilizando como buffer de corrida buffer TAE 1X; para el revelado de las bandas en el gel se utilizó el agente intercalante bromuro de etidio 0.01%. Se cargaron 50 μ L de la reacción PCR mezcladas con buffer de carga 6x (DNA Loading Dye ThermoScientific). Por último se utilizó

como marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (ThermoScientific). La electroforesis se corrió a 90V durante 60 min, revelándose en el transiluminador UV.

4.1.5 PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR.

La banda deseada del clúster de interés se purificó a partir del gel de agarosa utilizando el Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean- Up System (Promega). Se siguieron las especificaciones del proveedor y se agregaron 30 µL de agua tipo 1 precalentada a 50°C.

4.1.6 AISLAMIENTO DE LOS VECTORES PIJ6902 Y PET22B

Ambos plásmidos se aislaron mediante el protocolo Miniprep por lisis alcalina descrito en el anexo 7.

4.1.7 DIGESTIÓN Y LIGACIÓN.

El clúster amplificado y purificado, al igual que el vector de elección, se digirieron con *BamH1*, *EcoR1* y *Nde1* (Thermoscientific), según correspondían a cada cebador utilizado en cada construcción (Tabla 5). En la tabla 6 se muestra el protocolo utilizado para ello.

Tabla 6. Condiciones para digestión con enzimas de restricción.

Reactivo	Inserto	Vector
Buffer <i>EcoR1</i>	1X	1X
DNA	2 µg	150 ng
<i>EcoR1/Nde1/BamH1</i>	1U	1U
H ₂ O tipo 1	cbp 20 µL	cbp 20 µL

Se realizó la digestión en el buffer de *EcoR1*, con ambas enzimas de restricción durante 1h a 37°C. Se comprobaron las bandas por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Una vez rectificadas, se purificó de banda con el Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

Antes de la ligación el vector fue desfosforilado con 1 µL de la enzima CIP (New England Biolabs). La concentración de DNA del inserto y el plásmido se midieron en el Nanodrop a una longitud de onda de 260/280 nm.

Para la ligación del clúster de interés al plásmido, se utilizó la enzima T4 DNA ligasa (New England Biolabs) se utilizó una relación molar 3:1 y 5:1 de inserto frente a vector, las concentraciones que se utilizaron para la ligación se describen en la tabla 7.

Tabla 7. Condiciones de la reacción de ligación.

Reactivo	Inserto
Vector	50 ng
Inserto	100 ng
Buffer T4 DNA ligase 10X	2 µL
T4 DNA ligase	1 U
H₂O tipo 1	cbp 10 µL

La reacción se llevó a cabo toda la noche a 4°C. Una vez obtenida la ligación de pETLass1, y pJLass1 se transformó en *E. coli* DH5α.

4.1.8 CÉLULAS COMPETENTES Y TRANSFORMACIÓN.

El protocolo para la preparación de células electrocompetentes esta descrito en el anexo S5 y fue aplicado para las células de *E. coli* DH5 α , ET12576 y Rosetta.

El procedimiento siguiente se realizó en hielo. Se llevó a cabo la transformación se tomaron 2.5 μ L de cada ligación (5:1 y 3:1) y su control (vector fosforilado + T4 ligasa), la cual se adicione a 50 μ L de células electrocompetentes de *E. coli*. Dentro de las celdas de electroporación frías se adicione la mezcla de células competentes y la ligación. Se llevó a cabo la electrotransformación en el equipo PEP™ Personal Electroporation Pak ECM399 a 1250 V por 5 ms. Inmediatamente se le agrego 950 μ L de medio YENB tibio, se vertió en tubos Eppendorft de 1.5 mL y se incubo a 37°C por 1 h a 150 rpm.

Posteriormente se inocularon en cajas de LB con el antibiótico de selección (Apramicina o ampicilina) y se dejaron crecer O/N a 37°C. De las colonias positivas a la transformación, se seleccionaron algunas al azar y se inocularon en tubos de vidrio de 15 mL con 5 mL de LB con el antibiótico de selección, las cuales se incubaron a 37°C O/N a 150 rpm.

De las colonias en la cuales hubo crecimiento, se aislaron los plásmidos con el protocolo descrito en anexo S7, se realizó la verificación mediante ensayos de restricción con enzimas específicas con sitios presentes en la construcción (Tabla 5) como EcoR1 y *Nde*1, que cortarán a los extremos del inserto en pET22b y *Bsp*H1 que cortará el vector pIJ6902 en fragmentos de 3000, 2200, 1500 y 900 pb, además se llevó a cabo la verificación mediante PCR de colonia, con cebadores internos del clúster de interés (secuencias anexo S10).

Las muestras bacterianas positivas se guardaron en glicerol 30% (v/v) a -70°C. Los plásmidos aislados se guardaron en agua tipo1 a 4°C.

La primera transformación fue en *E. coli* DH5 α y el producto de estas transformaciones se aisló como ya se describió. Se introdujo mediante electrotransformación en *E. coli* ET12576 para posterior conjugación con *S. lividans* TK24 y de igual manera en *E. coli* Rosetta para la traducción de proteínas.

4.1.9 SECUENCIACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS DERIVADOS DE AMBAS CONSTRUCCIONES.

Una vez aislados los plásmidos provenientes de las construcciones para ambas cepas, se enviaron a secuenciar en el equipo Applied Biosystems modelo 310, por secuenciación de Sanger, en el Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud, UNAM, con los cebadores internos enlistados en el anexo S10, en la tabla S4 y los cebadores de los extremos enlistados en la tabla 5.

4.1.10 CONJUGACIÓN DE *E. COLI* ET12576 CON *STREPTOMYCES LIVIDANS* TK24.

La conjugación se llevó a cabo con células de *Streptomyces* tratadas con un choque térmico (10^8 UFC/mL), siguiendo el protocolo mencionado en el anexo S6. Las colonias positivas a la transformación fueron verificadas por PCR, una vez obtenidas las colonias, estas se propagaran y se cosecharan con solución salina isotónica, en un proceso que permitirá limpiar las esporas del micelio vegetativo.

4.2 TRADUCCIÓN DE LAS PROTEÍNAS EN *E. COLI* ROSETTA (DE3) Y *S. LIVIDANS* TK24.

4.2.1 TRADUCCIÓN DE PROTEÍNAS EN AMBAS CEPAS.

Ya que se verificó la construcción en *E. coli* Rosetta, se utilizó un pre-inoculo de 200 μ L de la cepa transformada con la construcción en 5 mL de medio LB, con ampicilina (100 μ g/mL) y cloranfenicol (25 μ g/mL), el cual se creció O/N a 37°C a 150 rpm. A partir del pre-inoculo se

tomaron los microlitros necesarios para que un matraz con 100 mL de medio M9 (anexo S1) con antibióticos, tuviera una OD_{600nm} de 0.02, tanto para la bacteria transformada con el vector vacío como con la construcción.

Se dejó crecer durante 4 h hasta llegar a una OD de 0.45 a 37°C, posteriormente se transfirió a una incubadora de 20°C durante 1 h y se realizó la inducción con 1 mM de IPTG, se mantuvo en agitación constante 200 rpm durante 3 días a 20°C. Posteriormente se centrifugo a 6000 rpm, se desechó el sobrenadante y el pellet se guardó a -20°C.

Para la inducción en *S. lividans* TK24, se inocularon 10^8 esporas de la cepa transformada con la construcción en 150 mL de medio 2YT, incubado a 30°C con agitación orbital (350 rpm) durante toda la noche, se cosecharon por centrifugación a 2,000 x g, se resuspendió en 50 mL de medio MYM con apramicina con una OD_{600nm} inicial de 0.01 y se incubaron a 30°C con agitación orbital (250 rpm) durante 7 días adicionales, se espera que llegue a la fase estacionaria después de un día de incubación y en ese momento se adiciona el inductor tioestrepton 50 µg/mL.

4.2.2 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE LAS CEPAS PRODUCTORAS.

Se almacenaron las muestras de las proteínas expresadas a -20°C. Dichas muestras fueron sonicadas utilizando el equipo Vibra-cell de SONICS. El protocolo de sonicación se describe en el anexo S8. Esta técnica fue utilizada para romper la membrana mediante fuerza mecánica y separar el contenido citoplásmico soluble, de las membranas celulares insolubles. Las dos fracciones obtenidas se resuspendieron en 500 µL de Metanol para la precipitación de péptidos (Zimmermann *et al.*, 2014) o en Buffer TES (Tris-EDTA-SDS) para la estabilización de proteínas de alto peso molecular (Palmer & Wingfield 2012).

4.2.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LAS PROTEÍNAS.

Para la determinación de la concentración de proteína se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976), con el kit comercial de BioRad, utilizando albumina sérica bovina como

estándar, en un rango de 0.1 a 0.8 mg/mL. La cuantificación se llevó a cabo en una placa de 96 pozos, donde se colocaron 10 μ L de estándar y 200 μ L de reactivo de Bradford. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595nm en el equipo Multiscan FC (ThermoScientific).

4.2.4 SDS-PAGE

Se llevó a cabo un SDS-PAGE (Laemmli, 1970) para determinar cualitativamente la concentración de cada una de las 3 proteínas pertenecientes al clúster de interés, además de corroborar los pesos moleculares de cada una de ellas.

El experimento se llevó a cabo con geles de poliacrilamida al 12 % (Anexo S10), con vidrios de grosor 1.0mm, en los cuales se cargaron 20 μ L de los cuales 15 μ L pertenecían a la muestra extraída en buffer TES y 5 μ L de buffer de carga 4x, dichas muestras se hirvieron por 5 min. Los geles de poliacrilamida se corrieron 40 mA por 2 h, con equipo Mini-Protean (BioRad).

Como control negativo se utilizó el vector vacío bajo las mismas condiciones de inducción y extracción. El marcador de peso molecular utilizado fue PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) de 10 a 180 kDa, el cual se utilizó como referencia para los pesos moleculares de las proteínas de interés.

Para llevar a cabo la tinción de las proteínas se utilizó la tinción con azul de Coomassie (Brunelle & Green, 2014), inicialmente se incubaron los geles por 30 min con solución de fijación y posteriormente se dejaron tiñendo azul de Coomassie durante 1 h. Al terminar se desecha esta solución y se agrega solución para desteñir hasta que las bandas logran visualizarse.

4.2.5 GELES DE TRIS- TRICINA.

Los geles de Tris tricina se utilizaron para evitar la migración de los péptidos de interés a la par del SDS. Esto se llevó a cabo con geles Tris- tricina 16.5 % (Schägger, 2006) en vidrios de grosor 1.0 mm, donde se cargaron 20 μ L de los cuales 10 μ L pertenecían a la muestra precipitada con metanol y 10 μ L de buffer de carga 2x, dichas muestras se hirvieron por 5 min.

Los geles se corrieron 40 mA por 100 min, con equipo Mini-Protean (BioRad). Como control negativo se utilizó el vector vacío bajo las mismas condiciones de inducción y extracción. El marcador de peso molecular utilizado fue Broad range (BioRad) unstained de 6.5 a 200 kDa, el cual se utilizó como referencia para los pesos moleculares de las péptidos de interés.

Para llevar a cabo la tinción de las proteínas y péptidos se utilizó la tinción con azul de Coomassie (Brunelle & Green, 2014) inicialmente se incubaron los geles por 30 min con solución de fijación y posteriormente se dejaron tiñendo azul de Coomassie durante 1 h. Al terminar se desecha esta solución y se agrega solución para desteñir hasta que las bandas logran visualizarse.

4.2.6 PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DEL LASSO PÉPTIDO POR UPLC-MS

Se adiciona 2 veces el volumen de la muestra de metanol durante dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente se lleva a sequedad en el Rotavapor® R-215 (Buchi), a una temperatura de evaporación de 40°C.

Para el análisis por UPLC-MS (Waters), se inyectaron en el cromatógrafo 5 µL del extracto de la muestra y de los controles utilizados respectivamente, como solvente A se utilizó agua y como solvente B acetonitrilo/ácido fórmico 0.1%, el gradiente utilizado de solventes se encuentra especificado en la tabla 8. Se analizó en polaridad positiva, en una corrida de 14 min y con un flujo de 0.3 mL/min.

Tabla 8. Gradiente de solventes utilizado en la corrida del UPLC-MS para el lasso péptido en hospederos heterólogos.

Tiempo (min)	%A	%B
10	40	60
11	5	95
11.5	5	95
13	95	5
14	95	5

Tabla 9. Predicción bioinformática de las masas teóricas asociadas al lasso péptido en sus distintas conformaciones y en sus distintas ionizaciones (Fragment ion calculator).

Conformación	M	(M+H) ⁺	(M+2H) ²⁺	(M+3H) ³⁺	(M+4H) ⁴⁺
Péptido lineal	3403.81	3404.81	1702.91	1135.61	851.96
Péptido Ciclado	3385.81	3386.81	1693.91	1129.61	847.46
Péptido ciclado metilado (1)	3400.81	3401.81	1701.41	1134.61	851.21
Péptido ciclado metilado (2)	3415.81	3416.81	1708.91	1139.61	854.96

Tabla 9A. Secuencias de aminoácidos asociadas al lasso péptido en sus distintas conformaciones.

Conformación	Secuencia
Péptido lineal	GGRYKNADDDLWGAPLLSAVRGLFASRRRA
Péptido Ciclado	GGRYKNADDDLWGAPLLSAVRGLFASRRRA
Péptido ciclado metilado (1)	 GGRYKNADDDLWGAPLLSAVRGLFASRRRA
Péptido ciclado metilado (2)	 GGRYKNADDDLWGAPLLSAVRGLFASRRRA

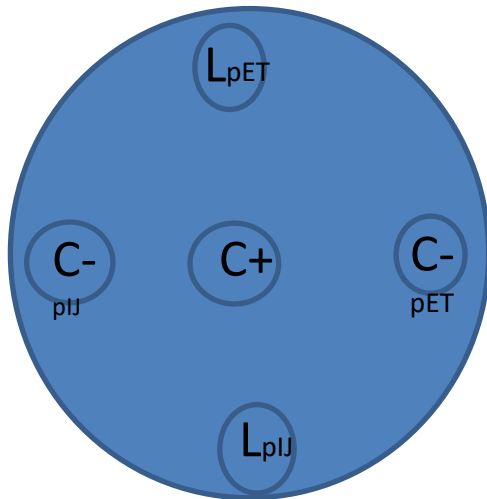
5) EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL PRODUCTO OBTENIDO

Se realizó un ensayo de antibiosis con los extractos obtenidos de la purificación del lasso péptido, para determinar si es que estos presentan actividad antimicrobiana frente a diversos microorganismos, haciendo un ensayo cualitativo.

Las cepas que se utilizaron en el ensayo fueron:

- *Escherichia coli*
- *Listeria monocytogenes*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Pseudomonas fluorescens*
- *Micrococcus luteus*
- *Bacillus subtilis*
- *Staphylococcus aureus*
- *Streptomyces lividans*
- *Saccharomyces cerevisiae*

Las bacterias utilizadas se inocularon en sus respectivos medios líquidos de cultivo y a la temperatura de crecimiento óptima durante toda la noche indicadas en la tabla 4, posteriormente se tomó una asada de colonia necesaria para llegar a 0.05 en escala de Mc Farland resuspendida en solución salina isotónica. Se procedió a inocularlas en sus medio óptimo de crecimiento con agar, donde se generan pozos pequeños como se muestra en la figura 16, y se adiciona un volumen de 100 μ L de extracto purificado de lasso péptido, utilizando como control positivo apramicina 200 μ g/mL y como control negativo pET22b o pIJ6902 vacío los cuales se obtuvieron mediante el mismo tratamiento que la muestra.



L Muestra,
 C- pET22b vacío o
 pIJ6902 vacío
 C+ Apramicina 200ug/mL
 (bacterias)

Figura 16. Modelo de ensayo de antibiosis por difusión en placa.

Se procede a incubar por 24h para determinar si existe una inhibición de las bacterias probadas frente a los extractos semipurificados del lasso péptido. De obtenerse un halo de inhibición del crecimiento, se realizan pruebas por triplicado de dicha bacteria y se mide el halo de inhibición de crecimiento en cm a cada una. Posteriormente se lleva a cabo una prueba de significancia estadística para saber si existen diferencias frente al control, mediante una prueba *t*- student, pareada, en donde si $p < 0.05$, se concluye que existe diferencia significativa con respecto al control.

$$t = \frac{\bar{x}_2 - \bar{x}_1}{\sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right) \left(\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}\right)}}$$

$$p < 0.05$$

Ecuación 1. Ecuación de t-student (pareada).

10 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1) ENSAYOS DE ANTIBIOSIS CON LA CEPA SSNF3

Se realizó un ensayo de antibiosis (Figura 17) donde se determinó frente a que bacterias, los metabolitos secundarios producidos por SSNF3 están generando una inhibición del crecimiento, como se observa es frente a bacterias Gram-positivas probadas *M. luteus* y *B. subtilis*. Lo que nos da la pauta para pensar que dicha bacteria presenta potencial para la inhibición de distintos microorganismos y que podría ser de interés explorar el genoma para determinar por minería genómica los metabolitos secundarios presentes y expresar los que se encuentren crípticos en condiciones de laboratorio.



Figura 17. Ensayo de antibiosis de SSNF3 frente: *Saccharomyces cerevisiae* (SC), *Bacillus subtilis* (BS), *Escherichia coli* (EC), *Micrococcus luteus* (ML).

2) BÚSQUEDA DE CLÚSTERES BIOSINTÉTICOS Y ANÁLISIS DE LOS MISMOS.

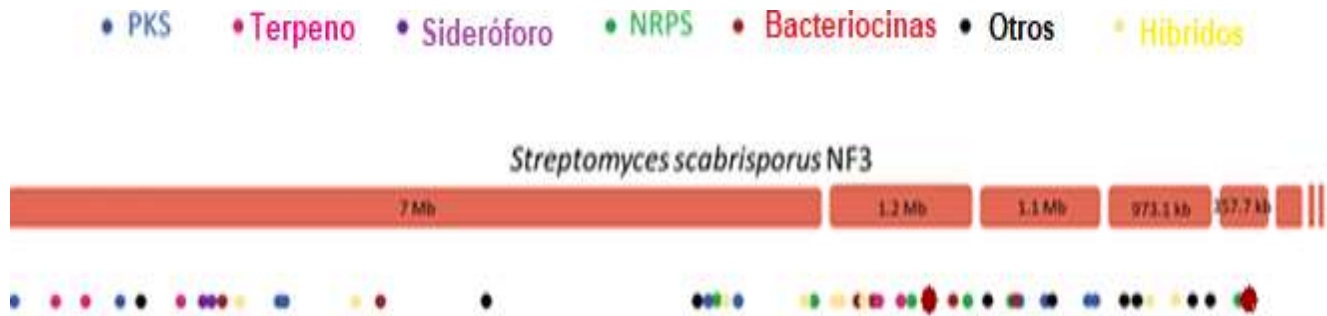


Figura 18. Localización de los metabolitos secundarios en el genoma de *Streptomyces scabrissporus* NF3 (Modificado de Ceapă *et al.*, 2018).

Identified secondary metabolite clusters		The following clusters are from record MWQN01000002.1:	
Cluster	Type	Cluster	Type
The following clusters are from record MWQN01000001.1:		The following clusters are from record MWQN01000003.1:	
Cluster 1	Otherks	Cluster 21	Siderophore-Nrps
Cluster 2	Terpene	Cluster 22	Lantipeptide-Nrps
Cluster 3	Terpene	Cluster 23	Lantipeptide
Cluster 4	T1pks	Cluster 24	T1pks-Nrps
Cluster 5	Other	Cluster 25	Lantipeptide
Cluster 6	Terpene	Cluster 26	Terpene
Cluster 7	Bacteriocin	Cluster 27	Terpene
Cluster 8	Siderophore	Cluster 28	Nrps
Cluster 9	Siderophore	Cluster 29	Lantipeptide
Cluster 10	Lantipeptide	Cluster 30	Lantipeptide-Nrps
Cluster 11	T1pks-Lasso peptide-Otherks	The following clusters are from record MWQN01000004.1:	
Cluster 12	T2pks	Cluster 31	Other
Cluster 13	T2pks-Nrps-Ladderane	Cluster 32	Nrps
Cluster 14	Other	Cluster 33	Lasso peptide
Cluster 15	T3pks	Cluster 34	Otherks
Cluster 16	Nrps	Cluster 35	T1pks
Cluster 17	T1pks-Nrps	Cluster 36	Other
Cluster 18	Otherks	Cluster 37	T3pks
Cluster 19	Thiopeptide-Bacteriocin	Cluster 38	T2pks
Cluster 20	Nrps	The following clusters are from record MWQN01000005.1:	
		Cluster 39	Other
		Cluster 40	Linaridin
		Cluster 41	T1pks-Nrps
		Cluster 42	Bacteriocin-Terpene
		Cluster 43	Butyrolactone
		Cluster 44	Other
		The following clusters are from record MWQN01000005.1:	
		Cluster 45	Lantipeptide-Lasso peptide-Nrps

Figura 19. Análisis bioinformático de los clústeres biosintéticos del genoma de SSNF3, con el programa AntiSMASH (Weber *et al.*, 2017).

Recientemente, en nuestro grupo se obtuvo la secuencia genómica de una nueva bacteria endófito identificada por su gen 16s como *Streptomyces scabrisporus* NF3, aislado de la planta medicinal mexicana cuachalalate (*Amphipterygyum astringens*) (Rodríguez-Peña *et al.*, 2018). La anotación por reveló la presencia de 10491 genes potenciales, entre los cuales 413 genes se asociaron a la biosíntesis de metabolitos secundarios. Haciendo uso de esta información, se identificaron 45 clústeres biosintéticos de los cuales 6 son T1PKS; 2 son T2PKS; 1 es T3PKS; 10 son híbridos KS/NRPS; 6 son terpenos; 11 son NRPS; 3 son sideróforos y 16 son bacteriocinas, haciendo un recorrido automático por el genoma (Anti-SMASH y Bagel3) (Figura 18 y 19) (Vázquez-Hernández *et al.*, 2017).

Al investigar las moléculas potencialmente bioactivas ocultas dentro de este genoma utilizando la plataforma Bagel 3, se descubrieron tres operones que codifican lasso péptidos (Ceapă *et al.*, 2018). Entre ellos, un operón no contenía todas las enzimas necesarias para la formación de un péptido funcional. Decidimos centrarnos en la traducción del lasso péptido ubicado en la posición de los genes 10,064 a 10,067, debido a la gran novedad de los genes biosintéticos, ya que al traducirse en proteínas, estas comparten una similitud de menos del 40% frente a las proteínas ya reportadas, cuando se realiza un BLASTP contra la base de datos de proteínas no redundantes en NCBI (Figura 20).

Haciendo un análisis de la secuencia asociada a los lasso péptidos se observa que el número dos presenta todos los sitios conservados asociados al reconocimiento de las proteínas encargadas de procesarlo, pese a eso este presenta una menor novedad en cuanto a secuencia, puesto a que al hacer un alineamiento local se obtienen valores de similitud más altos, además de que dentro del clúster, no presenta genes que codifiquen para enzimas modificadoras postraduccionales.

Con la información anterior se eligió el clúster de interés lasso péptido I, el cual es de clase II y se encuentra ubicado en el contig 3 del genoma de estudio (Figura 18), y que fue de interés debido a que presenta una serina en el sitio de corte y la posibilidad de una o varias metilaciones en la secuencia, lo cual nos hace interesante pensar en cuál será el efecto que tendrá estas sobre su procesamiento y actividad (Figura 20).

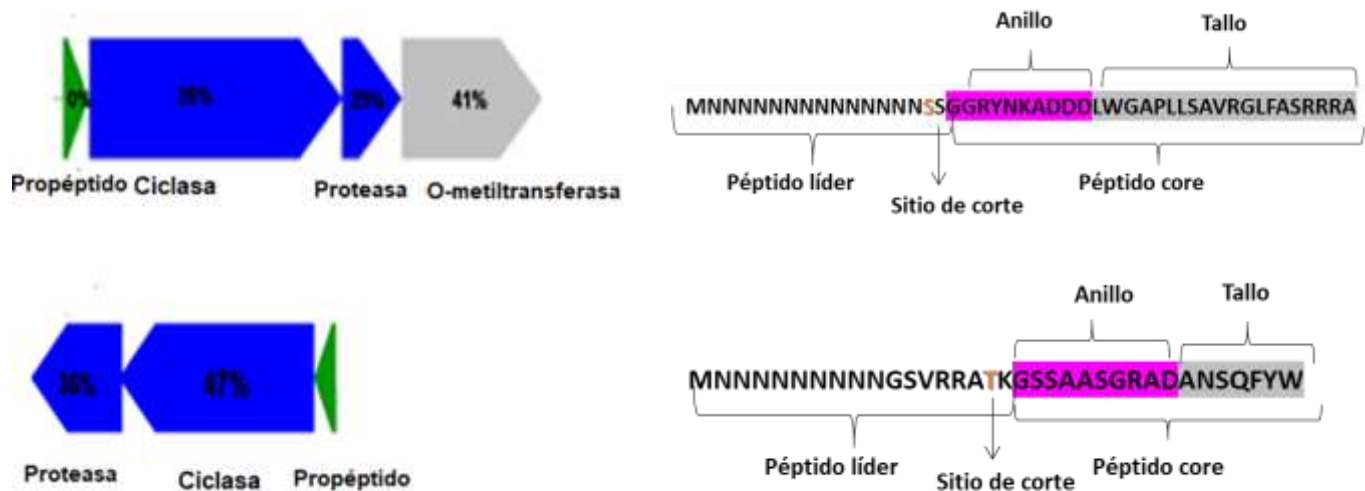


Figura 20. a) Clústeres biosintéticos de los lasso péptidos anotados en el genoma de SSNF3. b) Precusores peptídicos de los lasso péptidos anotados en el genoma de SSNF3. Lasso péptido I, consta de 4045 pb. Lasso péptido II, consta de 2822 pb, ubicados en el contig 3 del genoma de estudio.

Se intentó modelar el lasso péptido mediante homología utilizando como templado lasso péptidos ya cristalizados, dicho proceso no tuvo un resultado favorecedor debido a que a pesar de que existen algunos, estos presentan una homología de 27% cuando el tamaño de la secuencia es de alrededor de 20 aminoácidos, por lo tanto comparten un aproximado de 8 aminoácidos en secuencia con el de interés (RiPPminner), por lo cual el algoritmo de Phyre2 no logró generar el modelo.

Se realizaron dos diseños manuales hipotéticos basados en lo descrito en la literatura en donde el péptido final contiene un anillo de 9 aminoácidos y una cola de 19 aminoácidos, de los cuales se cree que 8 se encuentran en movimiento libre fuera del anillo (Figura 21 (a)). Basándonos en la secuencia de aminoácidos y en los posibles puentes de hidrogeno y fuerzas de Van der Waals que pueda haber en la cadena aminoacidica, se plantea la hipótesis de que se pueden formar enlaces de hidrógeno entre el anillo y el aminoácido arginina (20) de la cadena lateral, debido al tamaño de esta. Con esto se evitaría una escisión enzimática de R (20) por enzimas proteolíticas. Los aminoácidos en el extremo carboxilo de la cadena también podrían estar interactuando con el anillo como se sugiere en la figura 21(b).

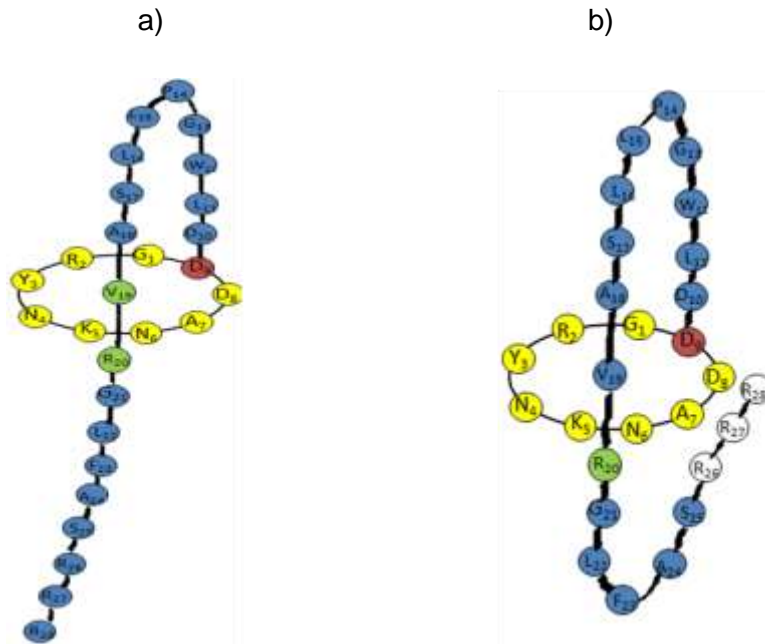


Figura 21. Representación esquemática de las posibles estructuras del lasso péptido. A) Lasso péptido con extremo carboxilo terminal libre. B) Lasso péptido con extremo carboxilo terminal estabilizándose mediante interacción estérica con el anillo.

Paralelamente se modelaron las proteínas del clúster con el programa bioinformático Phyre2, que nos arrojó que la proteína C, codifica a una ciclasa, anotada como una asparagina sintetasa, la cual en conjunto con la proteasa forma una sintetasa dependiente de ATP, esta ciclasa tiene 712 residuos aminoácidos de los cuales 450 (63% de su secuencia) se modelaron con un 100.0% de confianza en relación con el modelo con mayor similitud, que fue una sintetasa de carbapenem de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (PBD 1Q15) (Miller *et al.*, 2003). La cual está involucrada en la síntesis de antibióticos de última generación, esta es una enzima dependiente de ATP / Mg²⁺ que cataliza la formación del anillo beta-lactámico en la biosíntesis del ácido (5R) -carbapenem-3-carboxílico. Además de esto el análisis de Phyre2 nos predice que la proteína puede presentar una hélice transmembranal (Figura 22 y 23).

La anotación del templado sintetasa de carbapenem parece un poco divergente a la función y la anotación de nuestra proteína, el programa la eligió como templado ya que ambas poseen la particularidad de ciclar anillos con gasto de ATP y presentan un dominio sintetasa.

De igual manera, para la proteína B, se predijo una anotación como una proteasa putativa, la cual tiene 169 residuos aminoácidos de los cuales 41 (24% de su secuencia) se modelaron con un 94.8% de confianza en relación con una cisteína proteasa putativa de *Cytophagus hutchinsonii*, (PDB 3ISR), que pertenece al familia de enzimas similares a las transglutaminasas (Figura 22).

Finalmente, la proteína E se anotó como una isoaspartato-O-metiltransferasa que contiene 396 residuos aminoácidos de los cuales 310 (78% de su secuencia), se modelaron con un 100.0% de confianza en relación con el modelo de mayor similitud, el cual es una isoaspartato-O-metiltransferasa (PDB 1DL5) (Skinner *et al.*, 2000) de *Thermotoga maritima* cepa ATCC 43589, que participa en la reparación de proteínas dañadas por la formación de isoaspartilo (Figura 22).

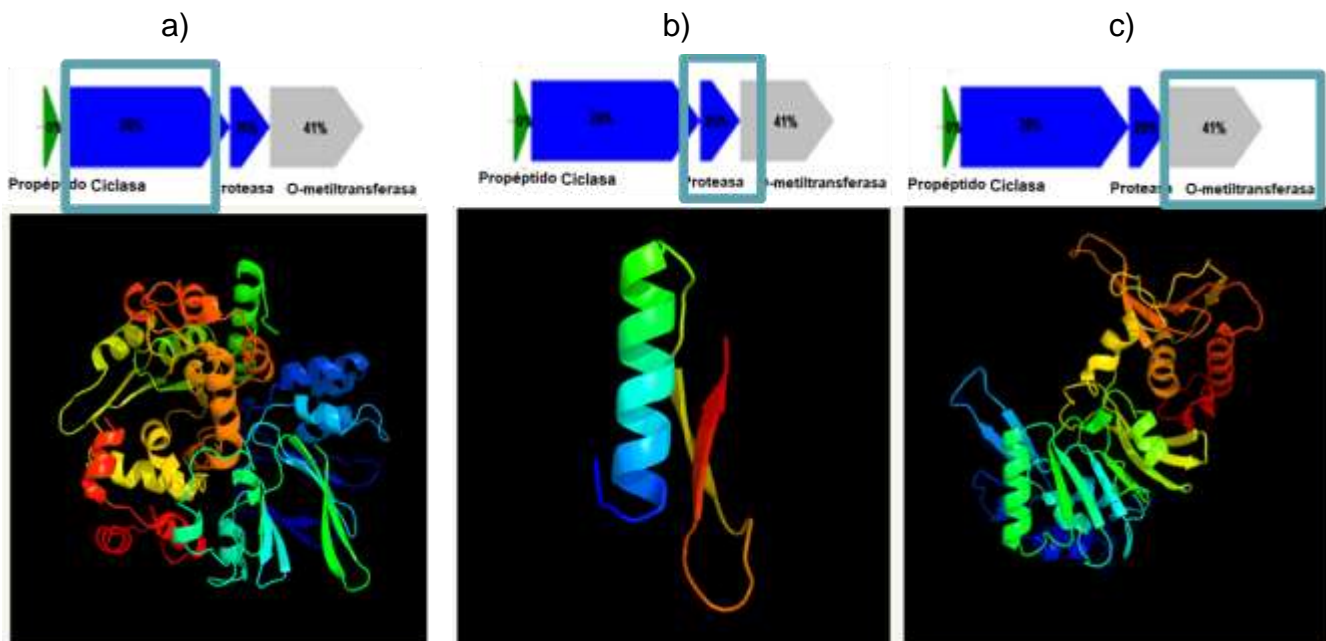


Figura 22. Modelado tridimensional A) Proteína C perteneciente al clúster ciclase 450 residuos (63% de su secuencia) fueron modelados con 100.0% de confianza con relación al modelo con mayor similitud, la cual fue un sintetasa de carbapenem de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum*. B) Proteína B perteneciente al clúster, proteasa putativa, 41 residuos (24% de su secuencia) fueron modelados con 94.8% de confianza con relación al modelo con mayor similitud, la cual fue una estructura cristalizada de una cisteína proteasa putativa el *Citofago hutchinsonii*. C) Proteína E perteneciente al clúster isoaspartato-o-metiltransferasa, 310 residuos (78% de su secuencia) fueron modelados con 100.0% de confianza con relación al modelo con mayor similitud, la cual fue una isoaspartato-o-metiltransferasa de *Thermotoga maritima* cepa ATCC 43589.

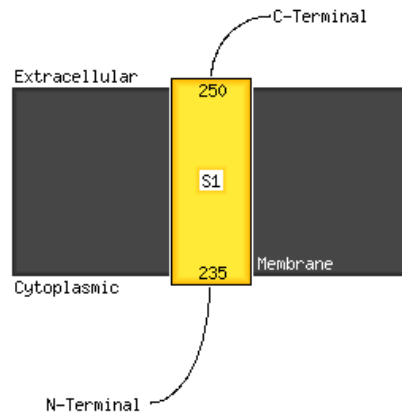


Figura 23. Predicción de hélices transmembranales, provenientes de la secuencia de aminoácidos asociada a la proteína C (ciclasa).

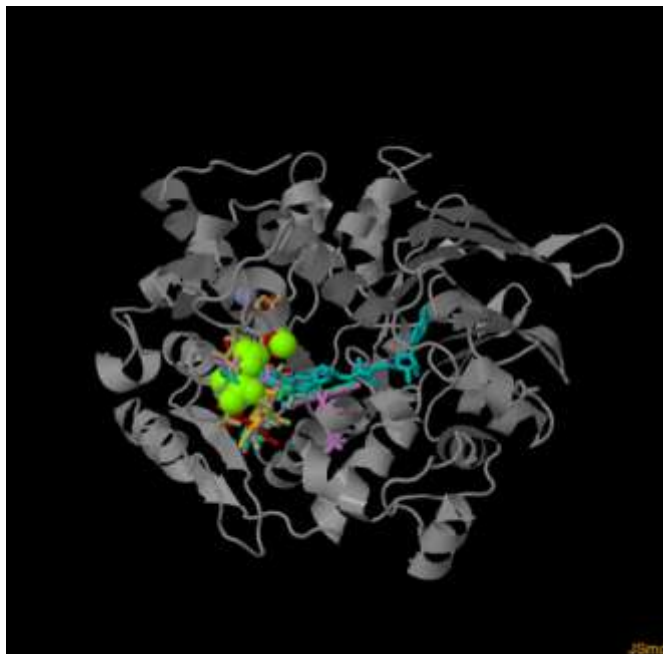


Figura 24. Predicción de los sitios de unión a ligando con ayuda de 3D ligand, asociada a la proteína C (ciclasa), ligando- moléculas verdes, aminoácidos de los sitios de unión identificados con colores.

Las moléculas asociados al sitio de unión a ligando nos proporcionan información de los posibles cofactores necesarios para el correcto funcionamiento de la enzima, y por la naturaleza de la enzima correlaciona con que sean necesarias moléculas asociadas a la generación de energía, como lo son FAD, ATP y NAD (Figura 24) (Tabla 10).

Tabla 10. Moléculas asociadas al sitio de unión a ligando de la proteína C (ciclasa).

Molécula
Nucleótidos difosfatados (NDP)
Flavin Mononucleótido (FMN)
Magnesio (Mg)
Adenosin Trifosfato (ATP)
Nicotinamida Adenina Dinucleótido (NADP)
Flavín Adenín Dinucleótido (FAD)
Adenosin Monofosfato (AMP)
Zinc (Zn)



Figura 25. Predicción de los sitios de unión a ligando con ayuda de 3D ligand, asociada a la proteína isoaspartato-o-metiltransferasa, ligando- moléculas verdes, aminoácidos del sitio de unión identificados con morado y azul.

Tabla 11. Moléculas asociadas al sitio de unión a ligando de la proteína isoaspartato-o-metiltransferasa.

Molécula
S-adenosil-L-metionina (SAM)
S-Adenosil-L-homocisteína (SAH)
Calcio (Ca)

Como se puede observar en la figura 25 la isoaspartato-o-metiltransferasa, puede estar involucrada en el reconocimiento y desmetilación de S-adenosil-L-metionina a S-Adenosil-L-homocisteína y en el reconocimiento de calcio como cofactor, para su correcto funcionamiento (Tabla 11).

3) EXPRESIÓN DE HETERÓLOGA DEL CLÚSTER DE INTERÉS.

3.1 CLONACIÓN DEL CLÚSTER DE INTERÉS QUE CODIFICA PARA UN LASSO PÉPTIDO DE *Streptomyces scabrisporus* NF3 Y SUS PROTEÍNAS ASOCIADAS EN *Escherichia coli* Rosetta Y *Streptomyces lividans* TK24

3.1.1 CLONACIÓN DE LASS1 EN PET22B PARA LA TRADUCCIÓN DE LAS PROTEÍNAS EN *E. coli* Rosetta

Inicialmente, se pudo verificar la integridad del DNA genómico perteneciente a SSNF3 en 10491 kpb (Figura 26(a)). Posteriormente se realizó la clonación de Lass 1 en pET22b donde se obtuvo el fragmento deseado de 4045 pb mediante PCR de punto final (Figura 26(b)), el cual se ligó al vector y se transformó en el hospedero heterólogo *E. coli* DH5 α , verificándolo por doble restricción (Figura 27(a)) y PCR de colonia (Figura 27(b)), para posteriormente transformarlo en el hospedero de expresión *E. coli* Rosetta, el cual se verificó también por ensayos de restricción y PCR de colonia, después de esto se pudo definir que el fragmento introducido en el vector es el deseado.

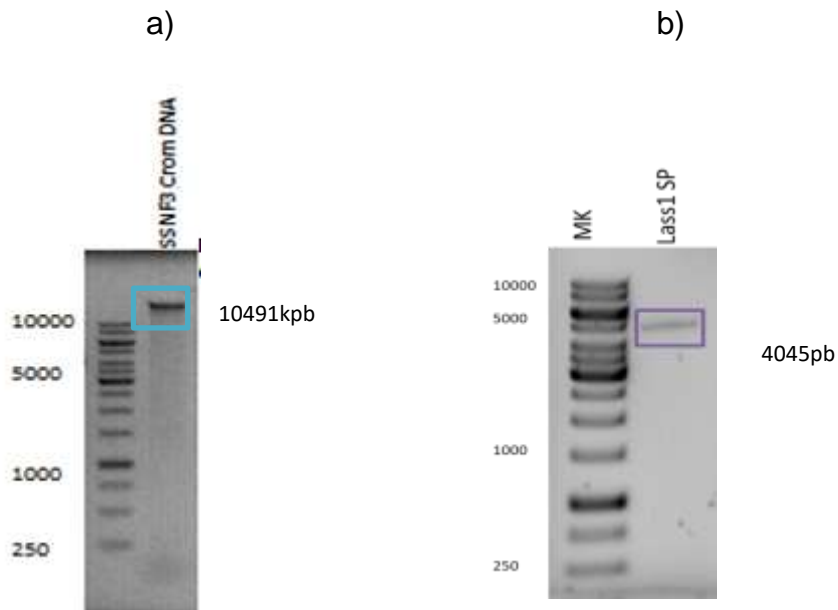


Figura 26. a) Aislamiento de DNA cromosomal de SSNF3. b) PCR accuprime para clonación del clúster Lass1 (4045 pb), protocolo en tres pasos con temperatura de alineamiento de 60°C.

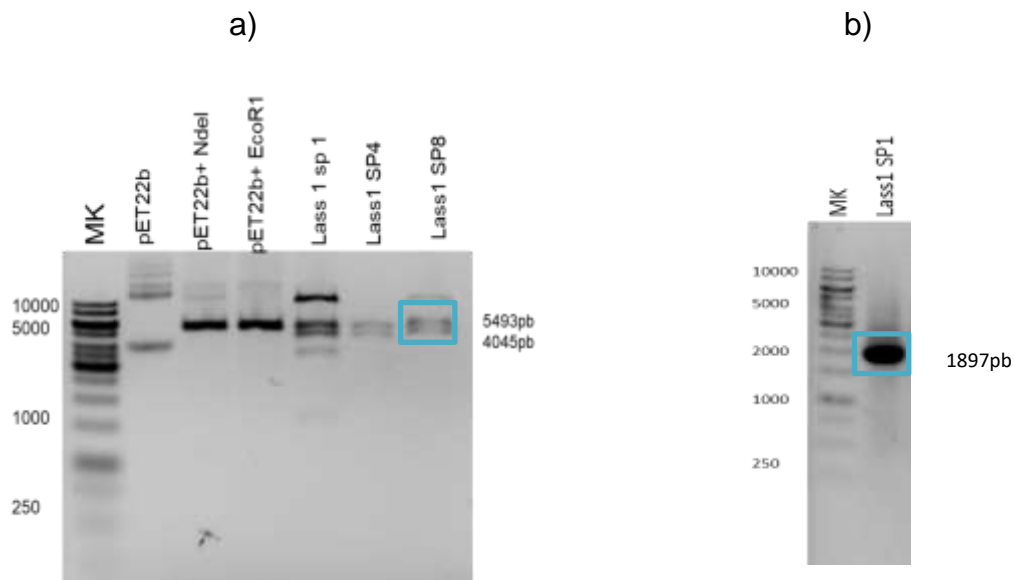


Figura 27. a) Verificación de la construcción Lass1 en pET22b mediante DRE *EcoR1/NdeI*, 1 h a 37°C de las Colonias positivas para la transformación en *E. coli* DH5α. Control 1. Vector sin cortar (pET22b). Control 2: vector cortado con cada una de las enzimas en las mismas condiciones pET22b/*EcoR1* y pET22b/*NdeI*. b) PCR de colonia para verificación de la construcción con *Phire* plant polimerasa *E. coli* DH5α con cebadores internos (1897 pb).

3.1.2 CLONACIÓN DE LASS1 EN pIJ6902 PARA LA CONJUGACIÓN CON UN HOSPEDERO DEL GENERO *Streptomyces*.

De igual forma se realizó la clonación del clúster de interés en pIJ6902, donde se obtuvo el fragmento deseado Lass1 (4045 kb) mediante PCR de punto final (Figura 26 (b)), el cual se ligó al vector (Figura 28 (a)) y se transformó en el hospedero de clonación *E. coli* DH5 α , verificándolo por restricción con *Bsp*H1 (Figura 28 (b)), para posteriormente transformarlo en una cepa intermediaria *E. coli* ET12576, la cual posee la capacidad para realizar la conjugación con un hospedero *Streptomyces*.

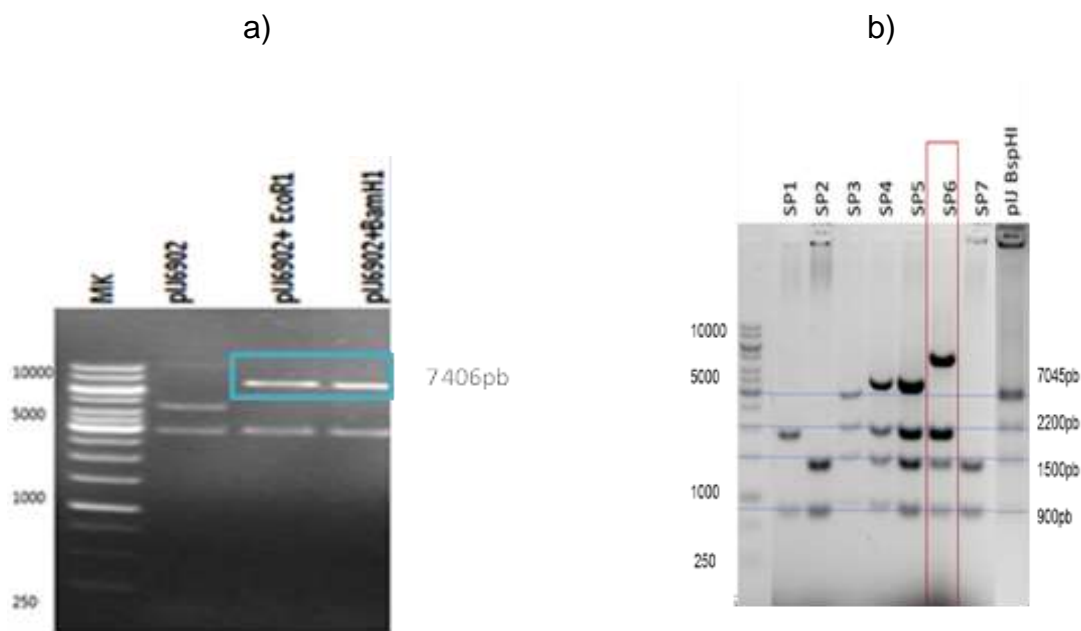


Figura 28. a) Ensayos de restricción de pIJ6902 con *Eco*R1 y *Bam*H1 con incubación de 3 h en las condiciones óptimas de acción de cada enzima. b) Verificación de la clona: Restricción de los plásmidos aislados provenientes de las colonias positivas para la transformación de la construcción con Lass 1 en el vector pIJ6902 (SP1-7) en *E. coli* DH5 α con *Bsp*H1.

Una vez llevada a cabo la transformación la cepa intermediaria de *E. coli* ET12576, esta se verifica por PCR de colonia con cebadores internos del clúster (Figura 29(a)); como último paso se encuentra la conjugación de *E. coli* ET12576 con *Streptomyces lividans* TK24, la cual se verifico de igual manera mediante PCR de colonia (Figura 29 (b)) para determinar que se encuentre en el estreptomiceto.

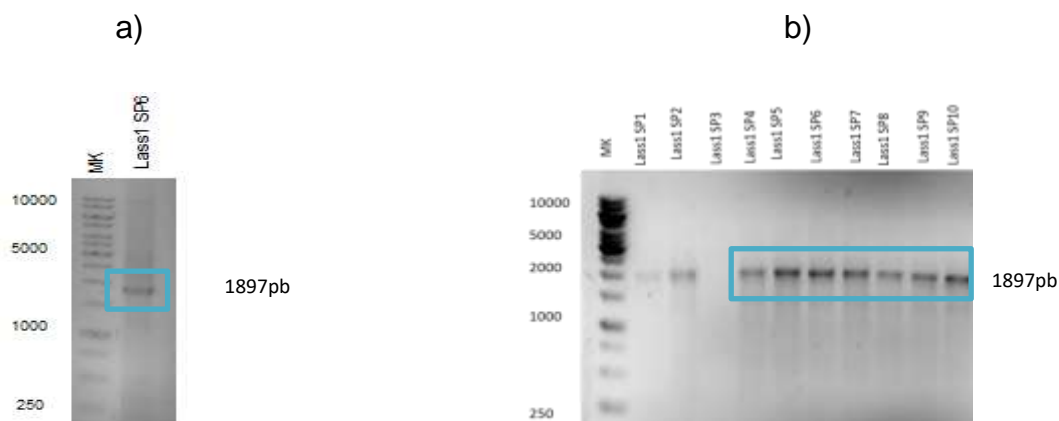


Figura 29. (a) Verificación de la clona mediante PCR *Phire* plant Tm: 60°C con cebadores internos para Lass1 SP6 en *E. coli* ET12576 (1897pb). (c) PCR de colonia (*taq* platinum) con cebadores internos (1897 pb) de *Streptomyces lividans* TK24.

Se llevó a cabo la secuenciación del clúster de interés, asociado a la producción del lasso péptido de DNA proveniente de *E. coli* DH5 α . Mediante este ensayo se determinó que el fragmento de DNA asociado a la traducción del lasso péptido no presenta mutaciones con respecto al genoma de SSNF3 secuenciado y ensamblado en el laboratorio (Vásquez-Hernandez, *et al.* 2017) (NCBI ID. Accession NZ_ARCJ00000000.1) (Figura 30). El método de Sanger no logró secuenciar todos los nucleótidos asociados al clúster esto debido al alto porcentaje de guanina- citosina presente en el fragmento (Chin *et al.*, 2013).



Figura 32. Apariencia macroscópica *Streptomyces lividans* TK24. A) Transformada con el vector pIJ6902. B) Transformada con la construcción de Lasso péptido 1.

Posteriormente se hace una comparación macro y microscópica de ambas cepas, para observar si existen diferencias dado a que el vector pIJ6902 es integrativo y puede introducirse en el genoma ocasionado un cambio en la fisiología, producción de metabolitos y/o apariencia del microorganismo.

Nos indica que el fragmento se integró al genoma de esta bacteria, activando y aumentando producción del pigmento gris asociado a la generación de esporas, que no se observa en la bacteria transformada con el vector vacío, este efecto está relacionado con la producción del metabolito de interés, puesto que al ser bioactivo y producirse en la bacteria, esta se genera mecanismos de resistencia, como lo es la formación de esporas (Lanskin, 2004) (Figura 31 y 32).

3.2 TRADUCCIÓN DE LAS PROTEÍNAS EN *E. coli* ROSETTA Y *S. lividans* TK24.

3.2.1 SDS-PAGE

Traducción de proteínas de BGC Lass1 en *E. coli* Rosetta.

Se corrió un gel SDS-PAGE 12% de acrilamida para poder identificar la producción de las proteínas asociadas al clúster mediante sus pesos moleculares, tiñendo con azul de Coomassie. Se identificó la banda asociada LunB (Transglut 3) en 17 kDa, (Figura 33) por su peso molecular y la comparación con el control negativo que es el vector pET22b.

Las proteínas LunC y LunE no se observan, esto es debido a la manera en que se llevó a cabo la construcción del vector, dado que es necesario la introducción de un promotor entre cada gen, o sitios de unión a ribosoma pertenecientes a *E. coli*, para que esta los pueda reconocer, como se puede observar en la figura 33, al no haber traducción de las proteínas en una concentración apreciable, se infiere que la transcripción de estos genes no se lleva a cabo de manera policistónica.

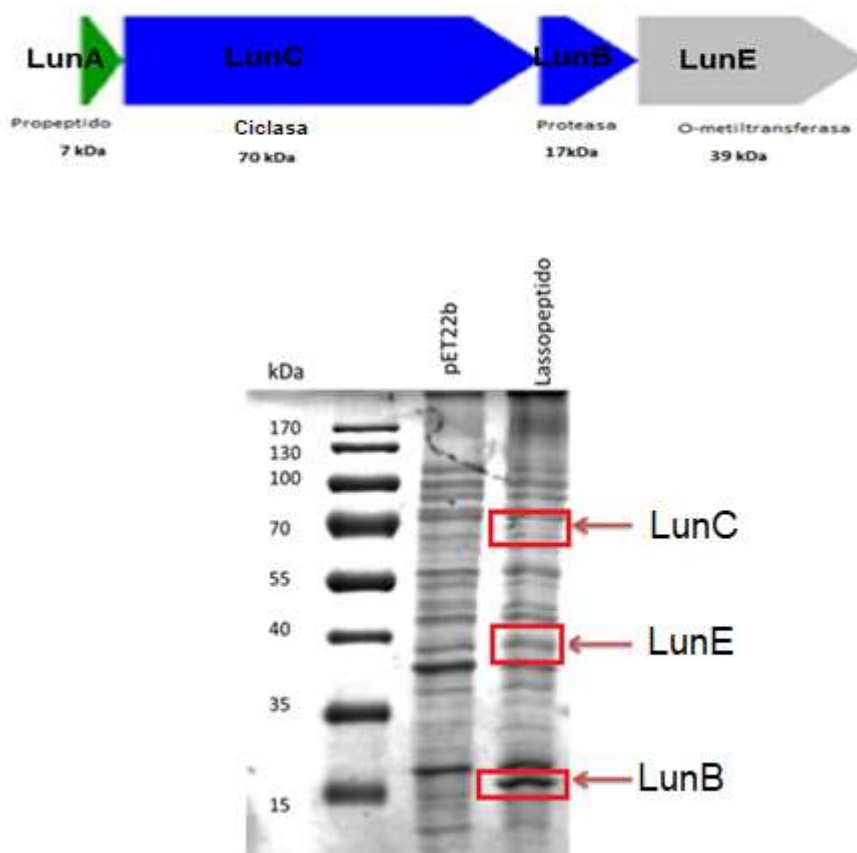


Figura 33. a) SDS- PAGE de 12% de acrilamida, con las proteínas asociadas al clúster lasso péptido I en la inducción dentro de *E. coli* Rosetta teñidos con azul de Coomassie

Traducción de proteínas de BGC Lass1 en *S. lividans* TK24.

Se corrió un gel SDS-PAGE 12% de acrilamida para poder identificar la producción de las proteínas asociadas al clúster, mediante sus pesos moleculares provenientes de la inducción de este en *S. lividans* TK24, tiñendo con azul de Coomassie (Figura 34).

Se identificaron las bandas asociadas a cada una de las proteínas involucradas con la formación del lasso péptido. LunC (Asn Sintasa) en 70 kDa y LunE (isoaspartate O - metiltransferasa) en 39 kDa mediante la identificación de las bandas y la comparación con el control negativo que es el vector pIJ6902.

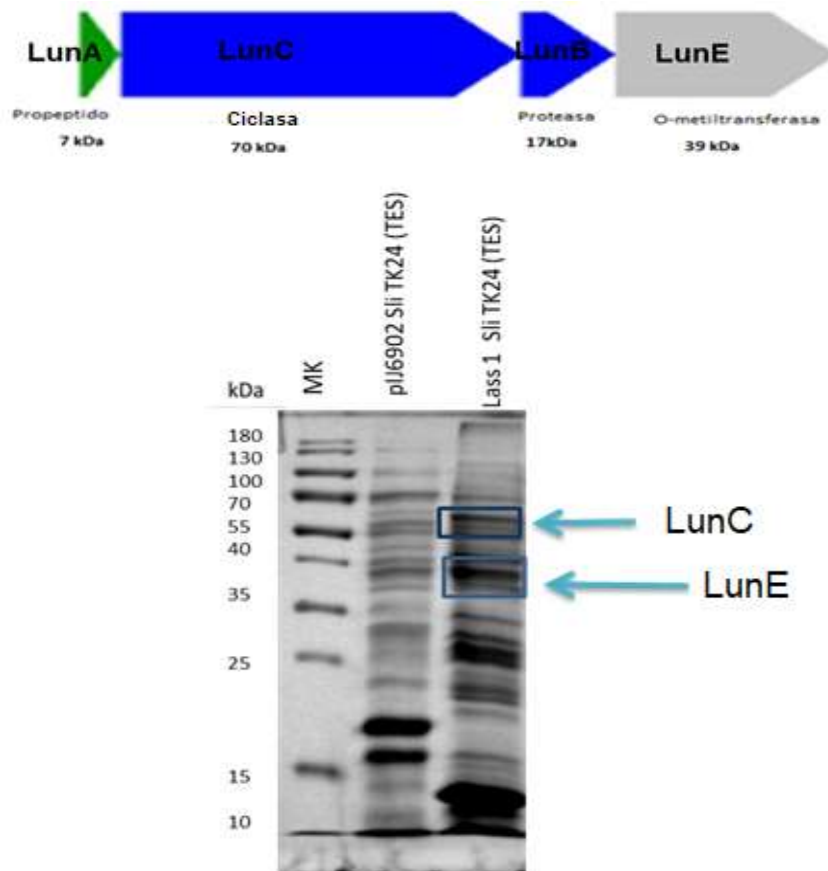


Figura 34. a) SDS- PAGE de 12% de acrilamida, con las proteínas asociadas al clúster lasso péptido I en la inducción dentro de *S. lividans* TK24, teñidos con azul de Coomassie.

Se puede inferir que el hecho de que este hospedero sea del mismo género que la bacteria que produce la molécula homóloga, esta produce los inductores de los promotores endógenos de cada uno de los genes que conforman el clúster, por ello se observa una mayor producción de cada una de las proteínas en dicha inducción en comparación de la traducción heteróloga en *E. coli* Rosetta.

El vector pIJ6902 es de tipo integrativo, esta integración es aleatoria, es decir que se puede introducir en cualquier punto del genoma, esto deriva en la activación de distintas vías de producción de metabolitos y/o proteínas en cada una de las construcciones, lo que genera distintos patrones de bandas en los geles SDS-PAGE; complementariamente a que SliTK24 no es un organismo genéticamente modificado, por lo que le es posible producir una amplia gama de metabolitos primarios y secundarios de tipo proteico y no proteico.

3.2.2 GELES DE TRICINA

Traducción de proteínas de BGC Lass1 en *E. coli* Rosetta

Se corrió un gel Tris-Tricina 16.5% de acrilamida, para poder identificar la producción del péptido proveniente de la inducción en *E. coli* Rosetta extraídos con metanol, teñido con azul de Coomassie. Se identificó la banda asociada a LunA (péptido ciclado) en 3.5 kDa, donde tentativamente se puede observar una banda predominante en la muestra la cual está por debajo de 6.5 kDa, lo que nos puede indicar que está asociada al lasso péptido (Figura 35), se puede observar una banda en el control debido a la posible degradación de proteínas en péptidos intrínsecos de la bacteria utilizada para la traducción, por ello se requieren ensayos complementarios para la identificación.

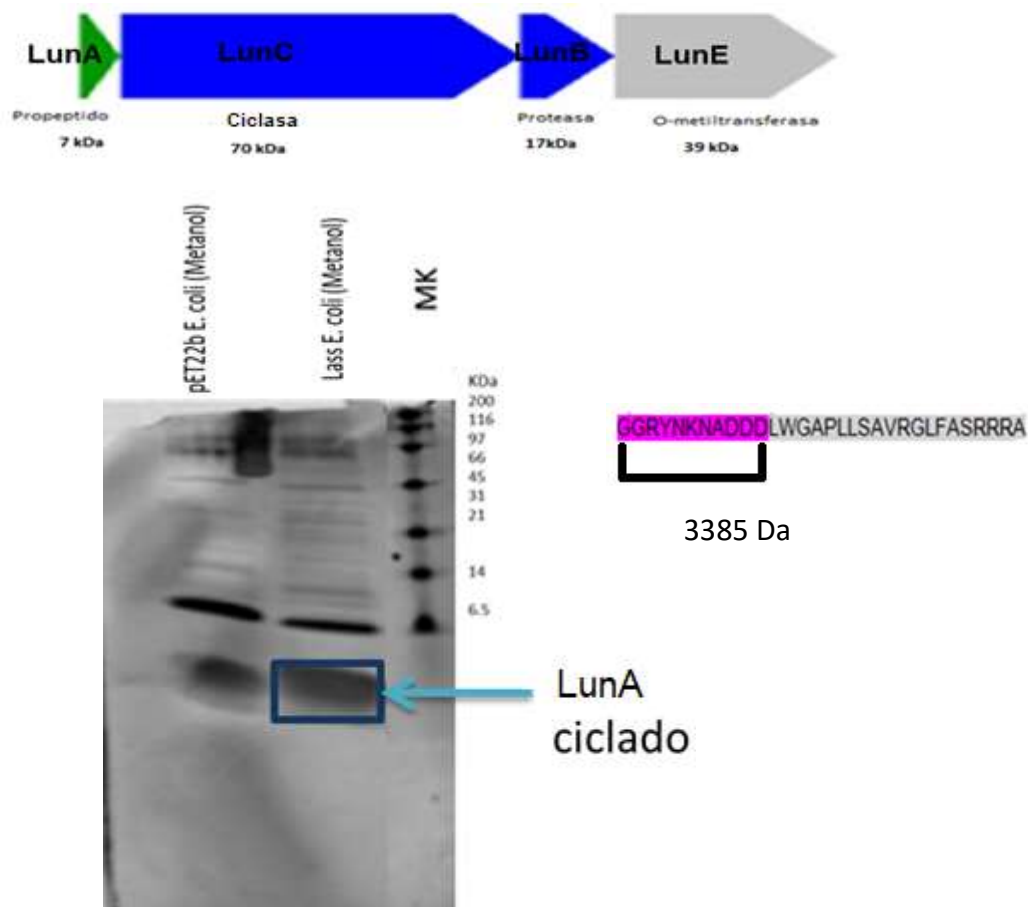


Figura 35. Geles de Tris-tricina para la identificación del lasso péptido, producido mediante la inducción del clúster biosintético en *E. coli* Rosetta.

Traducción de proteínas de BGC Lass1 en *S. lividans* TK24.

Se corrió un gel Tris-Tricina 16.5% de acrilamida, para poder identificar la producción del péptido proveniente de la inducción en *S. lividans* TK24 extraídos con metanol, teñido con azul de Coomassie.

Se identificaron las bandas asociadas a algunas proteínas involucradas con la formación del lasso péptido LunA (péptido ciclado) en 3.5 kDa, LunB (Transglut 3) en 17 kDa. Tentativamente se pudo observar una banda de mayor abundancia en Lass 1 por debajo de 6.5 kDa, lo que nos indica que existiría presencia de un péptido mayoritario en la muestra problema (Figura 36).

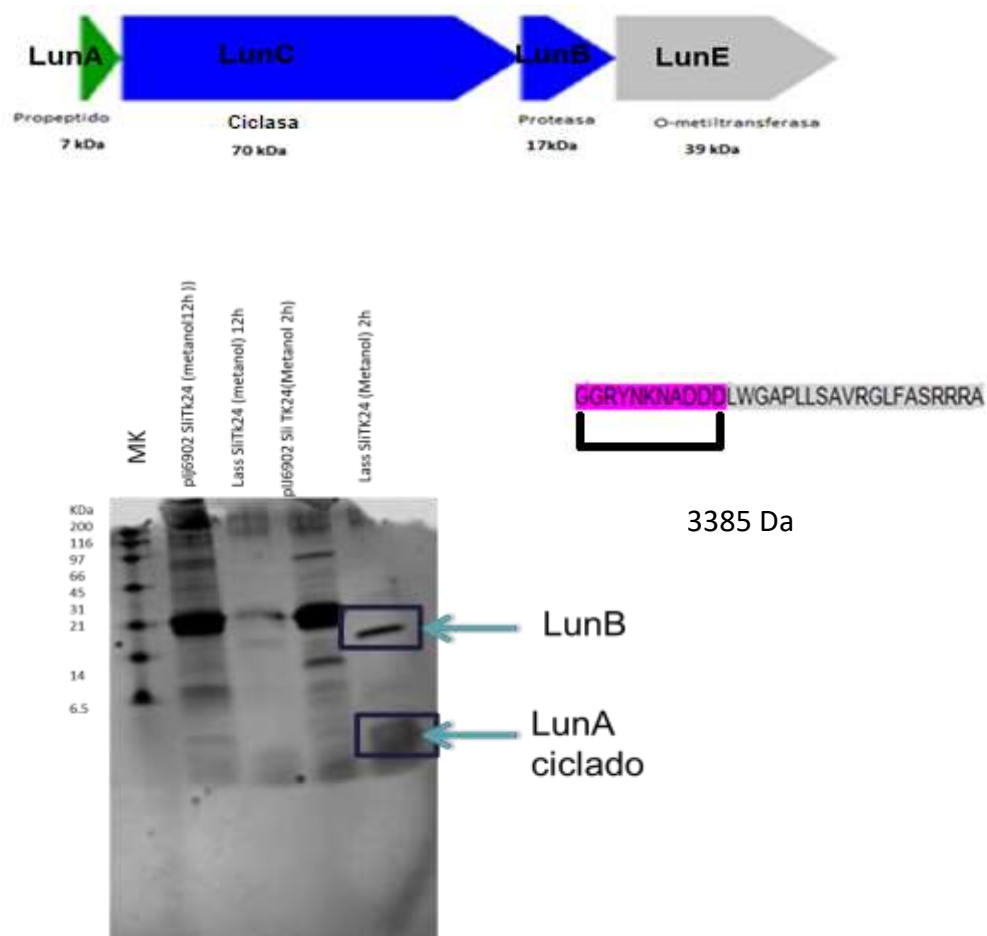
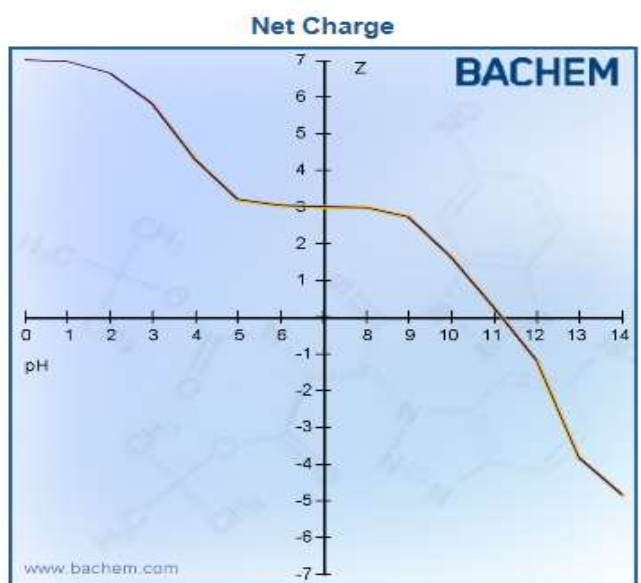


Figura 36. Geles de Tris-tricina para la identificación del lasso péptido, producido mediante la inducción del clúster biosintético en *S. lividans* TK24.

Haciendo una comparación de los geles de SDS-PAGE con los Tricina-PAGE se puede observar que la precipitación con MeOH está favoreciendo la precipitación de proteínas de bajo peso molecular, proceso que lo hace ideal para la identificación de estos péptidos por UPLC-MS.

3.3 PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DEL LASSO PÉPTIDO POR UPLC-MS

Se realizó la identificación al lasso péptido semipurificado con metanol mediante ULPC-MS. En todos los casos este presentó una señal asociada a proteína, se verificó que no estuviera contaminado con detergentes ni polímeros, para la correcta ionización de las muestras. En la figura 37 podemos definir que el pH que se genera dentro del equipo por adición del ácido fórmico 0.1% será de 2.7 (ACE-HPLC®), para nuestra molécula la carga asociada a ese pH de 6⁺ pese a eso, se está favoreciendo la ionización en 4⁺ y en 3⁺, debido a que únicamente se logran ionizar los aminoácidos que no se encuentran impedidos por la estructura de lasso que presenta la molécula (Figura 21).



3-Letter Code: Gly-Gly-Arg-Tyr-Asn-Lys-Asn-Ala-Asp-Asp-Asp-Leu-Trp-Gly-Ala-Pro-Leu-Leu-Ser-Ala-Val-Arg-Gly-Leu-Phe-Ala-Ser-Arg-Arg-Arg-Ala

Figura 37. Carga neta del lasso péptido dependiente del pH (BACHEM- Peptide calculator).

Purificación de Lass1 proveniente de traducción de BGC en *E. coli*

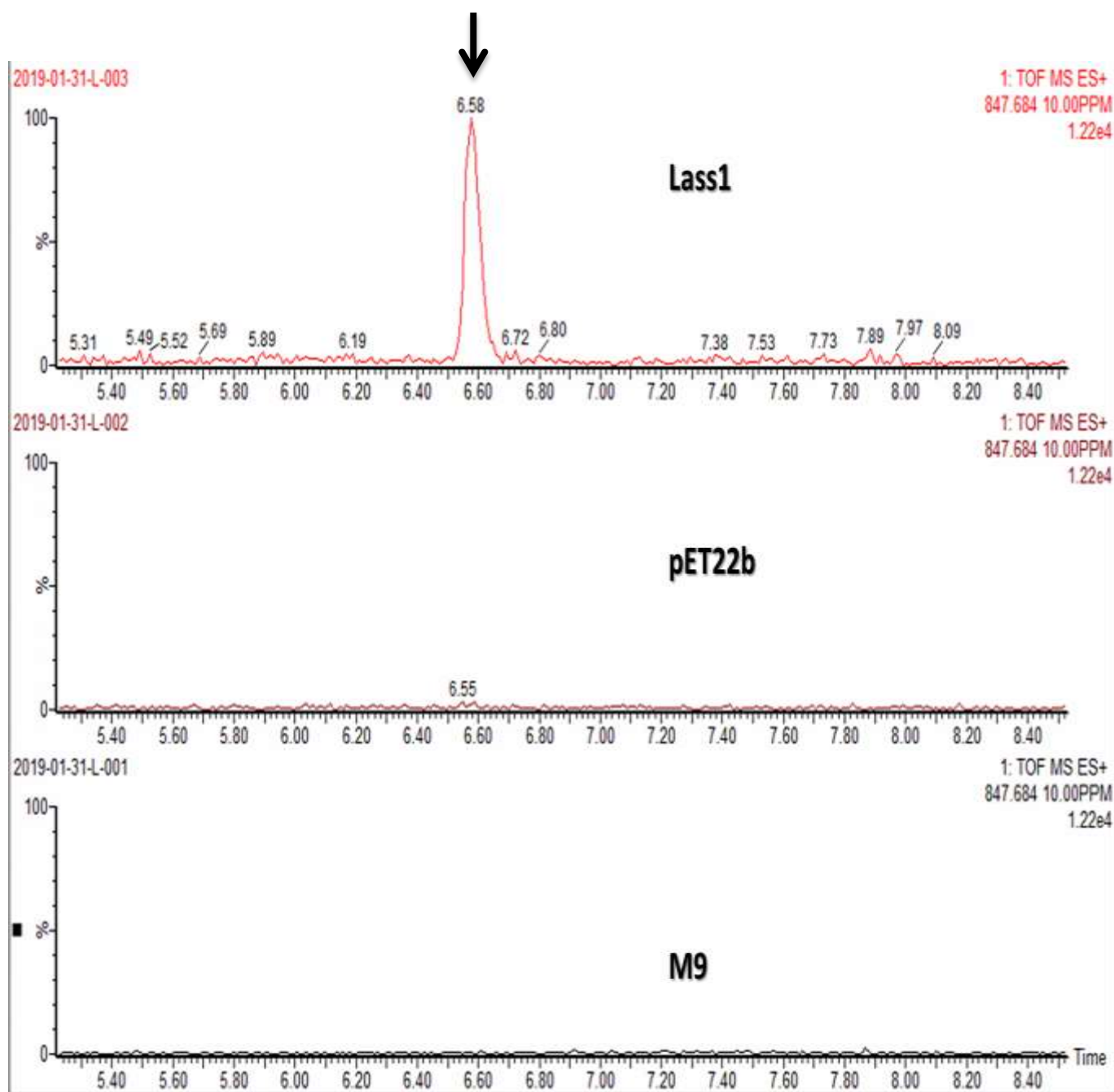


Figura 38. Cromatograma de UPLC-MS asociado a la masa $(M+4H)^{4+}$ del lasso péptido ciclado, (Tabla 9), se indica con una flecha el tiempo de retención donde fue localizada (6.58 min). a) Lass 1 extraído con MeOH. b) pET22b (vector vacío) extraído con MeOH, como control negativo. c) Medio M9 sin inocular extraído con MeOH, como control negativo, provenientes de la traducción de las proteínas del clúster en *E. coli* Rosetta.

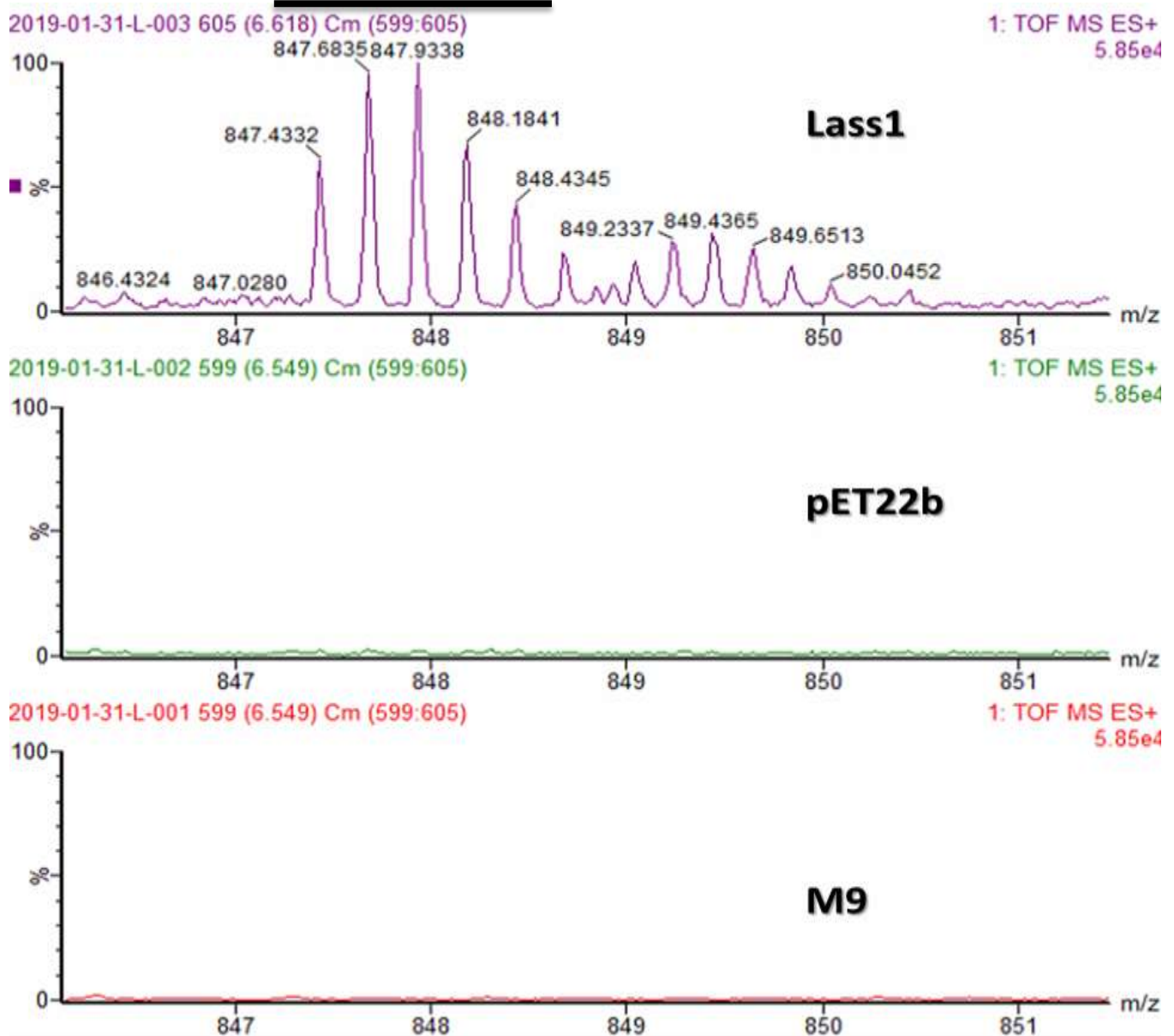


Figura 39. Identificación de la masa asociada al péptido ciclado en su forma $(M+4H)^{4+}$ (Tabla 9), señalada con una línea en el cromatograma, la cual se encontró en el pico indicado en la figura 38 provenientes de la traducción de las proteínas del clúster en *E. coli* Rosetta, comparándose con sus controles negativos pET22b y el medio M9 sin inocular, extraídos bajo las mismas condiciones.

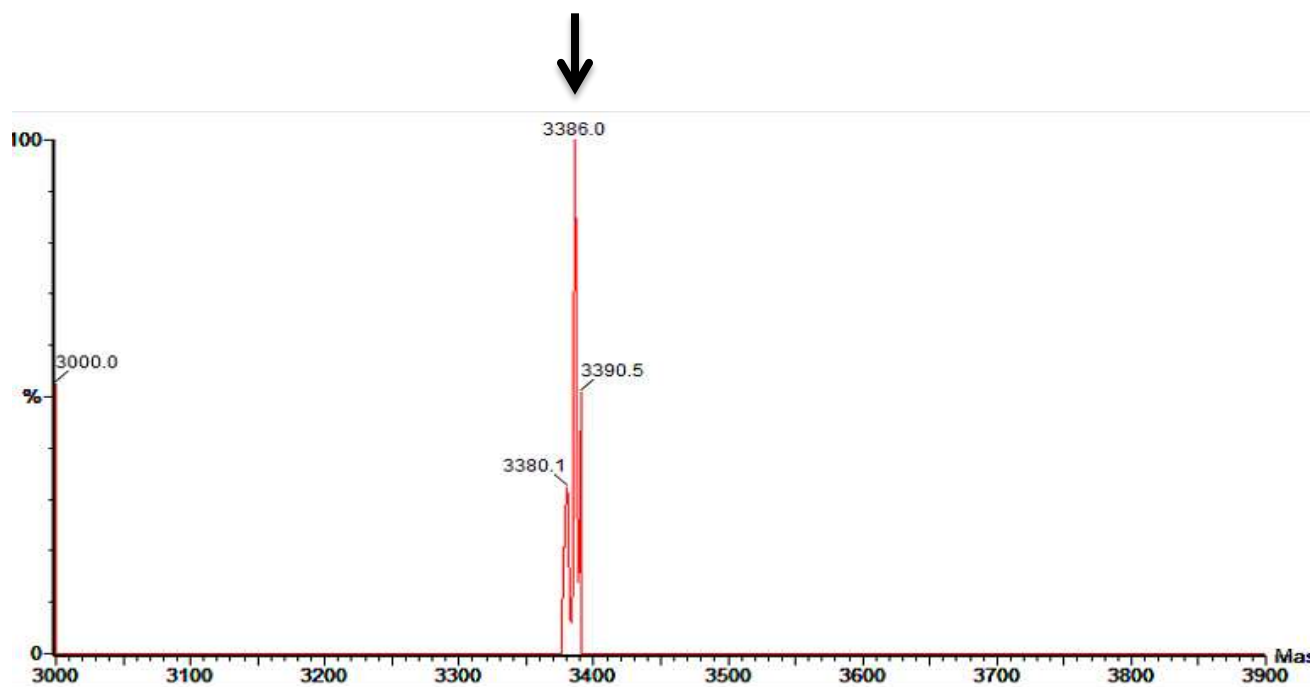


Figura 40. Sumatoria de las 4 ionizaciones del péptido ciclado $(M+4H)^{4+}$ (Tabla 9) proveniente de la traducción de las proteínas del clúster en *E. coli* Rosetta, asociada a la ionización descrita en la figura 39, señalado con una flecha se encuentra la sumatoria asociada a la masa total del péptido ciclado 3385 Da.

En esta producción se observa un perfil cromatográfico más limpio (Figura 38), esto se debe al hospedero elegido *E. coli* Rosetta, como sabemos no presenta producción de metabolitos secundarios, además que se encuentra modificado para ser deficiente en proteasas. Por ello el cambio en el tiempo de retención con respecto a la inducción de *S. lividans* TK24, ya que esta presenta interacción con los metabolitos producidos intrínsecamente por el estreptomiceto en el medio MYM de cual se indujo, que como se indica en el anexo S1 es un medio enriquecido, lo que limita la migración del péptido en la columna.

Se logró identificar la masa asociada al péptido cargado y ionizado en 4 ocasiones (Figura 39), el cual presenta un patrón específico de proteínas que no se encuentra en ninguno de los controles utilizados, lo cual nos indica que a pesar de que la inducción de las proteínas fue pobre, se logra producir una cantidad pequeña pero detectable, para el espectrómetro de masas. Además al realizar la suma de las especies ionizadas se observa que es igual a la masa teórica total del péptido ciclado (Figura 40).

Purificación de Lass1 proveniente de la traducción del BGC en *S. lividans*.

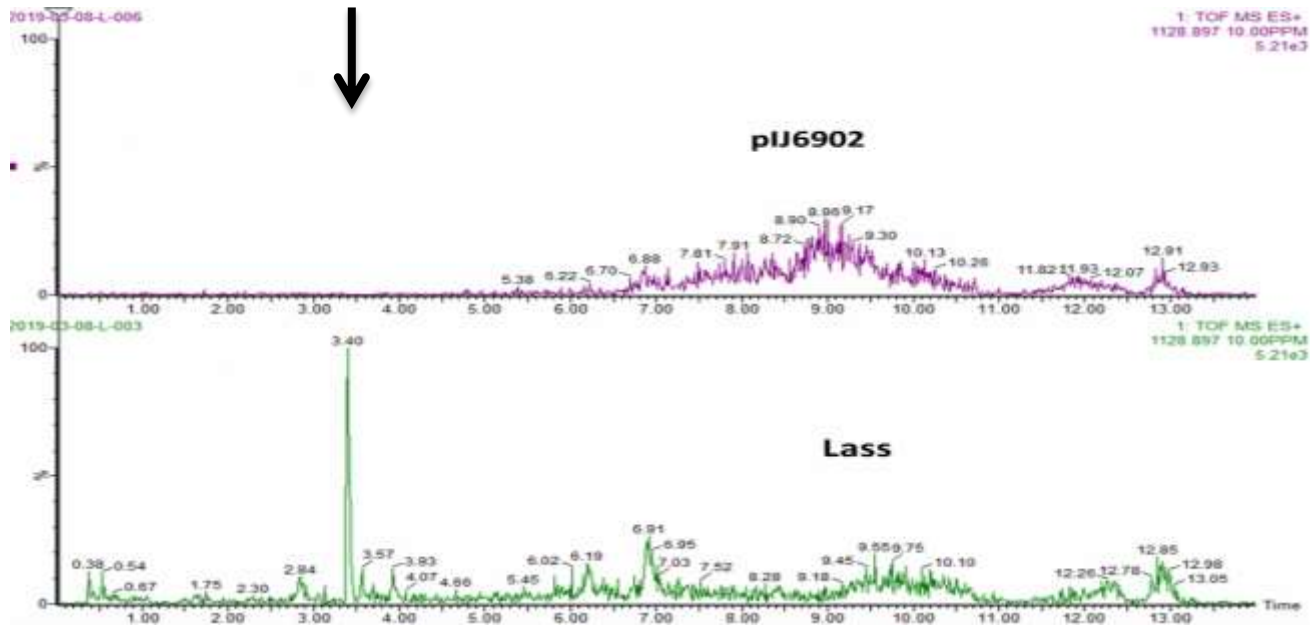


Figura 41. Cromatograma de UPLC- MS asociado a la masa $(M+3H)^{3+}$ y $(M+4H)^{4+}$ del Lasso péptido ciclado (Tabla 9) se indica con una flecha el tiempo de retención donde fueron localizadas (3.4 min). a) Lass 1 extraído con MeOH. b) pIJ6902 (vector vacío) extraído con MeOH como control negativo, provenientes de la traducción de las proteínas del clúster en *S. lividans* TK24.

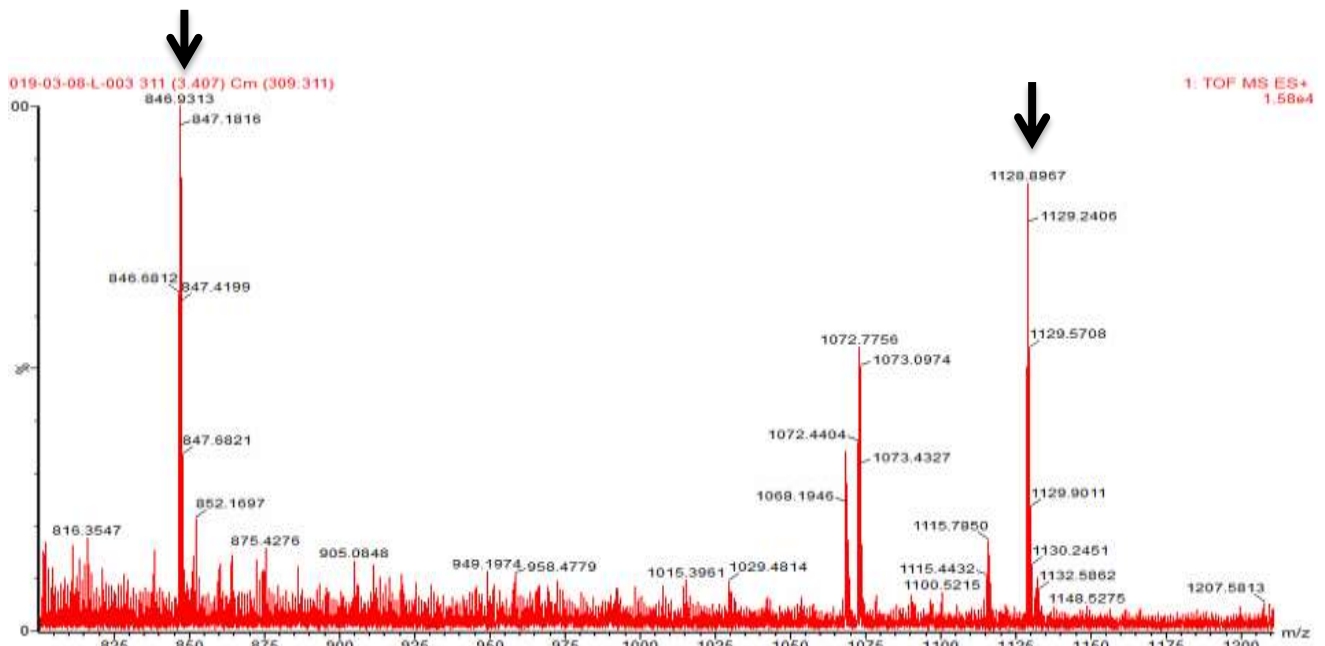


Figura 42. Identificación de las masas asociadas al péptido ciclado en su forma $(M+3H)^{3+}$ y $(M+4H)^{4+}$ las cuales se indican con una flecha (Tabla 9), ambas se encontraron en el pico indicado en la figura 41 provenientes de la traducción de las proteínas del clúster en *S. lividans* TK24.

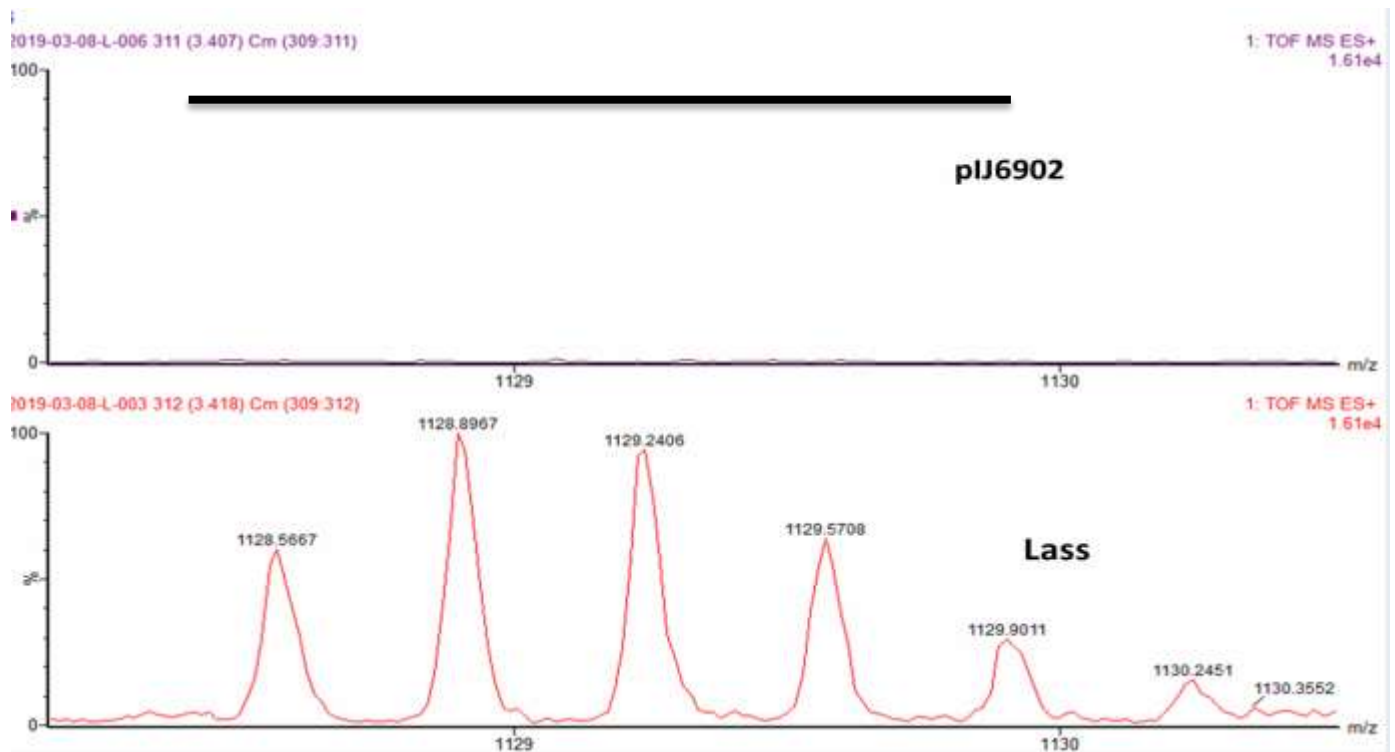


Figura 43. Identificación de la masa asociada al péptido ciclado en su forma $(M+3H)^{3+}$ (Tabla 9) señalada con una línea en el espectro de masas. Se encontró en el pico indicado en la figura 41 proveniente de la traducción de las proteínas del clúster en *S. lividans* TK24, comparándose contra su control pIJ6902, extraído bajo las mismas condiciones.

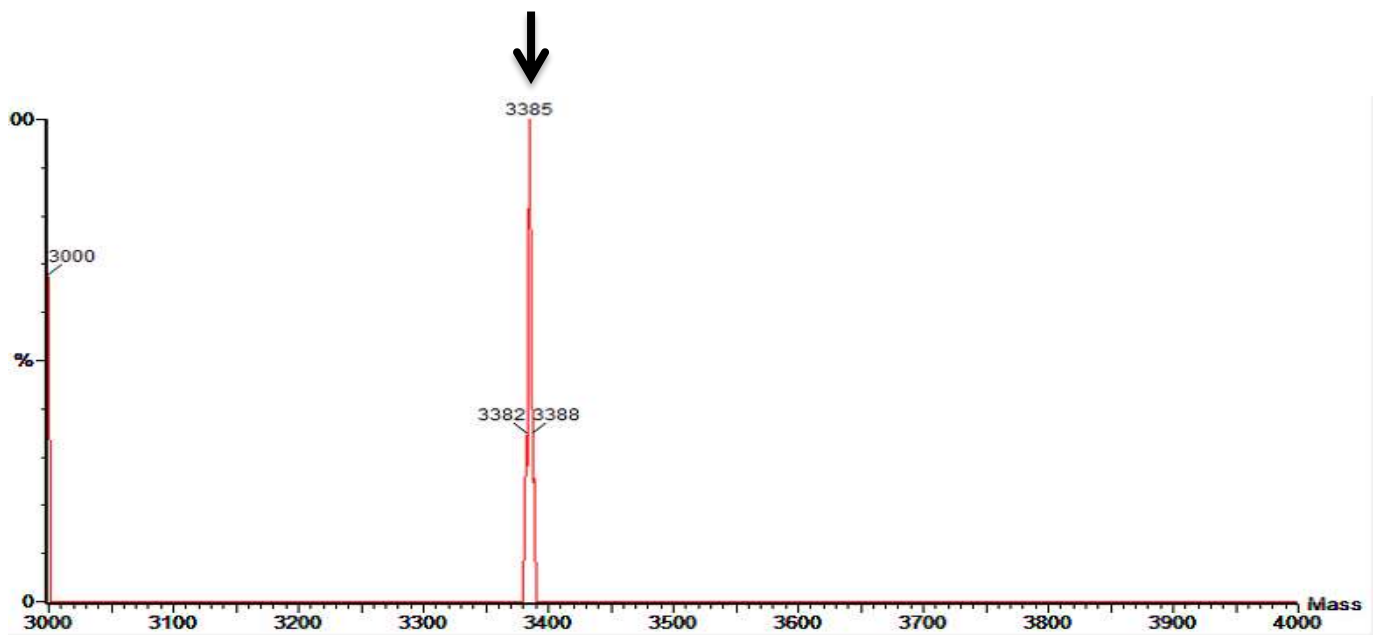


Figura 44. Sumatoria de las 3 ionizaciones del péptido ciclado $(M+3H)^{3+}$ (Tabla 9) proveniente de la traducción de las proteínas del clúster en *S. lividans* TK24, asociada a la ionización descrita en la figura 43, señalado con una flecha se encuentra la sumatoria de la masa total del péptido ciclado 3385 Da.

En este análisis de cromatografía de líquidos asociado a masas se encontraron las masas asociadas al péptido ciclado ionizado en 3^+ y 4^+ (Figura 42) en el mismo tiempo de retención de 3.4 minutos (Figura 41), además de que cada una de ellas presenta picos característicos asociados a péptidos, siendo la diferencia entre cada uno de los picos de 0.33 y 0.25 respectivamente, con estos resultados podemos deducir que se trata del lasso péptido de interés (Figura 43). Además al realizar la suma de las especies ionizadas se observa que es igual a la masa teórica total del péptido ciclado (Figura 44).

Otra de las aportaciones que nos otorga este análisis, es el poder definir la funcionalidad de cada una de las enzimas que están presentes en el clúster, el hecho de encontrar la masa asociada al péptido ciclado, nos habla de que las enzimas LunB y LunC, poseen la función para la cual fueron anotadas, estando involucradas en el corte (LunB) y formación del anillo (LunC). En cambio la enzima LunE, no está presentando actividad ya que no se logra identificar la masa ionizada asociada al péptido ciclado y metilado (Tabla 9), en 1 o 2 de los ácidos aspárticos presentes en la secuencia, por lo tanto se infiere que la isoaspartato O-metiltransferasa se encuentra inactiva (Figura 34).

4) EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL PRODUCTO OBTENIDO

Antibiosis asociada a la traducción del clúster de Lass 1 en *E. coli* Rosetta

Los ensayos de antibiosis realizados no revelaron ninguna inhibición en el crecimiento de las bacterias, por acción del extracto celular obtenido de la traducción heteróloga del lasso péptido en *E. coli* Rosetta, (Figura 45). Lo cual no define que nuestro péptido no presente actividad biológica, solo nos hace inferir que la producción de las proteínas asociadas al clúster como se puede ver en la figura 33 es baja o casi nula en algunas de ellas y puede estar relacionado con el diseño de la construcción del vector como se ha explicado anteriormente, evitando el correcto pegamiento del péptido de interés, o que se esté produciendo en cantidades ínfimas debido a que es tóxico para la bacteria hospedera, por ello será necesario llevar a cabo el mismo ensayo con el extracto obtenido de la inducción del clúster de proteínas de Lass1 proveniente de *S. lividans* TK24.

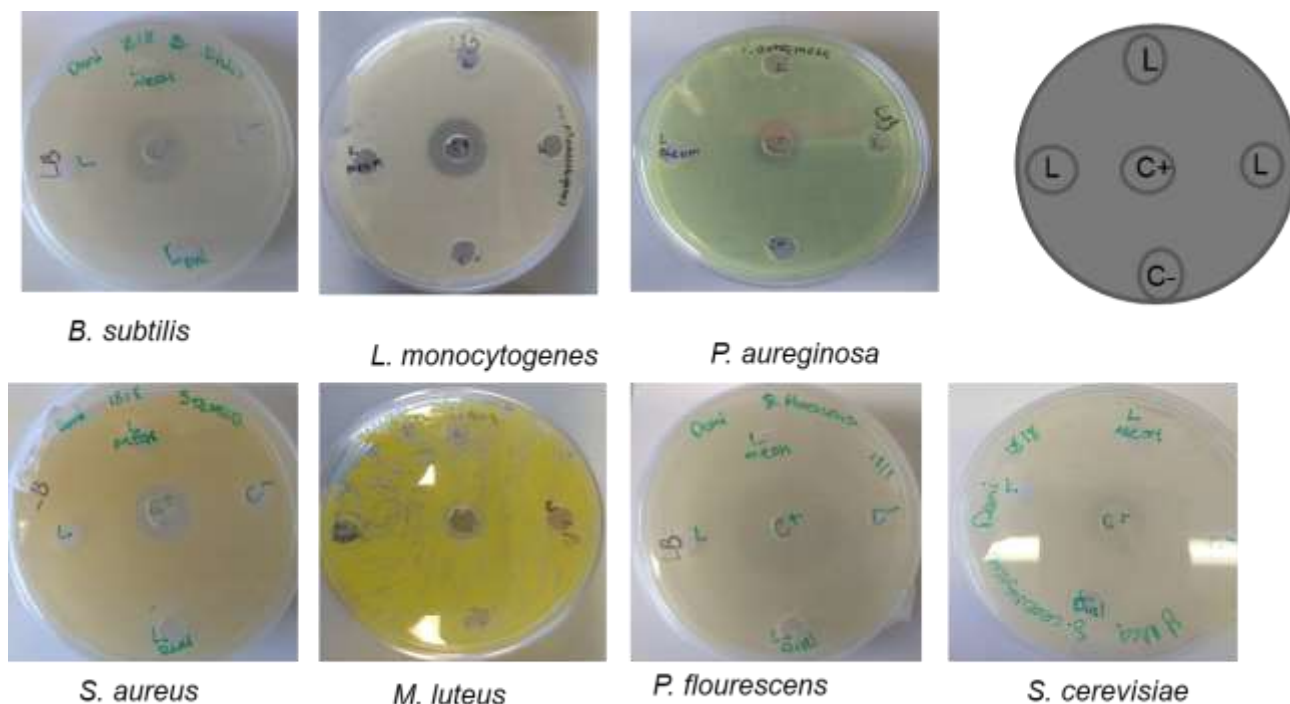


Figura 45. Ensayos de antibiosis frente a bacterias Gram negativas y positivas, patógenas y levaduras por acción del extracto precipitado con metanol proveniente de la inducción de las proteínas asociadas al clúster Lass1 en *E. coli* Rosetta. L Lasso péptido (Muestra), C- pET22b vacío, C+ apramicina 200 µg/mL.

Antibiosis asociada a la traducción del clúster de Lass 1 en *S. lividans* TK24.

Los extractos de *Streptomyces lividans* TK24 probados para la antibiosis fueron en los que se encontraron las masas asociadas a las ionizaciones del péptido ciclado 3 y 4 veces ionizado, y el mismo que se cargó en el gel de Tris-tricina, el cual mostró una abundancia alta en péptidos en comparación con el control (Figura 36).

Se realizó una curva estándar de BSA para determinar la concentración de proteínas totales por el método de Bradford, donde se obtuvo que para pIJ6902 SliTK24 la concentración de proteínas es de 4.3 mg/mL y para Lass1 SliTK24 es de 1.0 mg/mL, lo que nos indica que nuestro control posee una mayor concentración de proteínas totales.

Con lo indicado anteriormente, en estos extractos se obtuvo un halo de inhibición del crecimiento tanto en el control como en la muestra problema, pero se pudo observar y

determinar que el halo de inhibición del crecimiento es mayor en la muestra problema cuando se enfrenta a las bacterias de prueba, aun cuando la concentración de ambos extractos está normalizada para el ensayo de antibiosis dado que se adicionaron 100µL de Lass1 y 20µL de control para tener la misma concentración de proteínas en ambos (Figura 46).

Se procede a realizar una prueba estadística de t - student entre muestras pareada a dos colas, para diferenciar estadísticamente entre ellas. Esta prueba nos arrojó que cuando el extracto purificado se enfrenta a *S. aureus* existe diferencia estadísticamente significativa con un valor p de menos de 0.05 en el tamaño del halo de inhibición. Esto nos indica que existe un componente adicional presente en la muestra problema que genera un halo específico de inhibición en *S. aureus*, el cual estaría asociado a la traducción de clúster biosintético de interés Lass1 (Figura 47) (Ecuación 2).

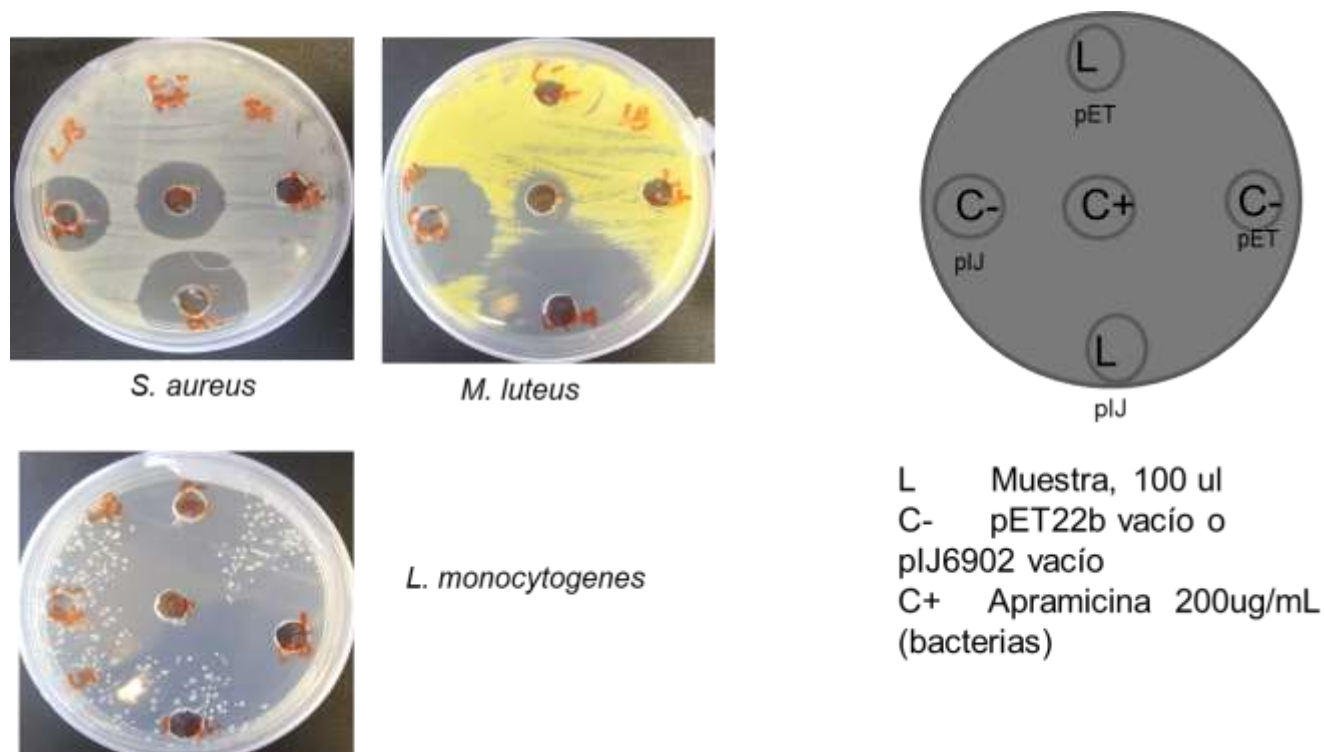


Figura 46. Ensayos de antibiosis del extracto obtenido de la producción de lasso péptido 1 en *S. lividans* TK24 y en *E. coli* Rosetta frente a bacterias Gram-negativas, Gram-positivas y patógenas.

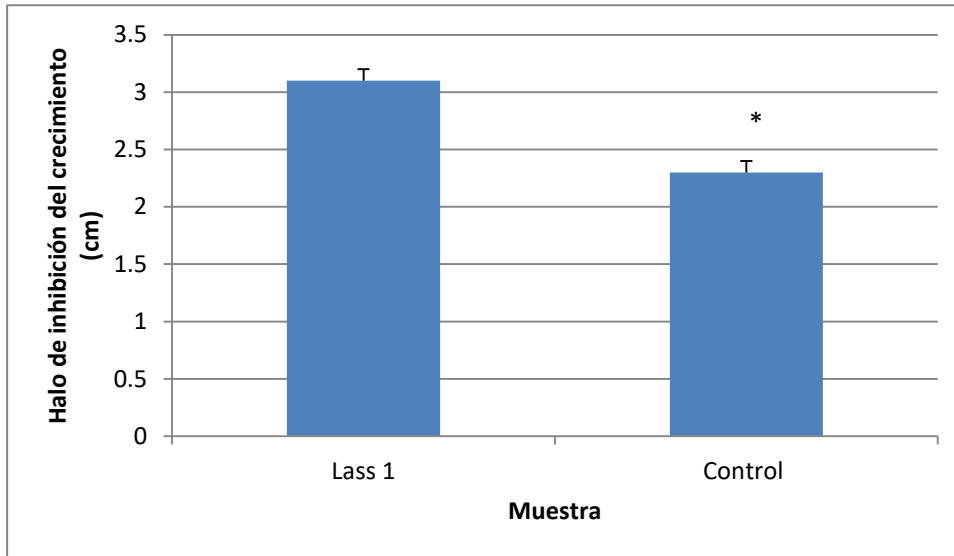


Figura 47. Halos de inhibición asociados al extracto purificado con MeOH, de lass1 y su control provenientes de la inducción en *S. lividans* TK24, frente a *S. aureus*.

$$t = \frac{\overline{\bar{x}_2 - \bar{x}_1}}{\sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right) \left(\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}\right)}} = 0.0152681$$

$$p < 0.05$$

Ecuación 2. Ecuación de t-student (pareada) para determinar si existe diferencia significativa entre el halo de inhibición producido por la muestra en comparación con el producido por el control en el extracto purificado con MeOH, proveniente de la inducción *S. lividans* TK24 frente a *S. aureus*.

En el presente trabajo se identificaron por minería genómica dos lasso péptidos provenientes de la secuencia de SSNF3; ambos son de clase II y se encuentran ubicados en el contig 3 del genoma de estudio, uno de ellos fue de interés debido a que presenta una serina en el sitio de corte y la posibilidad de una o varias metilaciones en la secuencia, lo que genera un interés en determinar el efecto que tendrán estas sobre su procesamiento y actividad. Con ayuda de las herramientas bioinformáticas fue posible anotar las proteínas asociadas al procesamiento de los lasso péptidos, además de determinar cada uno de los dominios proteicos asociados a estas, dando con ello veracidad a la anotación realizada por RAST.

A pesar de que la similitud entre las proteínas del clúster es baja en comparación con la base de datos de proteínas no redundantes de BLAST, al realizar el modelado de las proteínas, se encontraron como templados proteínas que nos corroboran que la anotación generada por RAST, ya que realmente correlacionan con la función esperada para cada proteína. Hasta el momento no existen proteínas cristalizadas provenientes clústeres biosintéticos que procesen lasso péptidos, debido a esto no se logró modelar frente a proteínas totalmente homólogas.

Se determina que la exactitud con la que el programa Phyre2 genera modelados proteicos es confiable, dado que elige templados con dominios similares, además de similitud en cadena primaria para que propiedades físicas y químicas de los aminoácidos sean similares, por lo cual la cobertura con la que trabaja es alta y por consiguiente la distribución en el espacio, la estructura secundaria asociada a estos aminoácidos y su plegamiento genera un porcentaje de confianza alto.

Se realizaron dos construcciones, para la producción de las proteínas del clúster interés una en *E. coli* Rosetta y otra en *Streptomyces lividans* TK24, de esta última se logró caracterizar la actividad biológica de lasso péptido e identificar dos de sus ionizaciones mediante UPLC-MS.

Con los ensayos realizados se determinó que a pesar de que el lasso péptido no cuenta con la treonina conservada cuyo papel es el reconocimiento del sitio de corte; la enzima LunB que es la encargada de realizar el corte, logra reconocer el sitio y llevar a cabo su función

proteolítica. Lo anterior corresponde a la figura 42 donde se observan las ionizaciones asociadas al lasso péptido en su forma ciclada (Tabla 9).

En el análisis por masas no se logró localizar la masa asociada al lasso péptido metilado (Tabla 9), lo que nos indica que la enzima LunE (isoaspartato-o-metiltransferasa) no es funcional, a pesar de ello la actividad biológica no se ve eliminada (Figura 34).

La poca traducción de las proteínas asociadas al clúster de lass1 en la inducción en *E. coli* Rosetta, se debe a varios factores. Al provenir el clúster del genoma de SSNF3, este presenta un uso de codones muy distinto al utilizado por *E. coli*. Para evitar este problema se utilizó el huésped de traducción ya mencionado, el cual se encuentra cargado con tRNAs raros para la traducción de secuencias filogenéticamente poco relacionadas con *E. coli* (anexo S11); pese a esto dicha bacteria no cuenta con el tRNA que se asocia al inicio de la traducción en *Streptomyces* (GUG), que funge en el como una metionina (AUG), por ello se infiere que este es uno de los factores de la baja producción del péptido lasso en *E. coli*.

Además de ello, otro factor por el cual no hay producción es que los genes dentro de un hospedero de diferente especie pueden no transcribirse de manera polisistémica y que por lo tanto que sea necesario la introducción de un promotor específico por cada gen; adicionalmente se podría reemplazar la región intergénica entre el gen A y gen C con un terminador λt_0 , e introducir la secuencia del promotor mcjBDC de la microcina J25 de *E. coli* AY25. Como última modificación podría ser la introducción de sitios de unión ribosomal nativos de *E. coli* (RBS) frente al gen B y gen C para que los ribosomas del hospedero no tengan problema para reconocerlos como genes propios (Martin-Gómez *et al.*, 2018).

A partir de bacterias endófitas se han expresado algunos clústeres biosintéticos en *E. coli* Rosetta, tales como la champamicina una bacteriocina de tipo 3 (peptidoglucano hidrolasa) proveniente del genoma de *Streptomyces champavatti* L06, la cual tiene actividad antimicrobiana, dicha bacteriocina presenta un péptido señal el cual no se escinde debido a que las proteasas activas en *E. coli* no reconocen esta señal, y por lo tanto queda atrapada en

el espacio periplásmico, complicando la purificación y disminuyendo la actividad biológica (Vázquez-Hernández M, 2017).

El ejemplo anterior y los mencionados en Kane, 1995 y Nakashima *et al.* 2005, nos señalan las múltiples dificultades para la producción de proteínas recombinantes provenientes de microorganismos filogenéticamente no relacionados con *E. coli*, tales como los problemas para secretar proteínas debido al nulo reconocimiento del péptido señal. Por lo tanto se determina que *E. coli* no representa la mejor alternativa para la expresión de lasso péptidos.

En cambio cuando se realizó la traducción de proteínas en *S. lividans* TK24, estas fueron mayormente observables en los geles tanto Tricina–PAGE y SDS-PAGE, y fácilmente identificables en el espectro de masas, lo cual es debido a la cercanía filogenética que presenta esta bacteria en comparación con SSNF3; por lo tanto la maquinaria utilizada, los precursores e inductores necesarios para la producción de este péptido se encontraban disponibles; además de que el medio en el que se creció es rico, lo que propicia un ambiente apto para la propagación de la bacteria y su óptimo crecimiento.

Se determinó la concentración molar de las proteínas probadas en el ensayo de antibiosis provenientes del extracto obtenido de la inducción del clúster del Lasso péptido en *Streptomyces lividans* TK24, la cual fue de 295 μM . En comparación con lo reportado para otros lasso péptidos, esa sería una concentración alta para lograr la inhibición del crecimiento de *S. aureus*, esto se puede deber a que es un extracto semipurificado de los péptidos de dicha inducción. Una posible solución a este problema podría ser la obtención de la fracción asociada al tiempo de retención donde migra el lasso péptido en una cromatografía de líquidos de alta resolución, para así comprobar la concentración y probar la actividad de esta fracción, esto nos disminuiría considerablemente la concentración molar necesaria para obtener un efecto antagonista frente a *S. aureus*.

11 CONCLUSIONES

- Aplicando un enfoque de minería genómica, fueron identificados 3 clústeres potenciales para la síntesis de lasso peptidos en *Streptomyces scabrisporus* NF3.
- Se identificó mediante ULPC-MS la presencia del lasso peptido I en su forma ciclada (M+4H)⁴⁺ proveniente de la construcción en *E. coli* Rosetta y en su forma ciclada (M+3H)³⁺ y (M+4H)⁴⁺ proveniente de la construcción en *S. lividans* TK24.
- Mediante la aplicación de UPLC-MS, a partir de ésta construcción, se detectó la presencia del lasso peptido I en su forma ciclada y metilada en un aspártico. Sorpresivamente, este es el primer lasso peptido que presenta un serina en lugar de la treonina conservada en el sitio de corte.
- Se le identificó actividad antimicrobiana estadísticamente significativa frente a *S. aureus* al extracto celular purificado proveniente de la inducción en *S. lividans* TK24.

12 PERSPECTIVAS

- Realizar pruebas de antibiosis frente a un panel más amplio de bacterias multiresistentes.
- Realizar pruebas de toxicidad celular del lasso péptido obtenido.
- Generar una caracterización estructural del lasso péptido obtenido de la inducción en *Streptomyces lividans* TK24, mediante RMN.
- Traducción homóloga de lasso péptidos, con identificación por UPLC-MS.
- Producir el lasso péptido 2 en los hospederos heterólogos disponibles en el laboratorio, caracterizando su actividad biológica y estructura.

13 REFERENCIAS

- Aminov, R. I. (2010). A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in Microbiology*, 1(DEC), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00134>
- Arnison, P. G., Bibb, M. J., Bierbaum, G., Bowers, A. A., Bugni, T. S., Bulaj, G., Van Der Donk, W. A. (2013). Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: Overview and recommendations for a universal nomenclature. *Natural Product Reports*, 30(1), 108–160. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511674686.009>
- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., De Castro, E., Stockinger, H. (2012). ExpASY: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Research*, 40(W1), 597–603. <https://doi.org/10.1093/nar/gks400>
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1–43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15>
- Berdy J. (2015). Microorganisms producing antibiotics. In: Sanchez S, Demain AL (Eds.), *Antibiotics: Current Innovations and Future Trends*, Caister Academic Press, Norfolk, UK. , pp. 49-64.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. May 7;72:248-54.
- Brunelle, J. L. & Green, R, (2014) Coomassie Blue Staining, J Lorsch (Ed.) *Methods in Enzymology*, Academic Press, 541, pp. 161-167
- Ceapă, C. D., Vázquez-Hernández, M., **Rodríguez-Luna, S. D.**, Vázquez, A. P. C., Suárez, V. J., Rodríguez-Sanoja, R., Sánchez, S. (2018). Genome mining of *Streptomyces scabrisporus*

NF3 reveals symbiotic features including genes related to plant interactions. *PLoS ONE*, 13(2), 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192618>

Challis GL and Rutledge PJ (2015). Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters. *Nature Rev Microbiol.* 13: 509-523

Chin, C., Alexander, D. H., Marks, P., Klammer, A. A., Drake J., Heiner, C., Clum, A., Copeland A., Huddleston, J., Eichler, E. E. Turner S. W. & Korlach, J., (2013) Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data. *Nature Methods* 10, 563–569

Culp, E., & Wright, G. D. (2017). Bacterial proteases, untapped antimicrobial drug targets. *Journal of Antibiotics*, 70(4), 366–377. <https://doi.org/10.1038/ja.2016.138>

de Kraker, M. E. A., Stewardson, A. J., & Harbarth, S. (2016). Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050? *PLoS Medicine*, 13(11), 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002184>

de Lima Procópio, R. E., da Silva, I. R., Martins, M. K., de Azevedo, J. L., & de Araújo, J. M. (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.08.014>

Demain AL, Sánchez S. The need for new antibiotics. In: Sanchez, S., Demain, A.L. (Eds.), (2015) Antibiotics: Current Innovations and Future Trends, *Caister Academic Press*, Norfolk, UK., pp. 65-82.

Duquesne, S., Destoumieux-Garzón, D., Peduzzi, J., & Rebuffat, S. (2007). Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Natural Product Reports*, 24(4), 708–734. <https://doi.org/10.1039/b516237h>

Duquesne, S., Destoumieux-Garzón, D., Zirah, S., Goulard, C., Peduzzi, J., & Rebuffat, S. (2007). Two Enzymes Catalyze the Maturation of a Lasso Peptide in *Escherichia coli*. *Chemistry and Biology*, 14(7), 793–803. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2007.06.004>

Durfee T, Nelson R, Baldwin S, Plunkett G 3rd, Burland V, Mau B, Petrosino JF, Qin X, Muzny DM, Ayele M, Gibbs RA, Csörgo B, Pósfai G, Weinstock GM, Blattner FR. (2008) The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. *J Bacteriol.*190(7):2597-606.

Finn, R. D., Coghill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Mistry, J., Mitchell, A. L., Bateman, A. (2016). The Pfam protein families database: Towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D279–D285. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1344>

Fischbach MA, Medema MH. (2015) Computational approaches to natural product Discovery. *Nature Chemical Biology*; 11: 639-648

Gavrish, E., Sit, C. S., Cao, S., Kandrór, O., Spoering, A., Peoples, A., Lewis, K. (2014). Lassomycin, a ribosomally synthesized cyclic peptide, kills mycobacterium tuberculosis by targeting the ATP-dependent protease ClpC1P1P2. *Chemistry and Biology*, 21(4), 509–518. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.01.014>

Gomez-Escribano, J. P., & Bibb, M. J. (2014). Heterologous expression of natural product biosynthetic gene clusters in *Streptomyces coelicolor*: From genome mining to manipulation of biosynthetic pathways. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1348-5>

Gouda, S., Das, G., Sen, S. K., Shin, H. S., & Patra, J. K. (2016). Endophytes: A treasure house of bioactive compounds of medicinal importance. *Frontiers in Microbiology*, 7(SEP), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01538>

Grodberg J and Dunn JJ.(1988) ompT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J Bacteriol.* 170(3):1245-53.

Gupta, A., Bedre, R., Thapa, S. S., Sabrin, A., Wang, G., Dassanayake, M., & Grove, A. (2017). Global Awakening of Cryptic Biosynthetic Gene Clusters in *Burkholderia thailandensis*. *ACS Chemical Biology*, 12(12), 3012–3021. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b0068>

Harvey, C. J. B., Tang, M., Schlecht, U., Horecka, J., Fischer, C. R., Lin, H., Hillenmeyer, M. E. (2018). HEx : A heterologous expression platform for the discovery of fungal natural products, *Sci. Adv.* (4) 1-14.

Hegemann, J. D., Schwalen, C. J., Mitchell, D. A., & Van der Donk, W. A. (2018). Elucidation of the roles of conserved residues in the biosynthesis of the lasso peptide paeninodin. *Chemical Communications*, 54(65), 9007–9010. <https://doi.org/10.1039/c8cc04411b>

Hegemann, J. D., Zimmermann, M., Xie, X., & Marahiel, M. A. (2015). Lasso Peptides: An Intriguing Class of Bacterial Natural Products. *Accounts of Chemical Research*, 48(7), 1909–1919. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00156>

Hegemann, J. D., Zimmermann, M., Xie, X., & Marahiel, M. A. (2013). Caulosegnins I-III: A highly diverse group of lasso peptides derived from a single biosynthetic gene cluster. *Journal of the American Chemical Society*, 135(1), 210–222. <https://doi.org/10.1021/ja308173b>

Hegemann, J. D., Zimmermann, M., Zhu, S., Klug, D., & Marahiel, M. A. (2013). Lasso peptides from proteobacteria: Genome mining employing heterologous expression and mass spectrometry. *Biopolymers*, 100(5), 527–542. <https://doi.org/10.1002/bip.22326>

Huang, J., Shi, J., Molle, V., Sohlberg, B., Weaver, D., Bibb, M. J., Cohen, S. N. (2005). Cross-regulation among disparate antibiotic biosynthetic pathways of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*, 58(5), 1276–1287. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04879.x>

Ikeda, H., Shin-Ya, K., & 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), 233–250. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1327-x>

Jagusztyn-Krynicka, E. K., & Wszyńska, A. (2008). The decline of antibiotic era - New approaches for antibacterial drug discovery. *Polish Journal of Microbiology*, 57(2), 91–98.

Kane, J. F. (1995). Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 6(5), 494–500. [https://doi.org/10.1016/0958-1669\(95\)80082-4](https://doi.org/10.1016/0958-1669(95)80082-4)

Kawashima H, Horii T, Ogawa T, Ogawa H. (1984) Functional domains of *Escherichia coli* recA protein deduced from the mutational sites in the gene. *Mol Gen Genet.*;193(2):288-92.

Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 10(6), 845–858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>

Knappe, T. A., Manzenrieder, F., Mas-Moruno, C., Linne, U., Sasse, F., Kessler, H., Marahiel, M. A. (2011). Introducing lasso peptides as molecular scaffolds for drug design: Engineering of an integrin antagonist. *Angewandte Chemie - International Edition*, 50(37), 8714–8717. <https://doi.org/10.1002/anie.201102190>

Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, Aug 15;227(5259):680-5.

Lanskin, A. I., (2004) *Advances in applied microbiology*. Elsevier, 56, 65-83.

Lewis, K. (2013). Platforms for antibiotic discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(5), 371–387. <https://doi.org/10.1038/nrd3975>

Li, Y., Ducasse, R., Zirah, S., Blond, A., Goulard, C., Lescop, E., Rebuffat, S. (2015). Characterization of Sviceucin from *Streptomyces* Provides Insight into Enzyme Exchangeability and Disulfide Bond Formation in Lasso Peptides. *ACS Chemical Biology*, 10(11), 2641–2649. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00584>

Li, Y., Zirah, S., Rebuffat, S. (2015). *Lasso Peptides: Bacterial Strategies to Make and Maintain Bioactive Entangled Scaffold*, Springer, 54.

Magouras, I., Carmo, L. P., Stärk, K., & Schüpbach-Regula, G. (2017). Antimicrobial Usage and - Resistance in Livestock: Where Should We Focus?. *Frontiers in veterinary science*, 4, 148. [doi:10.3389/fvets.2017.00148](https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00148)

Maksimov, M. O., & Link, A. J. (2014). Prospecting genomes for lasso peptides. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(2), 333–344. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1357-4>

Maksimov, M. O., Pan, S. J., & James Link, A. (2012). Lasso peptides: structure, function, biosynthesis, and engineering. *Nat Prod Rep*, 29(9), 996–1006. <https://doi.org/10.1039/c2np20070h>

Maldonado-Carmona N, Vázquez-Hernández M, Patiño Chavéz OJ, **Rodríguez-Luna SD**, Jiménez Rodríguez O, Sanchez S, Ceapă CD. (2019) Impact of ~omics in the detection and validation of potential anti-infective drugs. *Current Opinion in Pharmacology*, 48 1-7

Martin-Gómez, H., Linne, U., Albericio, F., Tulla-Puche, J., & Hegemann, J. D. (2018). Investigation of the Biosynthesis of the Lasso Peptide Chaxapeptin Using an E. coli-Based Production System. *Journal of Natural Products*, 81(9), 2050–2056. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00392>

Martínez-Klimova E, Rodríguez-Peña K and Sánchez S (2017) Endophytes as sources of antibiotics. *Biochem Pharmacol*. 134: 1-17.

McNair, C. R., Stokes, J. M., Carfrae, L. A., Fiebig-Comyn, A. A., Coombes, B. K., Mulvey, M. R., & Brown, E. D. (2018). Overcoming mcr-1 mediated colistin resistance with colistin in combination with other antibiotics. *Nature Communications*, 9(1).

Medema, M. H., Blin, K., Cimermancic, P., De Jager, V., Zakrzewski, P., Fischbach, M. A., Breitling, R. (2011). AntiSMASH: Rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Research*, 39. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr466>

Miller, M. T., Gerratana, B., Stapon, A., Townsend, C. A., & Rosenzweig, A. C. (2003). Crystal Structure of Carbapenam Synthetase (CarA). *Journal of Biological Chemistry*, 278(42), 40996–41002. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307901200>

Mukhopadhyay J, Sineva E, Knight J, Levy RM, Ebricht RH. (2004) Antibacterial Peptide Microcin J25 (MCCJ25) Inhibits Transcription by Binding within, and Obstructing, the RNA Polymerase Secondary Channel, *Mol Cell*. 14(6): 739–751.

Nah, H., Pyeon, H., Kang, S., Choi, S., Kim, E., & Kim, E. (2017). Cloning and Heterologous Expression of a Large-sized Natural Product Biosynthetic Gene Clúster in *Streptomyces* Species, *Frontiers in Microbiology* 394(8): 1-10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00394>

Nakashima, N., Mitani, Y., & Tamura, T. (2005). Actinomycetes as host cells for production of recombinant proteins. *Microbial Cell Factories*, 4, 1–5. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-4-7>

Palmer, I, & Wingfield P. T. (2012) Preparation and Extraction of Insoluble (Inclusion-Body) Proteins from *Escherichia coli* *Current protocols* 70 (1) 1-10.

Ping X, Takahashi Y, Seino A, Iwai Y, Omura S.(2004) *Streptomyces scabrisporus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 54(Pt 2):577-81.

Rodríguez-Peña K, Macías-Rubalcava ML, Rocha-Zavaleta L, Trenado-Uribe M, Rodríguez-Sanoja R, Sanchez S. (2018) *Streptomyces scabrisporus*, an endophyte isolated from *Amphipterygium adstringens* as producer of an anthracycline active against different cancer cell lines. *Global Drugs Therap*. 3(5):1-10. doi: 10.15761/GDT.1000158

Rückert, C., Albersmeier, A., Busche, T., Jaenicke, S., Winkler, A., Fridjónsson, Ó. H., Kalinowski, J. (2015). Complete genome sequence of *Streptomyces lividans* TK24. *Journal of Biotechnology*, 199, 21–22. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.02.004>

Shah AM, Wani A, Qazi PH, Rehman SU, Mushtaq S, Ali SA, Hussain A, Shah A, Qazi AK, Makhdoomi US, Hamid A, Kumar A. (2016) Isolation and characterization of alborixin from *Streptomyces scabrisporus*: A potent cytotoxic agent against human colon (HCT-116) cancer cells. *Chem Biol Interact*. 25;256:198-208.

Schägger H. (2006) Tricine-SDS-PAGE *Nature Protocols* 1, 16–22.

Skinner, M. M., Puvathingal, J. M., Walter, R. L., & Friedman, A. M. (2000). Crystal structure of protein isoaspartyl methyltransferase - A catalyst for protein repair. *Structure*, 8(11), 1189–1201. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)00522-0](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00522-0)

Skinnider MA, Dejong CA, Rees PN, Johnston CW, Li H, Webster ALH, Wyatt MA and Magarvey NA (2015) Genomes to natural products prediction informatics for secondary metabolomes (PRISM). *Nucleic Acids Res*, 43:9645-9662.

Strobel (2003) Endophytes as sources of bioactive products. *Microb. Infect.* 5: 535-544.

Studier, F. W., & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, 189(1), 113–130.

Tietz, J. I., Schwalen, C. J., Patel, P. S., Maxson, T., Blair, P. M., Tai, H. C., Mitchell, D. A. (2017). A new genome-mining tool redefines the lasso peptide biosynthetic landscape. *Nature Chemical Biology*, 13(5), 470–478. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2319>

Van Duin, D., & Paterson, D. L. (2016). Multidrug-Resistant Bacteria in the Community: Trends and Lessons Learned. *Infectious Disease Clinics of North America*. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.004>

Van Heel AJ, de Jong A, Montalbán-López M, Kok J and Kuipers OP (2013) BAGEL3: automated identification of genes encoding bacteriocins and (non)bactericidal posttranslationally modified peptides. *Nucleic Acids Res*. 41:1–53.

Vázquez-Hernández M. (2017) Minería genómica de una cepa de *Streptomyces sp.* aislada del cuachalalate: Alternativa para la búsqueda de nuevos compuestos con actividad farmacéutica. (Tesis de maestría) UNAM. México

Vázquez-Hernández M, Ceapă, CD, **Rodríguez-Luna SD**, Rodríguez-Sanoja R, Sánchez S (2017) Draft genome sequence of *Streptomyces scabrisporus* NF3, an endophyte isolated from *Amphipterygium adstringens*. *Genome Announc.* 5:e00267-17

Ventola, C. L. (2015). The Antibiotic Resistance Crisis. *P&T*, 40(4), 278–283. <https://doi.org/10.5796/electrochemistry.82.749>

Wattam AR, Davis JJ, Assaf R, Boisvert S, Brettin T, Bun C, Conrad N, Dietrich EM, Disz T, Gabbard JL, Gerdes S, Henry CS, Kenyon RW, Machi D, Mao C, Nordberg EK, Olsen GJ, Murphy-Olson DE, Olson R, Overbeek R, Parrello B, Pusch GD, Shukla M, Vonstein V, Warren A, Xia F, Yoo H, Stevens RL.(2017) Improvements to PATRIC, the all-bacterial Bioinformatics Database and Analysis Resource Center. *Nucleic Acids Res.* 4;45(D1):D535-D54

Watve, M. G., Tickoo, R., Jog, M. M., & Bhole, B. D. (2001). How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Archives of Microbiology*, 176(5), 386–390. <https://doi.org/10.1007/s002030100345>

Weber, T., Blin, K., Duddela, S., Krug, D., Kim, H. U., Bruccoleri, R., Medema, M. H. (2015). antiSMASH 3.0-a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic acids research*, 43(W1), W237–W243. doi:10.1093/nar/gkv437

Yang, J. Y., Karr, J. R., Watrous, J. D., & Dorrestein, P. C. (2011). Integrating “-omics” and natural product discovery platforms to investigate metabolic exchange in microbiomes. *Current Opinion in Chemical Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.10.025>

Zerikly, M., & Challis, G. L. (2009). Strategies for the discovery of new natural products by genome mining. *ChemBioChem*, 10(4), 625–633. <https://doi.org/10.1002/cbic.200800389>

Zhu, S., Fage, C. D., Hegemann, J. D., Mielcarek, A., Yan, D., Linne, U., & Marahiel, M. A. (2016). The B1 Protein Guides the Biosynthesis of a Lasso Peptide. *Scientific Reports*, 6(August), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep35604>

Ziemert, N., Alanjary, M., & Weber, T. (2016). The evolution of genome mining in microbes-a review. *Natural Product Reports*, 33(8), 988–1005. <https://doi.org/10.1039/c6np00025h>

Zimmermann, M., Hegemann, J. D., Xie, X., & Marahiel, M. A. (2014). Characterization of caulonodin lasso peptides revealed unprecedented N-terminal residues and a precursor motif

essential for peptide maturation. *Chemical Science*, 5(10), 4032–4043.
<https://doi.org/10.1039/c4sc01428f>

Zwietering M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., van 't Riet, K. (1990) Modeling of the Bacterial Growth Curve, *Appl Env Micro* , 56 (6) 1875-1881;

14 MATERIAL SUPLEMENTARIO

a. ANEXO S1. Medios de cultivo utilizado y soluciones.

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 5.0 g/L

NaCl 10.0 g/L

Triptona de caseína 10.0 g/L

MS

Manitol 10.0 g/L

Harina de soya 10.0 g/L

Agar 10.0 g/L

DNA

Difco nutrient agar 4.0 g/L

MYM

Maltosa 4.0 g/L

Extracto de levadura 4.0 g/L

Extracto de malta 10.0 g/L

Agua destilada 50%

Agua de la llave 50%

Elementos traza (para 35 mL se requieren 70 µL)

2XYT

Triptona 16.0 g/L

Extracto de levadura 10.0 g/L

NaCl 5.0 g/L

Elementos traza

ZnCl₂ 40.0 g/L

FeCl₃ 200.0 g/L

CuCl₂ 10.0 g/L

MnCl₂ 10.0 g/L

Na₂B₄O₇ 10.0 g/L

(NH₄)₆Mo₇O₂₄ 10.0 g/L

SET

Sacarosa 8%

Tris HCl 0.05 M

EDTA 0.05 M pH 8.0

Solución II

SDS 2%

NaOH 0.4 M

Se prepara al momento y primero se agrega en NaOH

Solución III

Acetato de sodio anhidro 3 M

MEDIO M9

Tabla S 1. Medio M9 Para 1 L de medio M9 se añaden 867 mL de agua estéril

Volumen	Componente	Composición	Concentración final
100 mL	Sales de M9 (10X)	Na ₂ HPO ₄	33.7 mM
		KH ₂ PO ₄	22.0 mM
		NaCl	8.55 mM
		NH ₄ Cl	9.35 mM
20 mL	Glucosa (20%)	Glucosa	0.4%
1 mL	1 M MgSO ₄	MgSO ₄	1 mM
0.3 mL	1 M CaCl ₂	CaCl ₂	0.3 mM
1 mL	Biotina (1 mg/mL)	Biotina	1 µg
1 mL	Tiamina (1 mg/mL)	Tiamina	1 µg
100 mL	Ampicilina (100 mg/mL)	Ampicilina	100 µg/mL
100 mL	Cloranfenicol (25 mg/mL)	Cloranfenicol	25 µg/mL

b. ANEXO S2. Aislamiento de DNA genómico de *Streptomyces scabrisporus* 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 8400 g por 10 min a 4°C.
- 6) Desechar el sobrenadante y lavar con 15 mL de sacarosa 10.3%
- 7) Centrifugar a 8400 g por 10 min a 4°C.
- 8) Desechar el sobrenadante y 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 6800 g por 10 min a 4°C.
- 11) Desechar el sobrenadante. Resuspender en 10 mL de sacarosa 10.3% , 200 µL EDTA 0.5 M pH 8.0, 4 mL SDS 10%, 15 mL NaCl 6 M. Incubar por 30 min a 4°C.
- 12) Centrifugar a 10000 rpm por 30 min a 4°C.
- 13) Recuperar el sobrenadante. Añadir 1 volumen de isopropanol. Incubar 1h a temperatura ambiente.
- 14) Centrifugar a 17900 g por 30 min a 4°C.
- 15) Desechar el sobrenadante. Añadir 1 mL de Etanol 70%.
- 16) Centrifugar a 17900 g por 30 min a 4°C.
- 17) Desechar el sobrenadante y dejar secar los tubos.
- 18) Resuspender el pellet en 5 mL de agua tipo 1 estéril.

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

- 19) Agregar un volumen igual de fenol cloroformo (1:1) al tubo.
- 20) Centrifugar a 10000 rpm por 10 min.
- 21) Recuperar la fase acuosa. Agregar un volumen igual de cloroformo
- 22) Centrifugar a 10000 rpm por 10 min.
- 23) Repetir los dos pasos anteriores una vez más.

c. ANEXO S3. Condiciones de reacción para la PCR de amplificación.

Tabla S 2. Condiciones de PCR para lasso péptido I.

Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	2 min
35 ciclos		
Desnaturalización	95°C	15 s
Alineamiento	64°C	30 s
Extensión	68°C	4 min
Extension final	72°C	5 min

e. ANEXO S5. Preparación de células electrocompetentes y electrotransformación

1. A partir de un stock de glicerol inocular 4 mL de células en medio YENB en un tubo de 16 x 150mm, e incubar a 37° C y 300 rpm toda la noche.
2. Inocular 50 mL del medio YENB contenido en un matraz de 500 mL con 0.25-0.5mL del cultivo y crecer a 37°C a 300 rpm.
3. Preparar las centrifugas Sorvall y Eppendorf a 4°C. Pre-enfriar en hielo, las camisas de la centrifuga, el agua, el glicerol al 10% y todos los tubos cónicos y microtubos de 1.5 ml que se requieran.
4. Las células pueden ser cosechadas entre 0.5-0.9 U OD_{600nm}. Antes de cosecharlas, colocar el cultivo en hielo por 15 min, pasar a tubos cónicos de 50 mL y centrifugar a 4 Krpm, durante 10 min a 4°C, decantar para eliminar el medio.
5. Lavar la pastilla con 5 mL de agua fría, centrifugar como en el paso 4, decantar el sobrenadante. Resuspender con micropunta suavemente las células al lavarlas. Hasta este paso es posible decantar completamente, sin que las células se resuspendan.
6. Repetir el lavado de la misma manera con 5 mL de agua fría ó pasar las células a microtubos de 1.5 mL, y centrifugar a 10 Krpm por 1 min a 4°C y decantar.
7. Resuspender la pastilla en un volumen total de 2 mL de glicerol 10% frío, centrifugar como en el paso 4 y eliminar el sobrenadante con punta. Si se centrifuga en microtubo, las células de los 4 tubos se resuspenden en 0.5 mL de glicerol 10% cada uno, centrifugar y eliminar el sobrenadante con punta.
8. Resuspender las células en un solo microtubo con un volumen final de 0.25 mL de glicerol 10% frío. El número de células en suspensión debe ser aproximadamente de $2-4 \times 10^9$ cel/mL.
9. Alicuotar en microtubos de 1.5 mL pre-enfriados con 50 µL de células competentes y colocar en hielo seco hasta que se congelen. Almacenar a -70°C.

f. ANEXO S6. Protocolo para conjugación de *Streptomyces lividans* TK24 con *E. coli* ET12576

- 1.- Prepare células competentes de *E. coli* ET12567 / pUZ8002 cultivadas a 37°C en LB que contenga kanamicina (25 µg / mL) y cloranfenicol (25 µg / mL) para mantener la selección de pUZ8002 y la mutación dam respectivamente.
- 2.- Transforme las células competentes con el vector pIJ6902 ligado con el clúster de interés, y seleccione el plásmido entrante solo con apramicina (50 µg / mL) y carbenicilina (100 µg / mL).
- 3.- Inocule una colonia en 10 mL de LB que contiene apramicina (50 µg / mL), cloranfenicol (25 µg / mL) y kanamicina (50 µg / mL). Crecer durante la noche a 37°C.
- 4.- Inocule 100 µl de cultivo crecido O/N en 10 mL de LB fresco más los antibióticos descritos y crezca durante aproximadamente 4 horas a 37 ° C a una OD_{600nm} de 0.4.
- 5.- Lave las células dos veces con 10 mL de LB para eliminar los antibióticos que podrían inhibir el crecimiento de *Streptomyces* y resuspender en 1 mL de LB
- 6.- Mientras lava las células de *E. coli*, para cada conjugación adicione 10 µl (10⁸) de esporas de *Streptomyces* a 500 µL de medio 2 XYT. Generar un choque de calor a 50 ° C durante 10 min, y luego dejar que se enfríen.
- 7.- Mezcle 0,5 mL de suspensión celular de *E. coli* y 0.5 mL de esporas sometidas a choque térmico y centrifugue brevemente. Deseche la mayor parte del sobrenadante, luego resuspenda en el sedimento con 50 µl de líquido residual.
- 8.- Realice una serie de dilución de 10⁻¹ a 10⁻⁴ en cada paso en un total de 500 µl de agua.
- 9.- Coloque en placa 500 µL de cada dilución en agar MS + MgCl₂ 10 mM (sin antibióticos) e incube a 30 ° C durante 16-20 h.

10. Recubra la placa con 1 mL de agua que contenga 0.5 mg de ácido nalidíxico (20 µl de un stock de 25 mg / mL) que mata selectivamente a *E. coli* y 1,25 mg de apramicina (25 µl de un stock de 50 mg / mL). Continuar la incubación a 30 ° C.

11. Se generara una placa de réplica de cada placa de agar MS con colonias individuales en placas de DNA que contienen ácido nalidíxico (25 µg / mL) y apramicina (50 µg / mL) con y sin kanamicina (50 µg / mL).

12. Las clonas resistente a apramicina se recogen de las placas de DNA y se estrían colonias individuales en agar MS (promueve la esporulación) que contiene ácido nalidíxico (25 µg / mL) y apramicina (50 µg / mL).

g. ANEXO S7. Protocolo de extracción de plásmido.

1. Picar con la punta de un palillo estéril una colonia de bacterias que contenga un plásmido que confiera resistencia a un antibiótico, inocular en 3 mL de medio LB más el antibiótico correspondiente e incubar a 37°C toda la noche.
2. Alicuotar en microtubo, 1.5 mL del cultivo y centrifugar 1 minuto a 18000g a temperatura ambiente y eliminar el sobrenadante (hasta terminarse los 3mL de cultivo)
3. Resuspender el pellet en 150 μ L solución SET fría + 5 μ L de ARNasa, agitando vigorosamente por vortex.
4. Agregar 350 μ L de la solución II y mezclar por inversión.
5. Agregar 250 μ L de solución III fría, mezclar por inversión.
6. Centrifugar 5 min a 18000g a temperatura ambiente.
7. Recuperar el sobrenadante por decantación en un nuevo tubo.
8. Agregar 650 μ L de isopropanol frío al tubo con el sobrenadante, agitar por inversión.
9. Centrifugar a 18000g por 5 min, eliminar el sobrenadante por decantación.
10. Agregar 1 mL de etanol al 70%, vortex.
11. Centrifugar a 18000g por 5 min, eliminar el sobrenadante por decantación.
12. Secar la pastilla en un concentrador al vacío a temperatura ambiente por 5 min.
13. Resuspender el pellet en 50 μ L de agua tibia.

h. ANEXO S8. Protocolo de sonicación para células de *E. coli* Rosetta y *S. lividans* TK24.

- 1) Separar en dos fracciones el pellet obtenido.
- 2) Resuspender una fracción de células en cuanto baste de MeOH y otra fracción en buffer TES.
- 3) Sonicar 30 s a 60 de amplitud, dejar reposar en hielo 1 min, repetir 3 veces.
- 4) Centrifugar a 5000 rpm por 10 min a 4°C.
- 5) Recuperar el sobrenadante en un tubo y se adiciona 500 µL de MeOH o buffer TES.
- 6) Resuspender el pellet en 500 µL MeOH o buffer TES, dar un vortex.
- 7) Sonicar 40 s a 60 de amplitud, se deja reposar en hielo 1 minuto, repetir 3 veces.
- 8) Repetir pasos 3 y 4.
- 9) Resuspender el pellet obtenido con 500 µL de MeOH o buffer TES.

i. ANEXO S9. Cebadores del clúster para verificación y secuenciación.

Tabla S 3. Cebadores internos del clúster para verificación*.

Nombre	Secuencia	Tm
SSK13_Lass1_CC_F	TGGATCGATCAGGGCCTCGA	63°C
SSK13_Lass1_CC_R	ACGCGGGTGAACAAGTCGAT	64°C

*Generan un fragmento de 1893pb.

Tabla S 4. Cebadores para secuenciación**.

Nombre	Secuencia	Tm
SSK13_Lass1_CC_R2	GTTCGACACCCAACAGGCGG	61°C
SSK13_Lass1_CC_F2	TTGGGTGTGCGAACTGTGGCT	61°C

**Hacen par con los cebadores forward y reverse de cada uno de los clústeres, encontrándose estos en el centro del clúster.

j. ANEXO S10. Soluciones para SDS- PAGE y Mini-PROTEAN® Tris-Tricina.

SDS-PAGE

10x Buffer de corrida (2 L final)

Glicina 288 g

Tris- HCl 60 g

SDS 20 g

4x Buffer Separador (1 L final)

1.5 M Tris- HCl 182.1 g

0.12 M NaCl 7.0128 g

8 mM EDTA 16 mL de 0.5 M stock (pH 8)

→ ajustar pH a 8.8

0.4 % SDS 4 g

4x Buffer Concentrador (0.5 L final)

0.5 M Tris 30.35 g

0.12 M NaCl 3.5064 g

8 mM EDTA 8 mL de un stock de 0.5 M (pH 8)

→ ajustar a pH 6.8

0.4 % SDS 2 g

2x Buffer de carga (50 mL final)

1 M Tris- HCl pH 6.8 6.25 mL (125 mM)

20% SDS stock 10 mL (4 %)

Glicerol 10 mL (20 %)

2-mercaptoetanol 5 mL (10%)

Azul de Bromofenol 5 mg (0.01 %)

Tinción de Coomassie

50% metanol

10% ácido acético

0.1 Azul de Coomassie

Solución para desteñir

50% metanol

10% ácido acético

Gel de poliacrilamida 10% (2 geles)

Gel separador

H₂O 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% 0.1 mL

TEMED 5 μ L

Gel concentrador

H₂O 2.5 mL

Acilamida 30% 0.53 mL

Tris pH 6.8 2.5 M 1.0 mL

SDS 10% 0.4 mL

APS 10% 40 μ L

TEMED 5 μ L

Mini-PROTEAN® TRIS TRICINA

10x Buffer de corrida (1 L final)

Tricina 179.2 g

Tris- HCl 121.1 g

SDS 10 g

2x Buffer de carga (30 mL final)

1 M Tris- HCl pH 6.8 6.0 mL (200 mM)

10 % SDS stock 6 mL (2%)

Glicerol 12 mL (40%)

Azul de Coomasie 12 mg (0.04%)

Adicionar β -mercaptoetanol 20 μ L en 980 μ L antes de usar.

Solución de fijación

10% ácido acético

Tinción de Coomassie

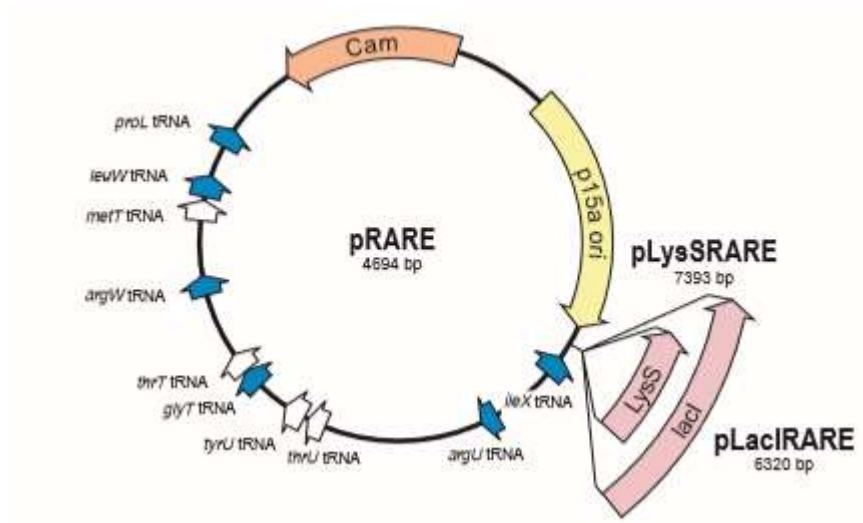
10% ácido acético

0.025 %(m/V) Azul de Coomassie

Solución para desteñir

10% ácido acético

k. ANEXO S11. Vector p RARE.



Vector asociado al hospedero de traducción *E. coli* Rosetta cargado con tRNAs raros para la traducción en *E. coli*.