

“BÚSQUEDA DE NUEVAS ENZIMAS HALOGENASAS EN CEPAS NATIVAS DE *Streptomyces*”

Tesis de la Licenciatura en Bioquímica

Florencia Cavallaro

Tutores: Dres. César Iglesias, Agustina Vila y Victoria Giorgi

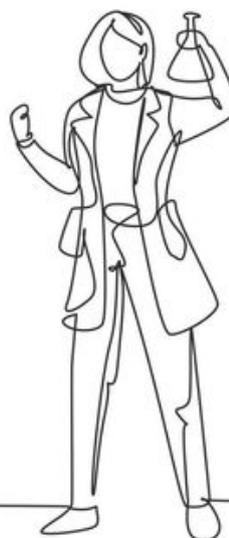
Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones

Departamento de Biociencias y Departamento de Química Orgánica

Facultad de Química, Universidad de la República

Montevideo – Uruguay

2024



Que el aprendizaje siempre sea colectivo

AGRADECIMIENTOS

A Paula Rodríguez, por mostrarme lo hermosa que es la microbiología y ayudarme a encontrar mi rincón en el mundo de la ciencia.

A César, Agustina y Choni, por aceptarme como estudiante de tesina, creer en mí cuando uno a veces duda de sus capacidades, por las enseñanzas día a día, las charlas de aliento, y por confiar. A su vez por ser personas maravillosas, capaces, sensibles y con una mirada hermosa para la comunidad científica.

Al LBB, una casita que me cruce a lo largo del camino, a todas y todos los que me llenan de tantas alegrías, de tanto compañerismo y de tantos chocolates. Se me hacía difícil creer que un lugar de trabajo podía ser a su vez un lugar con tanto amor, pero me mostraron que existe.

Mis amigos, aunque no sepan ni a qué me dedico siempre están ahí, nos vemos algunos seguido y otros cada mucho tiempo, son mi respaldo para seguir, y quienes me ayudaron a ser quien soy hoy, con la cabeza llena de anécdotas, son parte de una cajita muy importante del corazón. A Igna, por tanto amor, compañero de camino, desde las comidas caseras a las charlas eternas. Por crecer juntos paso a paso, y por mucho más.

Mi familia por tanto cariño y siempre estar. A mi abuela Elena que se procuró de darme tanto amor siempre, mostrarme recetas, sus colecciones de botones y lo lindo que se siente el sol, los pájaros y la vida. A mi madre por siempre escucharme, hacerme reír, ser de las mejores cocineras del mundo, estar ahí en cada preparación de parcial o examen, cebando mates o asintiendo con la cabeza como si entendiera. A papá por enseñarme que todo en la vida se puede, mostrarme el mundo mágico del crear, el de la música y las herramientas. A los dos por tanto amor siempre, desde plancharme la moña de la escuela, estar los tres al ladito del fuego en invierno, y contándonos los sueños en los mates mañaneros. No me dan las palabras para agradecerles.

Y por qué no a mí misma, por la perseverancia, ir de a poquito encontrándome en este hermoso mundo y creer, aunque a veces el mundo grite.

RESUMEN

Muchos productos farmacéuticos y agroquímicos, detergentes, pigmentos y polímeros que son utilizados en la vida moderna presentan compuestos halogenados. La halogenación tradicional de moléculas es llevada a cabo por procesos que generalmente involucran condiciones de reacción que implican la utilización de agentes y solventes tóxicos por lo que perjudican el ambiente. Estas rutas de halogenación cuentan con baja regioselectividad y presentan la formación de productos no deseados. La halogenación enzimática provee una ruta más efectiva y ecológica para combatir estos problemas, aumentando la regio- y estereoselectividad obtenida (Menon et al., 2022a). Durante un extenso período el interés en los procedimientos biocatalíticos ha ido en aumento, siendo estos más benignos para el medio ambiente y menos costosos que la química clásica (Woodley, 2020, Sheldon & Brady, 2019). A su vez, las enzimas suelen actuar como catalizadores con selectividad quimio-, regio-, y estereoespecífica, una característica que es altamente desafiante para los métodos clásicos de la química. Es por esto por lo que la biocatálisis resulta ser una opción respetuosa con el ambiente que posibilita la funcionalización de átomos de carbono no activados. Las halogenasas se pueden clasificar en 3 tipos según el mecanismo catalítico. Esta tesis se centró en halogenasas flavinas dependientes (FDH).

En literatura se han descrito una gran variedad de compuestos halogenados encontrados en la naturaleza. Hasta la fecha, más de treinta enzimas con actividad halogenasa procedentes de diferentes microorganismos han sido caracterizadas (Crowe et al., 2021a). En este contexto es que surge el interés de buscar nuevas halogenasas capaces de biotransformar compuestos indólicos que puedan utilizarse para la síntesis de derivados psicodélicos. En esta tesis se utilizaron aproximaciones de minería genómica para la búsqueda de halogenasas en cepas de actinomicetes nativas. Como resultado, se lograron identificar cuatro halogenasas (2231, 2321, MAI2213 y MAI2274) que fueron clonadas y expresadas en microorganismos recombinantes estudiando la capacidad de los biocatalizadores obtenidos de halogenar núcleos indólicos mediante biotransformación del tripófano.

Palabras clave: Halogenasas, Minería genómica, Biocatálisis

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	4
RESUMEN	5
TABLA DE CONTENIDO	7
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 Importancia de Compuestos Halogenados	9
1.2 Biocatálisis como método de trabajo	10
1.3 Halogenasas.....	10
1.4 Estrategias para la Regeneración del Cofactor Flavina.....	17
1.5 Minería genómica aplicada en genomas bacterianos	18
2. OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivo general	21
2.2 Objetivos específicos	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1 Medios de cultivo y buffers.....	22
3.2 Búsqueda de secuencias en base de datos	23
3.3 Aplicar minería genómica para la búsqueda de nuevas halogenasas en cepas de actinomicetes secuenciadas	26
3.4 Construcción y optimización de los sistemas de expresión	28
3.5 Extracción de plásmidos	29
3.6 Mantenimiento de cepas de <i>E. coli</i>	30

3.7 Preparación de células competentes.....	30
3.8 Transformación de células por electroporación.....	31
3.9 Preparación de muestras para gel poliacrilamida.....	32
3.10 Estudio de la halogenación.....	33
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
4.1 Identificación de nuevas secuencias de halogenasas no caracterizadas en base de datos y detección de motivos conservados en secuencias de halogenasas dependientes de FAD (FDH).....	35
4.2 Aplicar minería genómica para la búsqueda de halogenasas en genomas de cepas nativas de <i>Streptomyces</i>	37
4.3 Construir y optimizar sistemas de expresión adecuados para los genes seleccionados en cepas recombinantes de <i>Escherichia coli</i>	41
4.4 Aislamiento de plásmido pACYC-GroEL/ES-TF.....	42
4.5 Transformación de células con sistemas de expresión construidos.....	43
4.6 Análisis de expresión de proteínas.....	45
4.7 Estudio de Halogenación.....	49
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	51
BIBLIOGRAFÍA.....	52

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia de Compuestos Halogenados

La halogenación genera interés en la academia y en la industria porque sustituyentes halogenados impactan significativamente la función de diversos compuestos orgánicos por lo que permiten generar un abanico de subsecuentes estrategias de funcionalización. En la actualidad se conocen más de 5000 productos naturales que contienen un sustituyente halogenado, los cuales destacan por su estabilidad metabólica y actividad biológica (Gribble, 2015), algunos ejemplos se observan en la **Figura 1**.

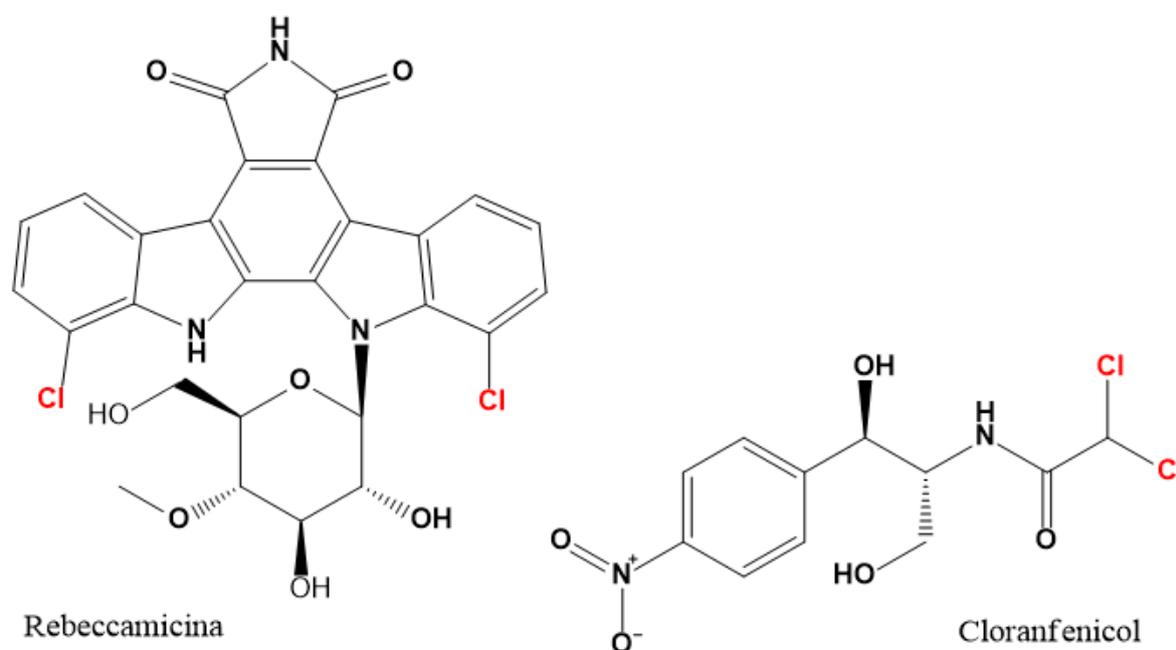


Figura 1. Ejemplos de compuestos halogenados de interés farmacéutico. Cloranfenicol: antibiótico, Rebeccamicina: antibiótico antitumoral.

Las estrategias de halogenación utilizadas en la síntesis química de estos compuestos muestran una limitada regioselectividad, como también conllevan el empleo de reactivos costosos y de alta toxicidad. Además, los métodos químicos a menudo tienen exigencias específicas sobre la estructura del material de partida. En consecuencia, la sustitución de la halogenación química por medios biológicos puede ofrecer una ruta

más selectiva, ecológica y menos peligrosa para obtener moléculas de interés (Alonso et al., 2002).

1.2 Biocatálisis como método de trabajo

Durante un largo período de tiempo el interés en los procedimientos biocatalíticos ha ido en aumento (Woodley, 2020). La catálisis enzimática se alinea con los principios de la química sostenible ya que su impacto sobre el ambiente es sustancialmente inferior si se lo compara con muchos de los procedimientos convencionales utilizados en la síntesis química clásica (Sheldon et al., 2020). Además, las enzimas actúan como catalizadores con alta quimio-, regio-, y estereoespecificidad, lo que resulta difícil de conseguir mediante métodos químicos clásicos, y posibilita la funcionalización de átomos de carbono no activados, lo que es altamente desafiante para los métodos clásicos de síntesis (Crowe et al., 2021). La excelente descripción general de los grandes avances dentro del campo de la biocatálisis se ofrece en dos revisiones históricas que definieron "cuatro olas de biocatálisis" a lo largo de 100 años (Bornscheuer, 2018).

Un ejemplo contemporáneo de esta relevancia de la biocatálisis es la creciente atención hacia los biocatalizadores derivados de *Streptomyces* spp. ya que es una fuente importante para la producción de metabolitos secundarios con diferentes aplicaciones. La detección y caracterización de biocatalizadores en *Streptomyces* muestran un crecimiento casi exponencial desde 2011, siendo las halogenasas y las polihidroxicanoato (PHA) despolimerasas las más estudiadas en la literatura (Spasic et al., 2018).

1.3 Halogenasas

La halogenación biocatalítica se lleva a cabo mediante enzimas denominadas halogenasas o haloperoxidasas, que pueden clasificarse según su mecanismo catalítico en: a) halogenasas hemo, vanadio y flavina dependientes que siguen un mecanismo electrófilo, b) halogenasas de hierro no hemo, halogenan mediante la formación de radicales intermedios, c) halogenasas fluorinasas S-adenosil-L-metionina (SAM) que

reaccionan a través de una vía nucleofílica. Esta tesina se centró en halogenasas flavina dependientes (FDH) (halogenasas electrofílicas), que, a diferencia de las halogenasas dependientes de hemo y vanadio, derivatizan selectivamente moléculas pequeñas (Timmins & De Visser, 2018).

Además de considerar el alcance del sustrato, la regioselectividad se presenta como otro aspecto fundamental en la identificación de las reactividades de las FDH de triptófano. Las FDH de triptófano se clasifican en 5-Trp-FDH, 6-Trp-FDH y 7-Trp-FDH según el sitio de halogenación en el anillo indol (Shepherd et al., 2016). Estudios anteriores han demostrado que la regioselectividad en la formación del enlace carbono-halógeno está determinada por la disposición relativa del sustrato con respecto al residuo de lisina críticamente necesario en el sitio activo, en conjunto con un glutamato ubicado entre los dominios de unión a flavina FAD y triptófano (Flecks et al., 2008). Además, investigaciones mediante mutagénesis y evolución dirigidas han revelado que los sitios de unión al triptófano son esenciales para definir el alcance del sustrato y la regioselectividad de las enzimas seleccionadas.

El descubrimiento de halogenasas dependientes de flavina en la biosíntesis de la pirrolnitrina demostró por primera vez la existencia en la naturaleza de un mecanismo de halogenación regio específico alternativo a la química clásica. Estas halogenasas están involucradas en una superfamilia de monooxigenasas flavina dependientes (FMOs) que activan al oxígeno molecular usando flavina reducida (FADH_2) para generar hidroperoxi-flavina (FAD-OOH). La química detrás de la halogenación mediada por las halogenasas dependientes de flavina (FDH) utiliza este mecanismo de activación inicial, seguido de la reacción del anión haluro con hidroperoxiflavina para producir ácido hipohaloso, como se visualiza en la **Figura 2**.

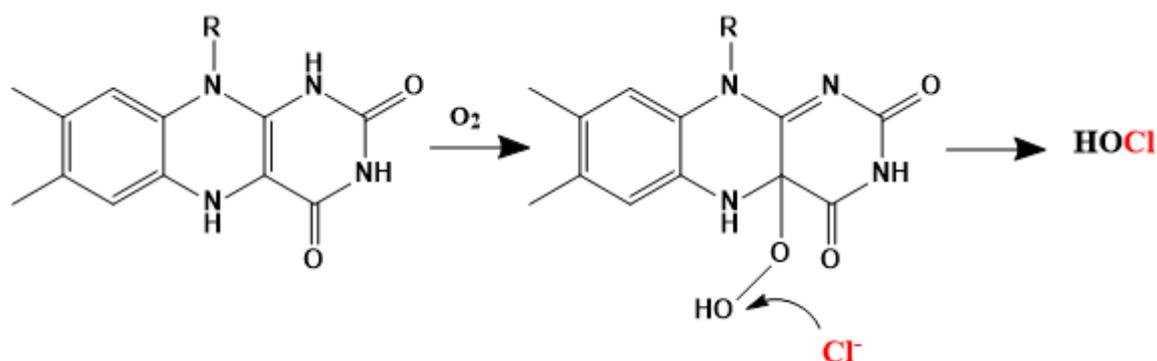


Figura 2. Mecanismo de reacción de halogenasas dependientes de flavina (Menon et al., 2022b)

La estructura general de FDH, similar a las monooxigenasas dependientes de flavina (FMO), se descubrió a través de las primeras estructuras cristalinas de estas enzimas. Sin embargo, las estructuras cristalinas revelaron que los sitios de unión de sustrato y flavina en FDH están espacialmente separados por más de 10 Å antes de que ocurra la reacción con una lisina en el sitio activo (como se muestra en la **Figura 3**). Esta disposición evita cualquier interacción directa entre sustrato y flavina, a diferencia de lo observado en FMO (Dong et al., 2005a). Luego, el mecanismo propuesto supone que el ácido hipohaloso es guiado hacia el sitio activo de la enzima donde interactúa con un residuo de lisina para formar un aducto enzima-cloruro de larga duración (Yeh et al., 2007a). El sitio de halogenación del sustrato suele estar orientado hacia el residuo de lisina del sitio activo, desempeñando un papel crucial en la determinación de la regioselectividad en la halogenación. La estructura formada por la interacción del sustrato con las especies de cloro electrofílicas se denomina intermediario de Wheland. Un residuo de glutamato en el sitio activo es el responsable de la abstracción de un protón. Este mecanismo de halogenación enzimática evolucionado y finamente controlado para la regioselectividad diferencia a las FDH de otras enzimas halogenasas, convirtiéndola en una herramienta sumamente útil para aplicaciones biocatalíticas y biosintéticas (Latham et al., 2018).

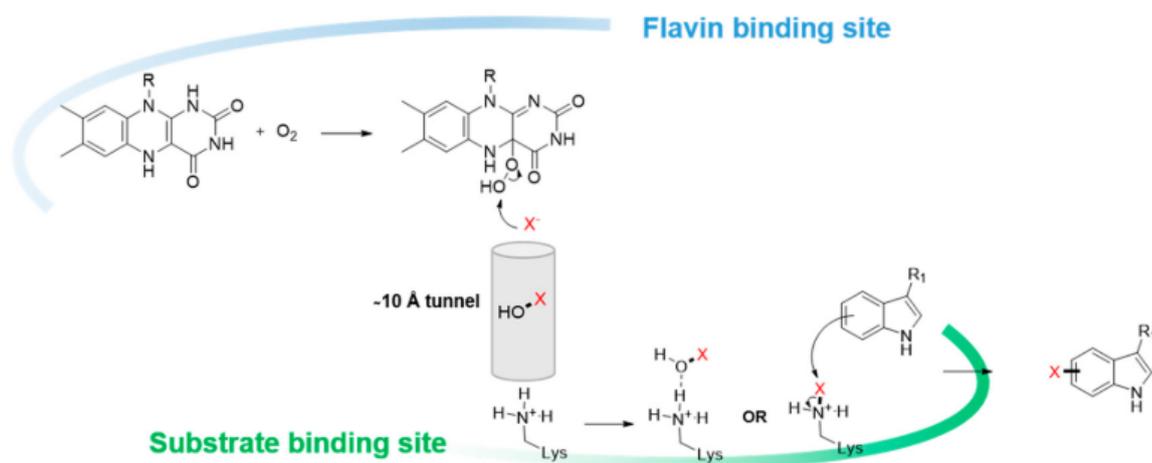


Figura 3. Mecanismo de acción de las halogenasas dependientes de flavina, donde se puede visualizar el túnel de unión entre la flavina y sustrato (Büchler et al., 2019a).

Como logra verse en la **Figura 3**, existe un dominio de unión al FAD separado del dominio de unión al sustrato, estando ambos conectados por una región estructuralmente conservada y altamente flexible, denominada “correa”, presente en las halogenasas de triptófano dependientes de flavina, conecta el dominio de unión al sustrato y el dominio de unión al FAD (flavina adenina dinucleótido), y que participa en las interacciones y la catálisis del FAD. Los estudios computacionales revelaron perfiles de energía potencial y energía libre, junto con características geométricas, mediante las cuales se muestra que los residuos de lisina y glutamato activan el ácido hipohaloso (Shepherd et al., 2016).

Los motivos conservados de las FDH se han descubierto gracias a ensayos de cristalografía. La estructura cristalina de algunas halogenasas, como la de triptófano 7-halogenasa PrnA, consiste en un dímero con dos monómeros en forma de pirámide (Dong et al., 2005b). Cada monómero contiene un módulo piramidal variable y un subdominio en forma de caja conservado que alberga el sitio de unión al FAD (motivo GxGxxG, donde "x" es cualquier aminoácido) (Dong et al., 2004). Se sugiere un motivo adicional conservado de FDHs (motivo WxWxIP) para evitar la unión de sustratos orgánicos cerca del anillo de isoaloxazina de $FADH_2$, suprimiendo así la posible actividad monooxigenasa (Kamerbeek et al., 2003).

A diferencia de las haloperoxidasas, la difusión de ácido hipohaloso (HXO, siendo X= Cl o Br) hacia el medio circundante está impedida por la estructura de la proteína. Por lo tanto, ingresa al túnel que conecta el sitio de unión a la flavina expuesto en la superficie y lo guía hacia el sitio de unión al sustrato (Dong et al., 2005c). El agente halogenante atraviesa el túnel hasta el sitio de unión al sustrato. Se cree que al final del túnel, el HOCl interactúa con un residuo de lisina (PrnA: K79) altamente conservado en todas las FDH conocidas. Esta teoría se ve reforzada en trabajos donde la mutación de este residuo por alanina conduce a una pérdida completa de actividad, en diferentes enzimas: RebH (K79) (Yeh et al., 2007b), PrnA (K79) (Dong et al., 2005c), BrvH (K83) (Neubauer et al., 2018a) y RadH (K74) (Menon et al., 2017). El residuo de ácido glutámico (E346), cercano a K79 en PrnA, estabiliza la posición del sustrato Trp mediante un enlace de hidrógeno entre el grupo amino del anillo indol y el grupo carbonilo del enlace peptídico entre E346 y S347, favoreciendo la orientación adecuada del sustrato en el sitio activo de la enzima (Ainsley et al., 2018). El grupo carboxilo de L-Trp también se estabiliza mediante enlaces de hidrógeno con el grupo hidroxilo de Y444. Las interacciones de apilamiento π del grupo indol del sustrato con H101, F103 y W455 se suman para lograr una posición bastante rígida y fija de Trp, decisiva para lograr alta regioselectividad en la halogenación. Los aminoácidos nombrados pueden visualizarse en la **Figura 4**.

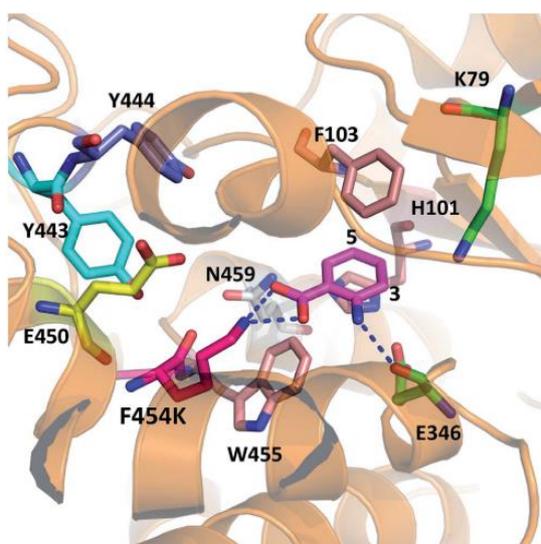


Figura 4. Aminoácidos esenciales para la halogenación (Shepherd et al., 2015).

La variabilidad en las regiones de unión al sustrato en los dominios terminales de las enzimas FDH contribuye a la diversificación de los sustratos enzimáticos presentes en este tipo de enzimas (Buedenbender et al., 2009).

Hasta la fecha, se han aislado y caracterizado una gran cantidad de FDH que se clasifican según el esqueleto químico del sustrato que aceptan, tales como halogenasas indólicas, fenólicas y pirrólicas, provenientes de rutas naturales (Payne et al., 2015; Shepherd et al., 2016). Las primeras halogenasas dependientes de flavina fueron identificadas a mediados de la década de 1990, por ejemplo, PrnA, que cataliza la cloración en la posición 7 del grupo indol del L-triptófano, fue descubierta en *Pseudomonas fluorescens* en 1998, por estar involucrada en la biosíntesis de pirrolnitrina, un metabolito secundario derivado de L-triptófano con una fuerte actividad antifúngica (Kirner et al., 1998).

La halogenasa 7-triptofano ampliamente utilizada, RebH, proviene de la bacteria *Lechevalieria aerocolonigenes* y su función natural es la cloración de precursores del agente antitumoral rebeccamicina (Yeh et al., 2005a). Asimismo, la halogenasa identificada mediante tamizaje metagenómico de muestras de suelo del desierto de Anza-Borrego (BorH) (Lingkon & Bellizzi, 2020) es capaz de clorar y bromar en la posición 6 de este aminoácido aromático. La posición 5 del grupo indol del triptófano puede ser halogenada por PyrH de *Streptomyces rugosporus* (Lingkon & Bellizzi, 2020), la numeración del anillo indólico se muestra en la **Figura 5**. Recientemente, se describió un conjunto novedoso de halogenasas dependientes de flavina, entre ellas la BrvH (Neubauer et al., 2018b). Se observó que esta enzima tenía una alta identidad de secuencia con las conocidas Trp-FDH, pero no podía convertir L-triptófano. Esta propiedad se atribuyó a la falta de ciertos aminoácidos necesarios para estabilizar el triptófano en el bolsillo del sitio activo, lo que le permite aceptar sustratos más pequeños como el indol (Ismail et al., 2019; Neubauer et al., 2018).

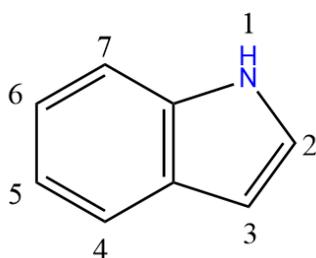


Figura 5. Estructura del grupo indólico numerado

En la actualidad, el conjunto de herramientas biocatalíticas incluye halogenasas dependientes de flavina capaces de convertir moléculas más allá de los derivados de L-triptófano (**Figura 6**). Las halogenasas PrnC y PltA, encontradas en *Pseudomonas fluorescens*, por ejemplo, convierten sustratos del tipo pirrol (Dorrestein et al., 2005a; Kirner et al., 1998), pero mientras que PltA requiere que su sustrato se encuentre unido a una proteína transportadora, PrnC actúa sobre un intermedio independiente en la biosíntesis de la pirrolnitrina (Dorrestein et al., 2005a). Después de la cloración catalizada por PrnA del L-triptófano para formar 7-cloro-L-triptófano, seguido por una reorganización del anillo y un paso de descarboxilación, PrnC realiza la cloración en la posición 3 del anillo pirrólico para formar aminopirrolnitrina (Kirner et al., 1998). MalA', una halogenasa bastante inusual de *Malbranchea graminicola*, puede catalizar la cloración iterativa y monobromación de premalbranqueamida, un precursor de malbranqueamida, un complejo alcaloide indólico halogenado de interés por su actividad biológica (Fraley et al., 2017).

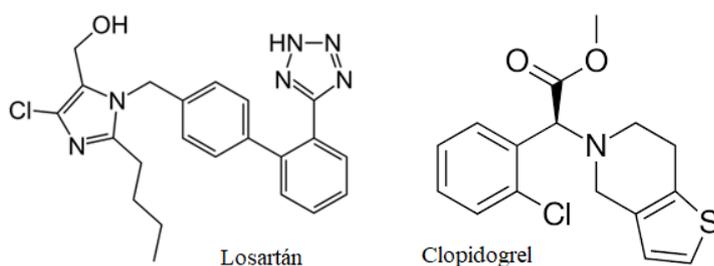


Figura 6. Compuestos halogenados de interés farmacéutico (Losatrán: medicamento para tratar la hipertensión, Clopidogrel: medicamento que evita la formación de plaquetas).

1.4 Estrategias para la Regeneración del Cofactor Flavina

Las primeras investigaciones sobre PrnA revelaron la necesidad de una actividad reductora de flavina, responsable de la regeneración *in situ* de FADH₂ para permitir la halogenación enzimática (Keller et al., 2000). En la naturaleza, la especie oxidada de flavina se reduce mediante una flavina reductasa (Fre). En el caso de la halogenasa RebH, por ejemplo, la flavina reductasa correspondiente, llamada RebF, fue identificada en el organismo nativo *Lechevalieria aerocolonigenes* (Yeh et al., 2005b). Sin embargo, para estudios *in vitro* de halogenasas, pueden emplearse flavina reductasas alternativas, como por ejemplo la flavina reductasa termofílica de *Bacillus subtilis* (Menon et al., 2016), de *Pseudomonas fluorescens* (Neubauer et al., 2018c) o de la cepa K12 de *Escherichia coli* (Domergue et al., 2019). Las flavina reductasas utilizan NADH para reducir la flavina; por lo tanto, las aplicaciones biocatalíticas pueden incluir una enzima adicional para la reducción de NADH. Esta enzima necesaria para regenerar el cofactor puede ser una deshidrogenasa como alcohol deshidrogenasa (ADH) (Frese et al., 2014), fosfito deshidrogenasa (PtdH) (Johannes et al., 2007), formiato deshidrogenasa (FDH) (Van Der Donk & Zhao, 2003) o glucosa deshidrogenasa (GDH) (Payne et al., 2015), entre otras (**Figura 7**).

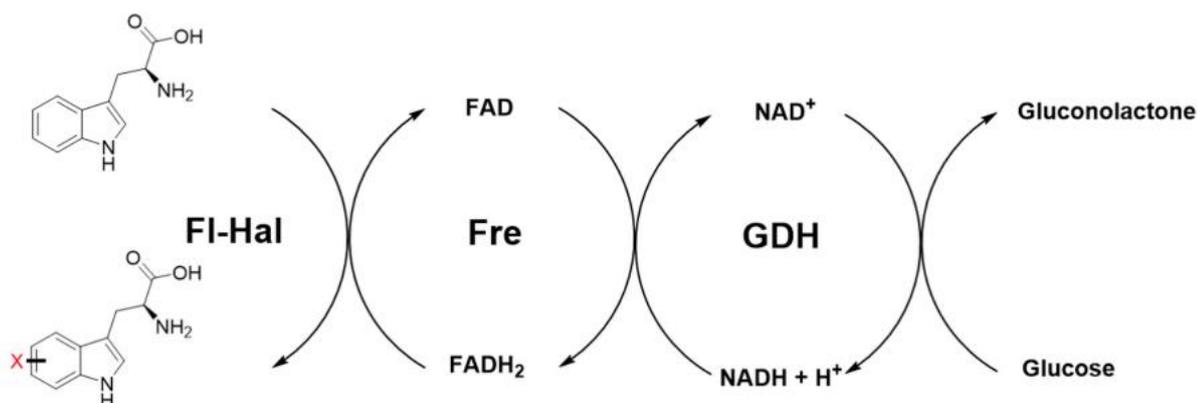


Figura 7. Sistema de regeneración de FADH₂, donde dos enzimas auxiliares son usadas: flavina reductasa (Fre) y una glucosa deshidrogenasa para la reducción de NAD⁺. Además, el co-sustrato glucosa es usado en exceso para que los cofactores FAD y NAD⁺ puedan ser reciclados (Büchler et al., 2019b).

1.5 Minería genómica aplicada en genomas bacterianos

El término "minería genómica" se ha utilizado en diversos campos para describir la explotación de la información genómica con el fin de descubrir nuevos procesos y productos. El concepto de explotar los datos de secuencias genómicas para el descubrimiento de nuevos productos naturales surgió a raíz de la rápida expansión del conocimiento sobre la base genética y bioquímica de la biosíntesis de metabolitos secundarios, especialmente en microorganismos, en las décadas de 1980 y 1990. En el ámbito microbiano, este fenómeno fue reconocido por primera vez durante el análisis de las secuencias completas del genoma de los actinomicetos *Streptomyces coelicolor* A3(2) y *Streptomyces avermitilis*. Observaciones similares se han hecho desde entonces para otros genomas microbianos, como *Pseudomonas fluorescens* Pf-5, *Saccharopolyspora erythraea* NRRL2338, y especies de *Aspergillus*, entre otros (Challis, 2008).

La utilización de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para identificar marcos de lectura abiertos (ORFs) en genomas bacterianos es crucial, ya que permite la comparación de estas secuencias con secuencias proteicas conocidas, facilitando la predicción de la función génica (Borodovsky et al., 1994). En los últimos años se han descubierto y caracterizado numerosas FDH utilizando estas metodologías. El análisis de secuencias de varias FDH se centró dos motivos estrictamente conservados del dominio de unión al FAD, como son GXGXXG, WXWXIP, siendo X cualquier aminoácido (Fisher et al., n.d.; Kong et al., 2020).

Estudios recientes sugieren que las enzimas Trp-FDH tienen un alcance de sustrato sutil pero discreto, revelando que no todas aceptan el triptófano. MibH de *Microbispora corallina* (Ortega et al., 2017) reacciona con un lantipeptido que lleva un grupo triptófano, pero no directamente con triptófano. BrvH de *Brevundimonas* sp. cepa BAL3 (Neubauer et al., 2018d) es inactivo frente a triptófano, pero halogena el indol, mientras que KrmI de *Theonella swinhoei* WA (Smith et al., 2017) reacciona con triptófano, pero no con indol.

Investigaciones recientes han demostrado que tanto genomas completos como metagenomas pueden ser una inmensa fuente de genes de halogenasas para encontrar nuevas halogenasas con diferentes especificidades de sustrato (Latham et al., 2016).

Los psicodélicos, como la psilocibina y la dietilamina del ácido lisérgico (LSD), han llamado la atención por su potencial en el tratamiento de trastornos psiquiátricos (Doss et al., 2022). Estas drogas (**Figura 8**), que tienen poco potencial adictivo, inducen mecanismos neurogénicos, incluida la implicación de factores tróficos (Corne & Mongeau, 2019). Estudios recientes han demostrado su eficacia en el tratamiento de la ansiedad, la depresión, los trastornos del estado de ánimo y los trastornos por uso de sustancias. Se cree que el núcleo indólico, una característica estructural común en muchos de estos compuestos desempeña un papel clave en sus acciones farmacológicas, particularmente en su interacción con los receptores de serotonina y glutamato (Mahmood et al., 2022).

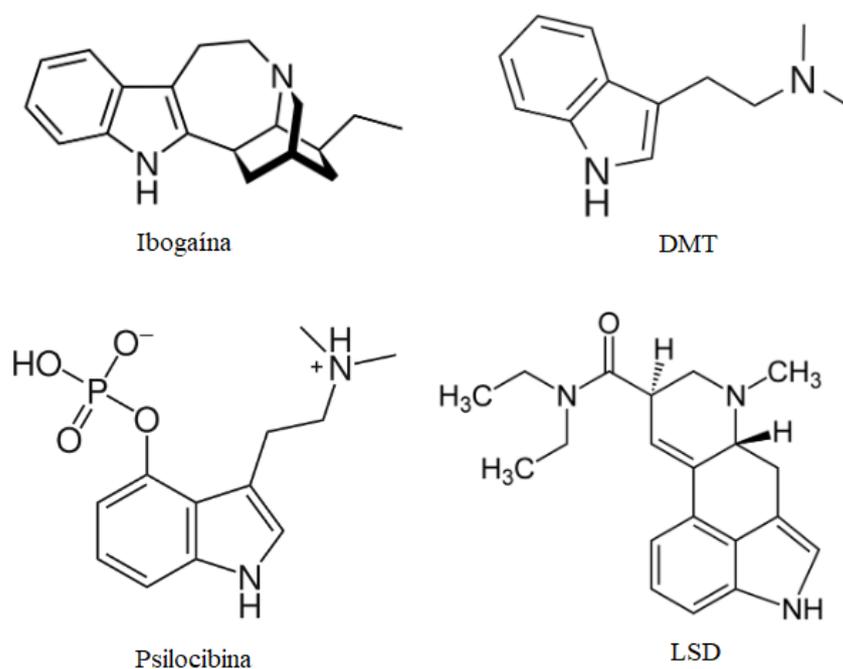


Figura 8. Compuestos psicodélicos conteniendo un núcleo indólico.

En este sentido, la búsqueda de halogenasas capaces de funcionalizar el núcleo indólico en distintas posiciones, en un paso de reacción y con las ventajas ambientales de la

biocatálisis podría aportar la obtención de intermediarios en síntesis de alcaloides y a su vez permitan generar bibliotecas de análogos semisintéticos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Buscar nuevas enzimas con actividad halogenasa en genomas de microorganismos del género *Streptomyces* aislados de suelos nativos de Uruguay, buscando su actividad frente a triptófano.

2.2 Objetivos específicos

1. Identificar nuevas secuencias no caracterizadas en base de datos y detectar motivos conservados en secuencias de halogenasas dependientes de FAD (FDHs).
2. Aplicar minería genómica para la búsqueda de halogenasas en genomas de cepas nativas de *Streptomyces* pertenecientes a las colecciones de microorganismos del Laboratorio de Microbiología Molecular (LMM) de la Facultad de Química.
3. Construir y optimizar sistemas de expresión adecuados para los genes seleccionados en cepas recombinantes de *Escherichia coli*.
4. Estudiar la capacidad de los biocatalizadores obtenidos de halogenar triptófano mediante biotransformación.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Medios de cultivo y buffers

Las sales utilizadas en las soluciones buffer y medios de cultivo fueron obtenidas de Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU. Todos los medios de cultivo comerciales son de la marca Thermo Scientific™. Para las corridas electroforéticas de ADN plasmídico se utilizó agarosa (SigmaAldrich) y buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) 0.5X. Los geles de agarosa 0.8% se tiñeron con Gel-red y los de poliacrilamida con azul de Comassie. Se utilizó el marcador de peso molecular gene Ruler 1Kb DNA Ladder para la cuantificación de ADN. Ampicilina, cloranfenicol y kanamicina se obtuvieron de Sigma-Aldrich.

Medio Luria Bertani (LB): Triptona 10g / Extracto de Levadura 5 g / NaCl 10g / Agar 15 g para medio sólido / antibióticos si fuesen necesarios (ampicilina 40 mg/mL, kanamicina 50 mg/mL y cloranfenicol 25 mg/mL) / Agua destilada csp para 1L

Medio de Autoinducción (AIM): Triptona 10g / Extracto de Levadura 5g / Sulfato de Amonio ((NH₄)₂SO₄) 3.3g / Fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄) 6.5g / Fosfato de sodio dibásico (Na₂HPO₄) 7.1g / se lo suplementa con 750μL de MgSO₄ 1M y se agregan 980mL de agua destilada. Antes de utilizar se agregan asépticamente solución 20 mL de stock de glucosa 2.5% + lactosa 10.5%, 1 mL de solución stock metales traza 1000x y el antibiótico que corresponda en concentración necesaria.

Medio L-broth para competentes: Triptona 10g / Extracto de levadura 5g / NaCl 5g / Agua destilada csp para 1L.

Medio SOB: Triptona 20g / Extracto de Levadura 5g, NaCl 0.5g / agua destilada 1L.

Medio SOC: SOB 10mL / MgCl₂ 1M 100μL / MgSO₄ 1M 100μL / Glucosa 20% 200 μL.

Buffer de lisis: Buffer fosfato 200mM pH 8 / NaCl 500mM.

Solución stock de metales traza 1000x: HCl 1M / FeCl₃ 50mM / CaCl₂.2H₂O 20mM / ZnSO₄ 1mM / CoCl₂.6H₂O 2mM / CuCl₂.2H₂O 2mM / NiSO₄ 2mM / Na₂MoO₄.2H₂O 2mM / H₃BO₃ 2mM / MnCl₂.4H₂O.

Buffers para lisis y purificación de proteínas:

- i. Buffer KPi 100mM pH 7.2 ($K_2HPO_4 + KH_2PO_4$) / 300mM NaCl / 20mM imidazol.
- ii. Buffer KPi 100mM pH 7.2 ($K_2HPO_4 + KH_2PO_4$) / 300mM NaCl / 50mM imidazol.
- iii. Buffer KPi 100mM pH 7.2 ($K_2HPO_4 + KH_2PO_4$) / 300mM NaCl / 300mM imidazol.

Buffers para diálisis:

- i. Buffer KPi 100mM pH 7.2 ($K_2HPO_4 + KH_2PO_4$) / 100mM NaCl / 100mM imidazol / 5% glicerol / agua destilada csp.
- ii. Buffer KPi 100mM pH 7.2 ($K_2HPO_4 + KH_2PO_4$) / 35mM NaCl / 30mM imidazol / 10% glicerol.
- iii. Buffer KPi 100mM pH 7.2 ($K_2HPO_4 + KH_2PO_4$) / 10% glicerol.

Reactivos para biotransformación: Células 0.1g cél/mL crecidas en placa e inoculadas en matraces con 20 mL de medio LB, crecido por 24 hs / NaCl 100mM / glucosa 20% / buffer fosfato 500mM pH 7.4 / sustratos: Triptófano 1mM.

3.2 Búsqueda de secuencias en base de datos

Se buscaron en la base de datos libre GenBank® secuencias de halogenasas reportadas en literatura (Gao & Huang, 2009a) para generar una colección de secuencias. Estas secuencias de halogenasas fueron obtenidas en formato FASTA (en un total de 51 secuencias) por lo que se encontraban en unidad de nucleótidos, y utilizando las mismas en GenBank® se obtuvo la proteína completa (secuencia aminoacídica), mediante el programa protein BLAST. Se utilizaron las herramientas HHMER y pBLAST con secuencias de halogenasas dependientes de FDH obtenidas en bibliografía.

Para contar con una colección más amplia se utilizó el Software HHMER, que permite reconocer secuencias homólogas de nucleótidos o aminoácidos y llevar a cabo

la alineación de dichas secuencias. Se utilizaron cinco halogenasas (**Tabla 1 Filas 1-6**) que fueran diferentes entre sí tomando en cuenta la regioselectividad que presentan ante el anillo indólico del triptófano, si aceptan a este como sustrato o si necesitan de una proteína carrier para lograr la halogenación, y se eligieron seis resultados para cada halogenasa que presentasen un porcentaje de identidad mayor al 30%.

Además, se tomaron en cuenta secuencias reportadas de FDH dependientes de proteína carrier descritas en literatura (**Tabla 1, Filas 7 y 8**) (Buedenbender et al., 2009b; Dorrestein et al., 2005b), y secuencias de tres enzimas que tienen una alta identidad de secuencia con las Trp-FDH conocidas, pero no pueden convertir L-triptófano (xcc-b100_1333, xcc-b100_4156 y xcc-b100_4345 (**Tabla 1, Filas 9-11**) permitiendo aumentar la base de datos a utilizar posteriormente. Se añadió también el mismo grupo externo u outgroup (PDB: 1VQW) utilizado en (Gao & Huang, 2009b), ya que su utilización en la construcción de árboles filogenéticos es crucial para enraizar el árbol y determinar la dirección del tiempo (Institute of Electrical and Electronics Engineers., 2012). Se utilizaron las secuencias en formato aminoacídico para la construcción del árbol.

Tabla 1. Halogenasas muy reportadas en literatura

	Halogenasa	Código PDB	Fuente
1	BrvH	6FRL	<i>Brevundimonas BAL3</i>
2	MalA	5WGZ	<i>Malbranchea aurantiaca</i>
3	RebH	2OA1	<i>Lechevalieria aerocolonigenes</i>
4	PyrH	2WET	<i>Streptomyces rugosporus</i>

5	PrnC	AAB97506 (UniProt)	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
6	PrnA	2AR8	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
7	PltA	5DBJ	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
8	CndH	3E1T	<i>Chondromyces crocatus</i>
9	xcc- b100_1333	B0RQE8 (UniProt)	<i>Xanthomonas campestris</i>
10	xcc- b100_4156	6Y1W	<i>Xanthomonas campestris</i>
11	xcc- b100_4345	B0RZ29 (Uniprot)	<i>Xanthomonas campestris</i>

El árbol contuvo 88 secuencias en total utilizando el Software Geneious® el cual permitió clasificar las distintas halogenasas documentadas en grupos de regioselectividad similar, e intentar ubicar en estos los Open Reading Frame (ORF) encontrados de los genomas en estudio.

Para encontrar los motivos específicos se utilizó el programa Pratt EMBL-EBI®, el cual permite obtener patrones conservados a través del análisis de diversas secuencias en formato FASTA. Se utilizó una estrategia basada en la alineación de secuencias aminoacídicas para definir motivos conservados que fuesen base para la búsqueda de enzimas en los genomas disponibles en nuestro laboratorio (Anne Zaparucha, Véronique de Berardinis, 2018). Se utilizaron las secuencias de la **Tabla 1, Filas 1-6**, cada una con su grupo de 6 secuencias obtenidas con el Software HHMER.

3.3 Aplicar minería genómica para la búsqueda de nuevas halogenasas en cepas de actinomicetes secuenciadas

La minería genómica para la búsqueda de halogenasas se realizó utilizando la secuencia genómica de 12 cepas de *Streptomyces* consideradas patógenas, siendo esta la razón para elegir trabajar con ellas. Estas forman parte de una colección de 253 cepas de *Streptomyces* sp. aisladas de muestras de suelo en Uruguay por el grupo de la Dra. María Inés Siri., cuyos códigos se presentan en la **Tabla 2**. Las secuencias genómicas de las cepas se agregaron al Software Geneious®, y a las mismas se les realizó un BLAST con la base de datos de halogenasas que creamos anteriormente. En base al resultado obtenido se analizó el valor del Query cover (el porcentaje de la secuencia del Query que cubre la alineación con la referencia) y el porcentaje de Identificación (la identidad con la alineación). En aquellas secuencias que mostraron valores mayores al 50% de Query cover y mayor al 30% de Identificación ya que estos son los valores mínimos para considerar válida la comparación.

Se buscaron los ORFs mediante la opción Live annotate & Predict →Find ORFs →include interior ORFs, y así se obtuvieron los genes completos. Se tomó la secuencia de cada gen y se les realizó un BLAST general en GenBank® y UniProt para verificar si ya se encontraban reportados.

Tabla 2. Cepas de *Streptomyces* utilizadas para ser analizadas.

Cepa	Identificación	Contigs
2201	<i>Streptomyces</i> sp.	6
2206	<i>Streptomyces</i> sp.	3
2208	<i>Streptomyces spiralis</i>	4
2231	<i>Streptomyces novaecaesareae</i>	21

2284	<i>Kitasatospora phosalacinea</i>	2
2293	<i>Streptomyces griseus</i>	2
2306	<i>Streptomyces griseus</i>	3
2321	<i>Streptomyces rishiriensis</i>	2
MAI2213	<i>Streptomyces misionensis</i>	5
MAI2237	<i>Streptomyces</i> sp.	13
MAI2274	<i>Streptomyces lucensis</i>	4
MAI2300	<i>Streptomyces pseudovenezuelae</i>	8

Utilizando el Software Geneious®, se construyó una base de datos local con los genomas de *Streptomyces* aislados por el equipo de Microbiología de la Facultad de Química UdelaR, secuenciados y no reportados (**Tabla 2**), y se analizaron con la herramienta BLAST acoplada a este Software. Se utilizaron como template las secuencias reportadas (**Tabla 1, Filas 1-6**), las mismas se alinearon y posteriormente se encontraron los motivos conservados para luego buscar en la base de datos local los mismos, pudiendo corresponder a las secuencias de las halogenasas encontradas como también otras secuencias de halogenasas tomadas de literatura. En base al resultado se seleccionaron los ORF que abarcaran la zona del BLAST obtenido y que a su vez presentasen un porcentaje de similitud entre el 30 y 75% respecto a las halogenasas ya reportadas de manera de abarcar mayor biodiversidad y detectar halogenasas novedosas. A este ORF identificado, se lo sometió a otro análisis BLAST en la base de datos GenBank®, con el objetivo de determinar si este ORF en particular ya había sido mencionado en otros genomas reportados. Finalmente, nos enfocamos en examinar mediante alineamiento de secuencias en el fragmento del ORF que hemos identificado, tomando como secuencia modelo

la halogenasa PrnA, si se presentaban aminoácidos esenciales previamente estudiados (K79, H102, F104, W272, W274, I276, P277, E246 y E247).

Además, se quisieron encontrar motivos conservados los cuales pueden predecir la posición de la halogenación como ha sido reportado en (Jeon et al., 2021).

3.4 Construcción y optimización de los sistemas de expresión

Se procedió a la construcción de sistemas de expresión adecuados para la producción de las enzimas seleccionadas en *Escherichia coli*. Los genes seleccionados fueron sintetizados por la compañía GeneScript en el vector pET-28a(+) (**Figura 9**) con codones optimizados para dicho hospedero de forma de evitar problemas asociados a falta de expresión por la presencia de codones poco comunes. También fue solicitado que se sintetizara el vector pET-28a(+) conteniendo el gen que sintetiza la halogenasa RebH, la cual se encuentra unida por un linker a la reductasa RebF (**Figura 10**), esto se utilizó como control positivo. A su vez construyó el sistema de expresión en vector pMAL-c5E conteniendo una reductasa para realizar la biotransformación del triptófano utilizando nuestras enzimas seleccionadas. Se probó la expresión de las enzimas en el sistema nombrado utilizando distintos medios de cultivo (LB y AIM) y temperaturas para seleccionar las mejores condiciones de trabajo post-inducción (21 y 28°C) y se verificó expresión mediante SDS-PAGE.

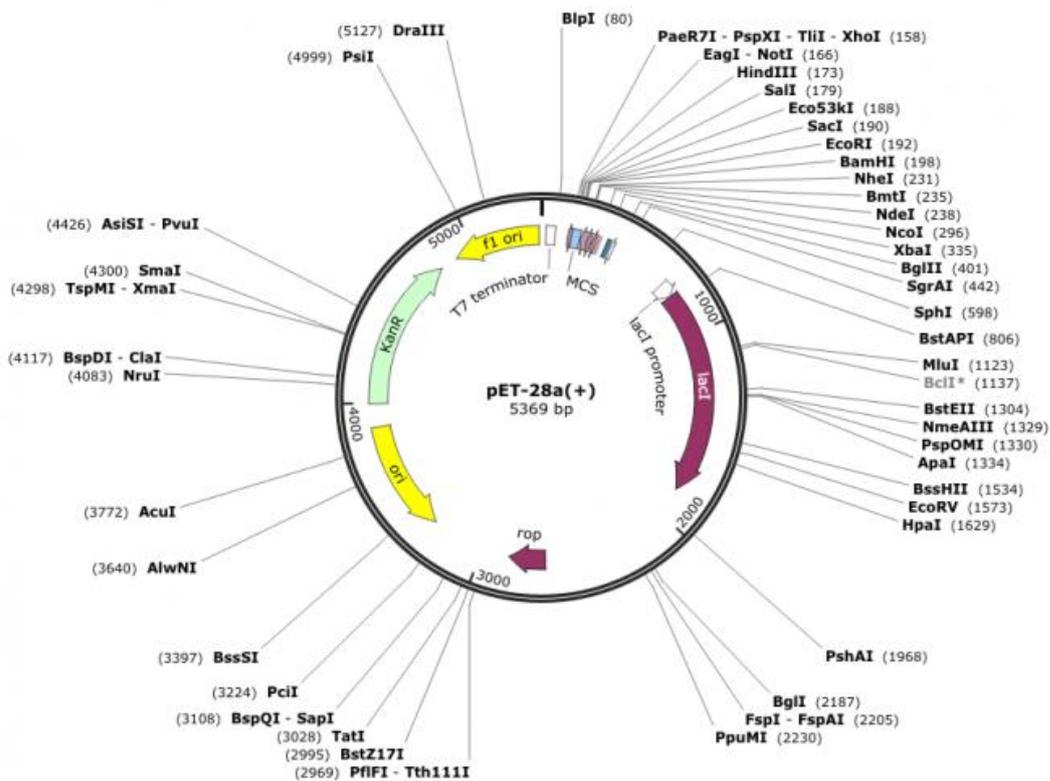


Figura 9. Vector de expresión pET-28a (+)

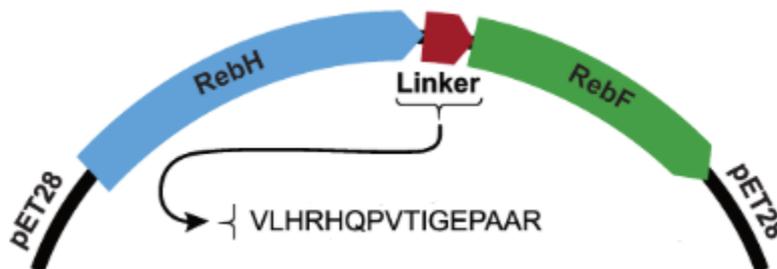


Figura 10. Plásmido pET28 conteniendo la fusión RebH-RebF por un linker (Andorfer et al., 2017).

3.5 Extracción de plásmidos

Se utilizó el kit PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se trabajó con la cepa de *E. coli* DH5α que contenía el vector pACYC-GroEL/ES-TF. Primero se colocaron 300 μL de cepa en un tubo conteniendo 5mL de medio Luria-Bertani (LB) y 5μL del antibiótico

cloranfenicol. El agregado de este se debe a que el plásmido tiene resistencia al antibiótico. El tubo se dejó crecer overnight (ON) en agitador orbital (IKA® KS 4000 i control) a 37 °C, 150 rpm por 24 hs. Luego se lo inoculó en matraces de 250mL de medio sabiendo que este plásmido tiene bajo número de copia. Los matraces se dejaron en el mismo agitador a las mismas condiciones que los tubos. Se guardó en criotubo (750µL medio y 750µL de glicerol al 50%) a –70°C.

3.6 Mantenimiento de cepas de *E. coli*

Para el mantenimiento de pocos días se utilizaron placas del medio de cultivo LB-agar conteniendo el antibiótico correspondiente, selladas con Parafilm y almacenadas en heladera. Para el mantenimiento de cepas a largo plazo las mismas se guardaron en freezer a -70°C en medio de conteniendo glicerol al 50%.

3.7 Preparación de células competentes

Se retiró la cepa *E. coli* B121(DE3) guardada en criotubo a -70°C y se la colocó en placa mediante método de aislamiento por estrías, dejándola ON donde luego se inoculó una colonia característica en un tubo conteniendo 5 mL de medio LB y antibiótico kanamicina también incubándolo overnight. Se inocularon 125mL de medio L-broth en matraces con 1mL/100mL de cultivo fresco crecido en tubo overnight, se incubó a 37°C, 180 rpm hasta llegar a una OD₆₀₀ de 0.5. Se colocó el cultivo en hielo durante aproximadamente 20 minutos. Se transfirió el cultivo a un tubo de centrifuga frío y se centrifugó a 4000g durante 15 minutos a 4°C. Se descartó sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 100mL de glicerol 10% frío, se volvió a centrifugar a 4000g, 15 minutos a 4°C y se descartó sobrenadante. Se repitió el mismo procedimiento con 50mL y 100 mL de glicerol 10% frío, solo que a este último volumen se lo transfirió a un tubo de centrifuga pequeño para centrifugar en las mismas condiciones nombradas anteriormente. El pellet se resuspendió en 500uL de glicerol 10% frío. La concentración de células obtenidas se estimaba que era en el orden de

$1-3 \times 10^{10}$ cél/mL. Se trabajó con las cepas ya siendo competentes de *E. coli* TOP 10 para almacenar los plásmidos y con la cepa *E. coli* BL21(DE3) para expresar los genes de interés.

3.8 Transformación de células por electroporación

Se transformaron las dos cepas preparadas en 3.7, donde a *E. coli* BL21(DE3) se le realizó una cotransformación. Es sabido que las halogenasas son generalmente co-expresadas con chaperonas que asisten a su correcto plegamiento (Payne et al., 2013), por lo cual las células se transformaron con pET-28a(+) (que contenía el inserto) en conjunto con el plásmido pACYC-GroEL/ES-TF, que cuenta con la secuencia de la chaperona GroEL, aunque el vector pET-28a(+) es eficaz para la expresión génica gracias a su sistema regulador T7 que permite una producción robusta de proteínas con control estricto mediante IPTG (Dubendorff & Studier, 1991; Mcgrath et al., 1970).

Para cada muestra de ADN a transformar se descongeló una alícuota de 40 μ L de células competentes, manteniéndolas continuamente en hielo. Se agregó a cada una 1 μ L del plásmido correspondiente, mezclando suavemente con punta de pipeta e incubando en hielo. Esto fue transferido a una celda de electroporación de 0,2 cm enfriada en hielo. La electroporación se realizó con un electroporador BIO-RAD MicroPulser™ mediante un pulso de 2.5 kV durante 5 ms en modo Ec2. Luego de realizada la electroporación, se agregó 1 mL de SOC a la celda resuspendiendo suavemente las células por inversión e incubando por 1 hora a 37 °C en estufa. Dependiendo de la muestra de ADN utilizada se realizaron las diluciones correspondientes para el plaqueo de 100 μ L de las células en medio LB-agar conteniendo antibiótico correspondiente. Siempre se incluyó un control negativo (células sin el plásmido de interés).

Los tubos obtenidos de GenScript se prepararon ya que venían liofilizados a una concentración de 4 μ g/ μ L.

$$4000ng \times 1\mu L = 50ng \times Vf$$

$$V_f = \frac{4000ng \times 1\mu L}{50ng} = 80\mu L$$

3.9 Preparación de muestras para gel poliacrilamida

Se realizaron por escalado seis matraces de 100mL, conteniendo 20mL de medio AIM y LB. Estos medios se mantuvieron por 24 horas a 20°C y 28°C en agitación orbital a 150rpm por 24 horas con agregado de 200µL de bacterias *E. coli* BL21(DE3) transformadas y crecidas a 37°C en tubos de 5mL conteniendo LB (relación ¼ de aire y medio), más 400µL de glucosa + lactosa, 0,02mL de metales traza 1000X, inducidos al llegar a un OD₆₀₀ de 0.5 (en caso de medio LB) e incubados en rotor orbital a 20°C y 28°C. Después de un crecimiento toda la noche los medios fueron centrifugados a 4000g por 5' a 15°C, se obtuvo un pellet de células el cual se procedió a homogeneizar con 5mL de buffer de lisis (buffer KPi 100mM pH 7.2), se sonicó 2.5'' ON y 1,5'' OFF en un total de veces que quedase 60'' ON. Se procedió a agregar 10 mg de lisozima mezclando por inversión de a momentos por 15' a temperatura ambiente, luego se agregaron 300µL de tritón (dil 1/10) y se incubó por otros 15'. Se centrifugó a 17000g por 20' en tubos eppendorf de 2mL, para poder separar la fase soluble (sobrenadante) y la insoluble (pellet). El gel utilizado fue de la empresa BIO-RAD Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels. Para cargar los pocillos del mismo se mezclaron 40µL de muestra y 13µL de sample buffer, mezcla la cual se dejó en baño a 100°C por 5' y posteriormente se sembraron 15µL cuando se trataba de una fracción soluble y 10µL si era insoluble. Como marcador de peso molecular se utilizó Amersham low-molecular-weight calibration kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) y se sembraron 10µL.

Se realizó la electroforesis por dos horas en un Mini-PROTEAN Tetra Cell a 150V, 70mA y 8W conteniendo además del gel cargado, loading buffer. Se tiñó overnight con azul de Coomassie y posteriormente se destiñó con agua.

3.10 Estudio de la halogenación

Las cepas recombinadas (*E. coli* BL21(DE3)) que expresasen adecuadamente las enzimas seleccionadas se testearon en la biotransformación de triptófano 50 mM, primero utilizando RebH-RebF como control positivo. Para dicho análisis se prepararon 2mL de reacción conteniendo 0.1 g cél/mL (crecidas en tubo con 5 mL de LB + antibiótico, lavándolas por último con suero fisiológico (9g/L)), NaCl 100 mM, glucosa 20%, buffer 500 mM (1.5 mL para reacción con sustrato y 1.8 mL en ausencia de este), la cual se dejó en agitador orbital a 25 °C, 150 rpm. Se preparó un control de células para cada reacción de biotransformación, conteniendo solamente las células y los demás componentes nombrados, y un estándar sustrato donde se contaba con triptófano 50 mM disuelto en buffer KPi pH 7.2 sin contener células. El análisis de los crudos de reacción se analizó por High-performance liquid chromatography with diode-array detection (HPLC-DAD) para evidenciar la formación de nuevos productos en comparación con los controles de reacción correspondientes (control de sustrato y de medio de cultivo).

Posteriormente se testearon nuestras cepas transformadas en *E. coli* BL21(DE3) en la biotransformación de triptófano 50mM utilizando el lisado celular de estas, como también el lisado de las células transformadas conteniendo la ferredoxina reductasa y otro con glucosa deshidrogenasa (todas 1 g cél en 10 mL de buffer 500 mM). Los lisados se obtuvieron por sonicado 2.5'' ON y 1,5'' OFF en un total de veces que quedase 60'' ON. Se prepararon 5 mL de reacción conteniendo el sobrenadante del lisado 0.1 mM, FDH100 mM, GDH 12.5 mM, sustrato 1 mM, MgCl₂ 100 mM, NADH 100 mM, NaCl 100 mM, glucosa 20% en buffer 500 mM (Shepherd et al., 2015).

Se probaron distintos métodos con una columna Eclipse XDB-C18 (4.6mm ID x 250mm (5um)), precolumna Restek C18 equipado con inyector automático, horno termostatzado para la columna y un detector de arreglo de diodos para el rango UV-vis. La temperatura del horno se fijó a 25°C, el volumen de inyección fue de 20µL y el tiempo total de la corrida fue de 22 min usando como fase móvil un gradiente de solventes compuesto de 0.1% H_2O_{MQ} (1% v/v $HCOOCH$) (solvente A) y metanol (MeOH) (solvente B) a un flujo de 0.6 mL/min). El gradiente comenzó con 5% de B

por 3 min, luego subió a 8% y se mantuvo por 5min, luego subió a 80% por 4 min, luego hasta 90% por 3 min, bajó a 5% en 3 min, manteniéndose constante por 7 min. El cromatograma se analiza a 270nm utilizando el Software LabSolutions para obtener el área de los picos de interés, ya que es uno de los máximos de absorción del triptófano.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Identificación de nuevas secuencias de halogenasas no caracterizadas en base de datos y detección de motivos conservados en secuencias de halogenasas dependientes de FAD (FDH)

Contando con todas las secuencias consideradas suficientes se construyó un árbol filogenético (**Figura 11**) utilizando el Software Geneious®, para analizar qué grupos se formaban y qué relación en términos de distancia tenían todas las secuencias respecto de las que se encontraban reportadas en literatura, utilizándose un total de 88 secuencias.

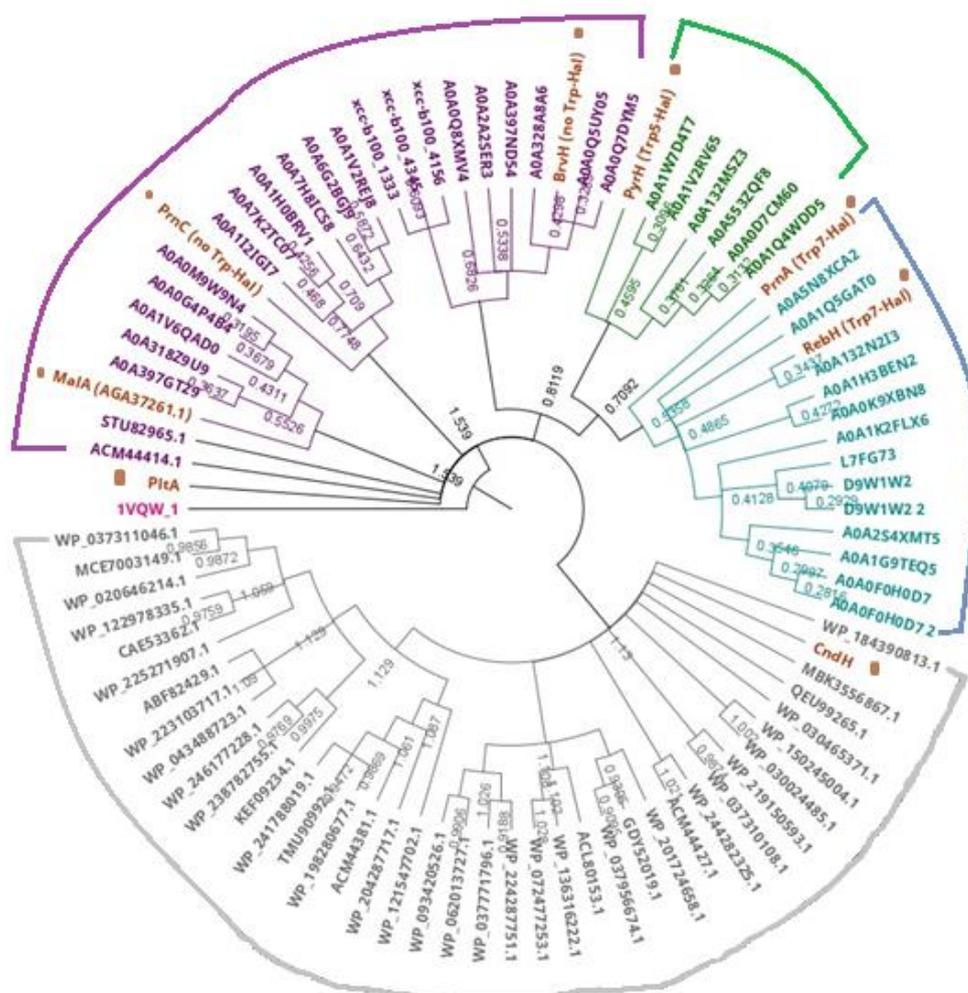


Figura 11: Árbol filogenético de secuencias de microorganismos obtenidas en literatura. En marrón se resaltan las FDH más descritas, en rosado el outgroup, y cada grupo formado del árbol se coloreó diferente: Celeste: Trp7-Hal, Verde: Trp6-Hal, Violeta: No Trp-Hal, Gris: Otras halogenasas.

A partir de la obtención del árbol y la división de los nodos obtenidos se pudo contar con grupos lo suficientemente separados, algunos conteniendo halogenasas con diferentes regioselectividades frente a la halogenación, otros siendo característicos por ser dependientes de proteína carrier, u otro que no acepta triptofano como sustrato. Esto nos permitió que la posterior adición de nuestras secuencias de interés, fuesen más informativas las características de estas según la posición en que se adicionasen.

Se utilizó la herramienta Pratt del Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL-EBI) para analizar secuencias conservadas como se puede ver a continuación, donde “x” es cualquier aminoácido:

Grupo BrvH:

G-x-F-x-R-Y-R-W-E-M-F-x-P-x-S-W-L-A-x-Y-x-G-F-x(3)-P-x(4)-P

Grupo MalA:

C-x(2)-C-G-x-W-L-x(2)-R-x-D-W-x(2)-C-x(2)-C-G-x(4)-E-x(3)-A-x-T-x(2)-P-P-L-x(2,3)-
E-x(2)-A-L-x(2)-A

Grupo PrnC:

V-x-T-x-R-L-Q-x-S-x(4)-V-G-x-R-x-C-x(3)-H-A-x-G-F-x-D-x-L-x-S-R-G-x(2)-N

Grupo PyrH:

D-E-x(3)-Y-P-x-Y-H-G-F-E-x-Y-S-W-x-T-M-x(2)-G-L-G-x(2,4)-R-x(1,3)-R-P-x-L-x(3)-D-
P-x(2)-A

Grupo RebH y PrnA:

F-N-x-E-x(3)-M-F-D-D-x-R-D-F-x-Q-A-H-x(5)-R-x-D-x(2)-F-W-x-A-x(3,4)-L-x-L

En Geneious® se analizó la presencia de aminoácidos esenciales de las FDH publicados en literatura en las halogenasas de referencia (Dong et al., 2005d). Los mismos se basan en la secuencia de PrnA, es por esto que en las demás halogenasas las posiciones pueden llegar a

variar, como se ve en la **Tabla 3**. Esto también puede llegar a explicar la diversidad de regioselectividad y estereoselectividad que se da en la halogenación.

Tabla 3. Posición de aminoácidos esenciales de las FDH de referencia.

Aminoácido	K79	H101	F103	W272	W274	I276	P277	E346	S347
Halogenasa									
BrvH	K85	H102	F104	W277	W279	I281	P282	E351	S352
MalA	K78	-	-	W263	W265	I267	-	E442	S443
PrnC	K79	-	-	W249	W251	I253	P254	-	-
PyrH	K75	-	-	W279	W281	I283	P284	E354	S355
RebH	K79	H109	F111	W282	W284	I286	P287	E357	E358

4.2 Aplicar minería genómica para la búsqueda de halogenasas en genomas de cepas nativas de *Streptomyces*.

Luego de realizar lo planteado en 3.3, se observó que en todos los casos las secuencias de los ORFs solamente se encontraban secuenciadas, pero no identificadas. Únicamente en el caso de PrnC el ORF obtenido en el contig 2 de la cepa 2206 y el contig 4 de la cepa MAI2300 se encontró que figuraba un artículo donde solo se nombraba dicha halogenasa (Hammer et al., 1999.).

Tomando en cuenta los valores considerados anteriormente se vio que los ORFs con mejores resultados se obtenían cuando se alineaban los genomas de *Streptomyces* con las halogenasas PrnA, RebH y BrvH, como se ve en la **Tabla 4**. Esto es coherente si lo comparamos con lo obtenido en el segundo árbol filogenético construido, ya que nuestras cepas se encuentran dentro del grupo de estas tres halogenasas (**Figura 13**).

Tabla 4. Valores de Query coverage e identificación de halogenasas reportadas con los genomas de *Streptomyces*.

Halogenasa	Contig	Query coverage (%)		%Identificación	
		1	1	1	1
PrnA		96.84	95.72	55.8	55.6
PrnC		63.67	63.32	23.8	26.7
BrvH		96.67	90.41	33.8	35.6
PyrH		99.80	99.80	23,1	28.5
MalA		53.82	-	25.1	-
RebH		99.62	99.25	65.3	67.9

Para tener un mejor rendimiento se modificaron las secuencias de los ORFs de cada cepa, esto se vio necesario al alinear la cepa 2321 con la secuencia de PyrH, cambiando una guanina por una adenina en la posición 3.305.344 del contig 1 debido a que el codón de inicio GTG presente (el cual es alternativo) es menos reconocido por *E. coli* que el codón ATG, la corrección puede verse en la **Figura 12**.

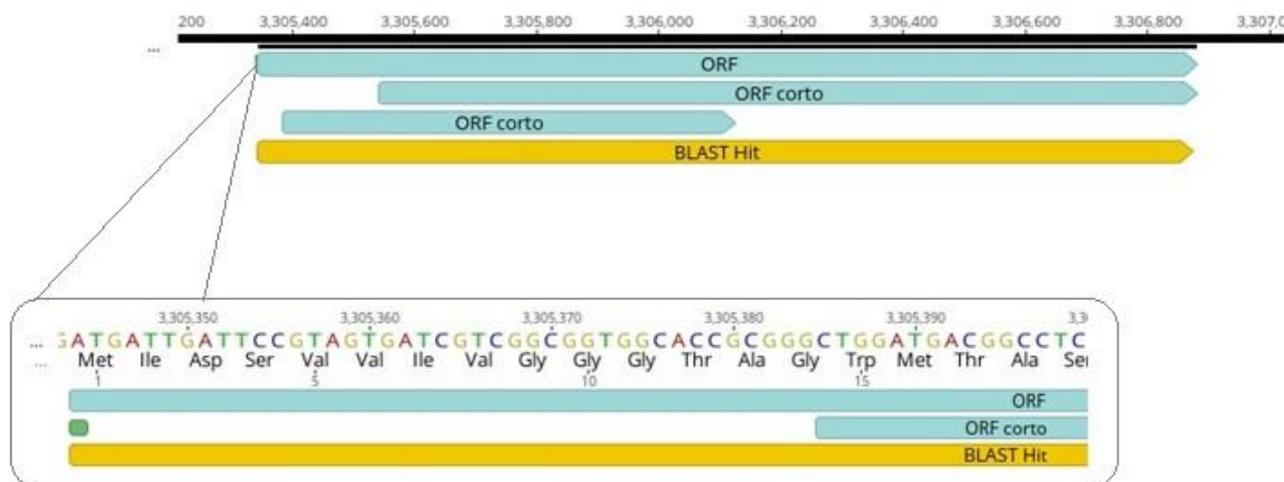


Figura 12. BLAST de cepa 2321 utilizando la halogenasa PyrH como referencia (amarillo), ORF obtenido tras cambio nucleotídico (“ORF”) y ejemplos de los que se obtenían sin haber hecho cambio (“ORF corto”). La barra verde muestra la mutación nucleotídica puntual realizada.

Las cepas de *Streptomyces* que presentaron los valores establecidos para tomar las zonas determinadas por BLAST como posibles genes de halogenasas se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Cepas que posiblemente contienen las halogenasas PrnA, BrvH, etc

Halogenasa	PrnA	BrvH	RebH
contig			
1		MAI2213	
1		MAI2274	
1		2321	
13		2231	

Se analizaron zonas conservadas reportadas para cada tipo de halogenasas descritas por el grupo de Jeon et al., 2021, y los resultados se muestran en la **Tabla 6**. Los resultados muestran que 4 cepas presentan potencial actividad halogenasa, siendo dos posibles 7-Trp-Hals y dos 5-Trp-Hals.

Tabla 6. Motivos conservados de halogenasas con distinta regioselectividad encontrados en las cepas de *Streptomyces*.

Cepa	Motivo				Regioselectividad para Trp
MAI2274	ATVPNL	HPFGL	-	YYGNFEAEFRNFWTNGSYY	7
MAI2213					
2231	ATFSTV	HPFER	QATQ	HYHGFEAYS	5
2321			QRAQ	YYHGFESYS	

Con esta información se construyó un nuevo árbol filogenético conteniendo las cepas nombradas anteriormente, como se ve en la **Figura 13**.

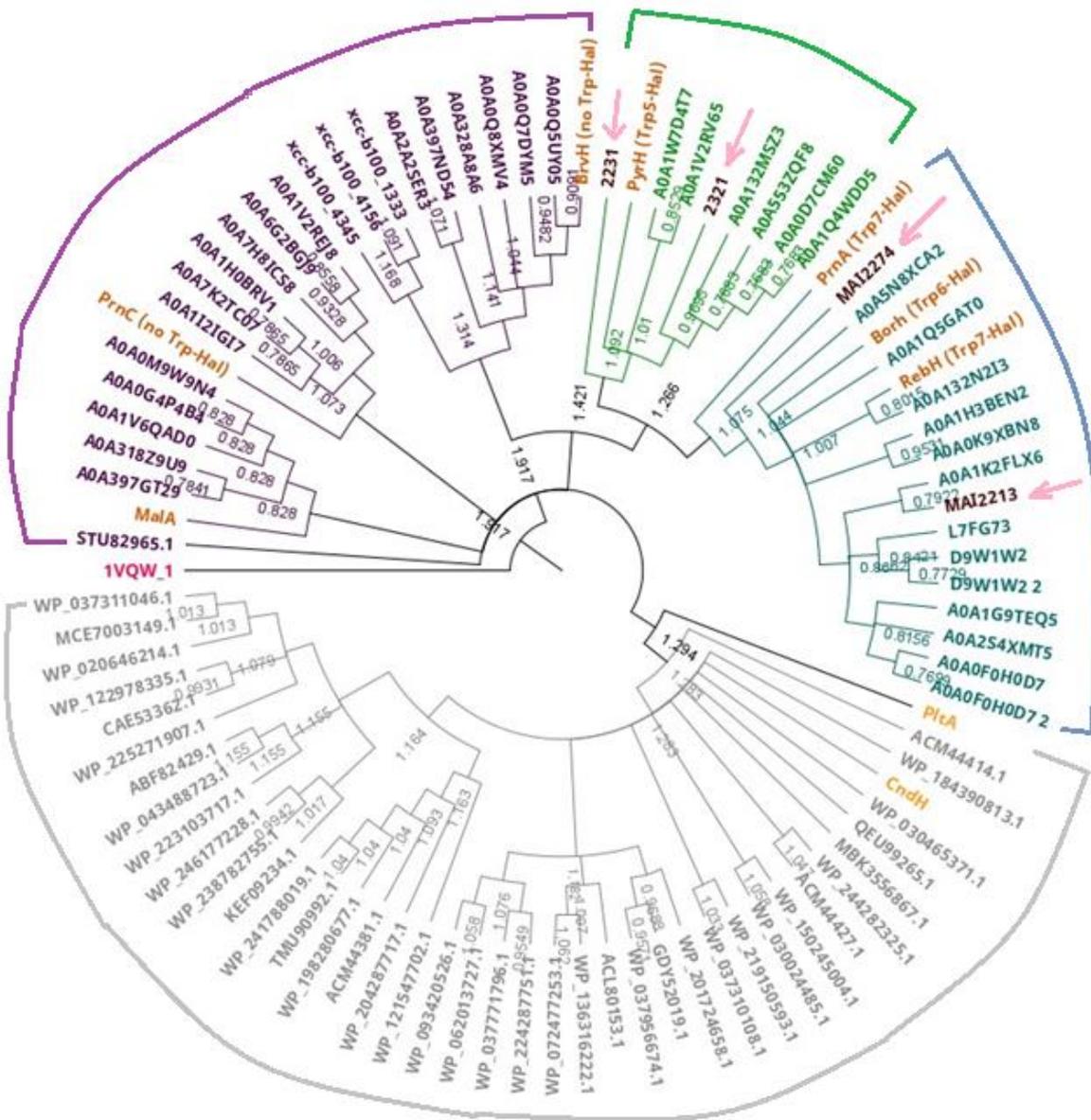


Figura 13. Árbol filogenético conteniendo las cepas de *Streptomyces* con potencial actividad halogenasa (flechas rosadas).

Se observa que las cuatro cepas estudiadas tienen predicciones concordantes. Las cepas MAI2213 y MAI2274 se agrupan en un nodo que contiene una variedad de Trp-6-Halogenasas, donde también se encuentra BorH, conocida por la literatura como una Trp-6-Halogenasa, y también se encuentran junto a RebH que es Trp-7-Hal. Por otro lado, las cepas 2231 y 2321 se agrupan en un nodo que contiene Trp-5-Halogenasas, como la halogenasa PyrH. También queda confirmado que las cepas no son

dependientes de carrier ya que ninguna se posiciona cerca del nodo en donde están las halogenasas PltA o CndH.

4.3 Construir y optimizar sistemas de expresión adecuados para los genes seleccionados en cepas recombinantes de *Escherichia coli*.

Mediante el Software Geneious® se logró diseñar un vector en el cual se insertaron las cuatro cepas por separado en el vector pET-28a(+). Se agregó un codón TGA en el extremo 3' y antes del extremo 5' se agregó la zona His-Tag en forma de reverso complementario previendo la posible purificación de la proteína.

Ejemplo de la construcción de vectores se ven en la **Figura 14**. Se sintetizaron a través de la empresa GenScript los 6 vectores pET-28a(+), para cada una de las cuatro halogenasas seleccionadas (2321, 2231, MAI2213 y MAI2274), la variante de MAI2213 con las mutaciones indicadas en (3.4), y el control positivo conteniendo los genes de la halogenasa RebH con un linker a la reductasa RebF (Andorfer et al., 2017). Además, se sintetizó el plásmido conteniendo los genes de la ferredoxina reductasa en el vector pMAL-c5E debido a que contiene la proteína de unión a maltosa (MBP) como buena chaperona para la enzima.

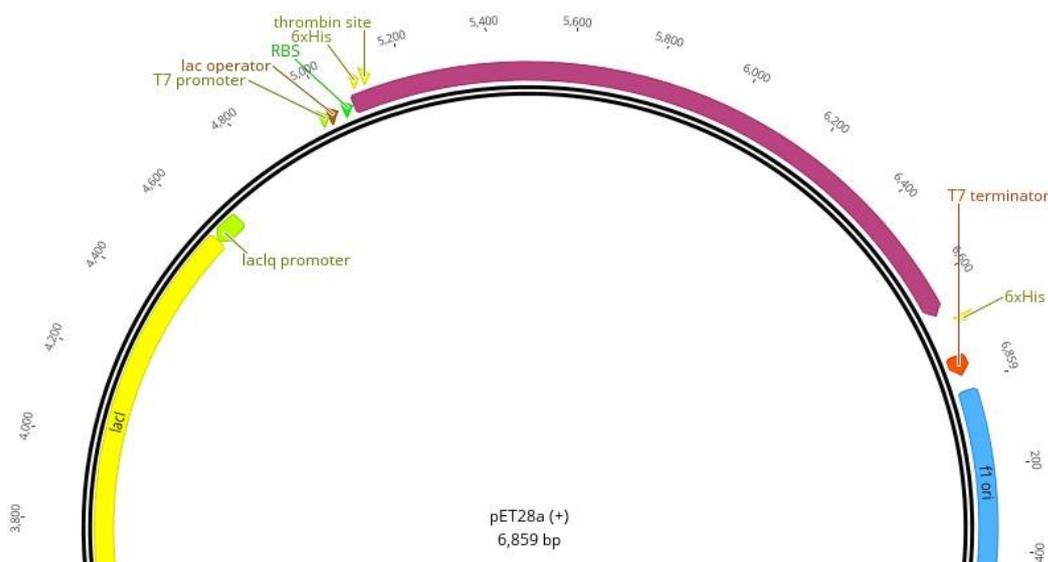


Figura 14. Construcción de vector pET-28a (+) con inserto de gen 2231 (violeta)

4.4 Aislamiento de plásmido pACYC-GroEL/ES-TF

El plásmido obtenido según lo descrito en (3.5) a partir de las cepas *E. coli* DH5 α , se evaluó mediante SDS-PAGE sembrando 1 uL de muestra y 1 uL de loading buffer. Al agregar antibiótico cloranfenicol al medio, solo las células que portan el plásmido con el gen de resistencia sobreviven. Al revelar el gel se observó solamente la banda del plásmido mostrando que se purificó correctamente, como se ve en la **Figura 15**.

A su vez se visualizaron dos bandas, lo cual puede hacer referencia a distintos niveles de superenrollamiento del ADN, en el cual las hebras giran en torno al eje de la doble hélice, para perder o ganar torsión, y se unen de nuevo los extremos. Cuanto más enrollado se encuentre el plásmido, menor camino atravesará por el gel a diferencia de un plásmido con menor nivel de enrollamiento, aunque ambos tengan el mismo peso.

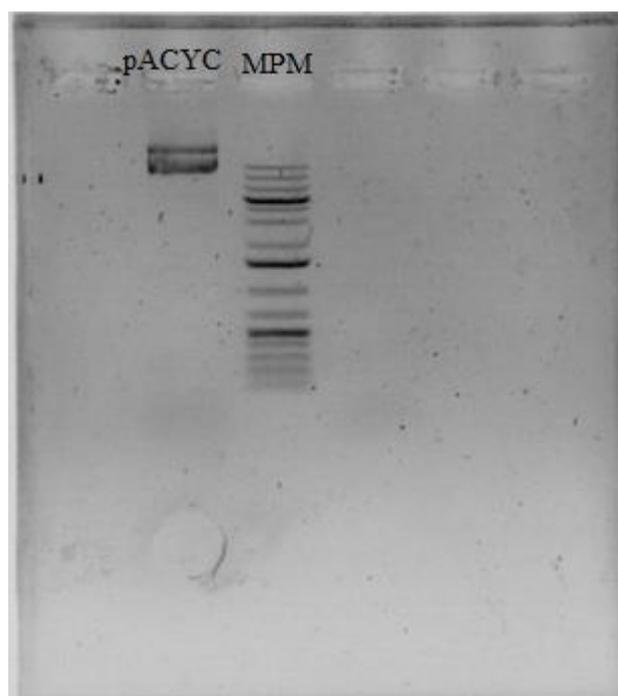


Figura 15. Gel de agarosa 0.8% 30mL.

Se transformó cada plásmido en *E. coli* BL21(DE3) siguiendo el procedimiento descrito en 3.8. Se realizó una masterplate, la cual es una placa conteniendo en este caso medio LB agar con antibióticos correspondientes como método de selección, en donde en

cada cuadrado se siembra una sola colonia que haya crecido en las distintas placas de la dilución de cada transformación.

Se repicaron seis colonias aisladas de cada placa resultante de la transformación de *E. coli* BL21(DE3) con cada uno de los genes de interés (**Figura 16**) para asegurarse de que en esa placa solamente contara con las células que contenían el plásmido puras. Se confirmó por medio de cada masterplate que las colonias que contenían el plásmido crecieron correctamente, y estas fueron utilizadas para realizar posteriormente expresiones de cada plásmido.

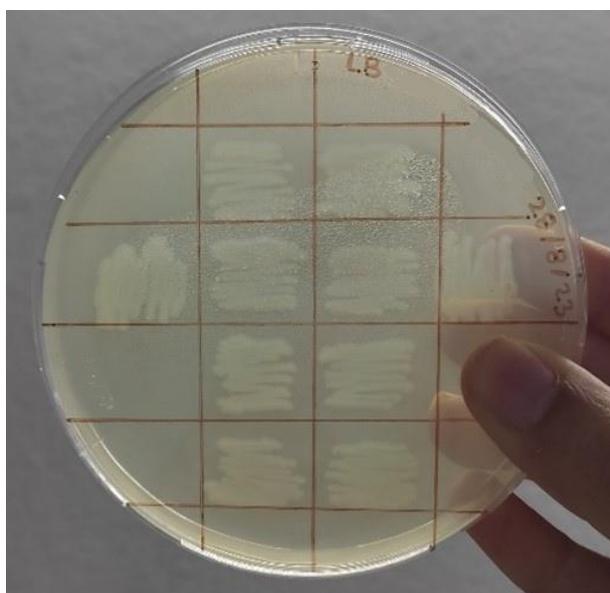


Figura 16. Masterplate de *E. coli* BL21(DE3) transformada con plásmido pET-28a(+) y pACYC-GroEL/ES-TF, crecida en LB agar con kanamicina y cloranfenicol.

4.5 Transformación de células con sistemas de expresión contruidos

Se prepararon los materiales para transformar células competentes de las cepas *E. coli* TOP10 y *E. coli* BL21(DE3) siguiendo el procedimiento (3.8) y utilizando los antibióticos kanamicina 50mg/mL y cloranfenicol 25mg/mL para todas las células transformadas conteniendo el vector pET-28a(+) con la chaperona en el vector pACYC-GroEL/ES-TF y ampicilina para cuando solo se tenía vector pMAL-c5E (reductasa RebF).

Se preparó un volumen final de 80 uL utilizando agua MQ partiendo de cada muestra liofilizada conteniendo los vectores para tener una concentración final de 50 ng/mL. Dejando las placas en estufa a 37 °C por 24 horas se obtuvieron los resultados vistos en **Tabla 7**.

Tabla 7. Características morfológicas de colonias transformadas

Cepa	Características de la colonia
<i>E. coli</i> TOP10 pET-28a(+) (2321 Hal)	Colonias grandes redondas, estrelladas y algunas pequeñas
<i>E. coli</i> TOP10 pET-28a(+) (2231 Hal)	Colonias grandes redondas, estrelladas y algunas pequeñas
<i>E. coli</i> TOP10 pET-28a(+) (MAI2213 Hal)	Colonias grandes redondas y pequeñas
<i>E. coli</i> TOP10 pET-28a(+) (MAI2274 Hal)	Colonias grandes redondas y pequeñas
<i>E. coli</i> TOP10 pET-28a(+) (MAI2213 Hal) V55I, P114L y S473N	Colonias grandes de forma intermedia entre redonda y estrellada, otras pequeñas
<i>E. coli</i> TOP10 pET-28a(+) (RebH-RebF Hal)	Colonias grandes redondas y pequeñas
<i>E. coli</i> TOP10 pET-28a(+) (FADreductasa)	Colonias grandes redondas, estrelladas y algunas pequeñas
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pET-28a(+) (2321 Hal)	Medianas redondas
<i>E. coli</i> BL21(DE3)(DE3) pET28a(+) (2231 Hal)	Colonias grandes redondas, estrelladas

<i>E. coli</i> BL21(DE3) pET-28a(+) (MAI2213 Hal) V55I, P114L y S473N	Redondas medianas y pequeñas
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pET-28a(+) (RebH-RebF Hal)	Colonias grandes redondas, estrelladas

Se prepararon masterplates con seis espacios, siendo tres para colonias grandes redondas y tres para colonias pequeñas, no se tomaron en cuenta las colonias estrelladas para mantener similitud en el borde de la colonia, aunque variase el tamaño. Todas las placas crecieron correctamente, sin presentarse contaminación, es decir haber visto crecimientos anómalos en cada espacio o colonias por fuera de estos, mostrando que lo que se sembró en cada placa contenía el plásmido de interés. Cada cepa (tanto de TOP10 como BL21(DE3)) se almacenó en criotubo a -70°C.

4.6 Análisis de expresión de proteínas

Se presentaron dificultades a la hora de separar la fase soluble de la insoluble, aún centrifugando repetidas veces, y en algunos casos agregando DNAsa y RNAsa.

Las muestras se prepararon como se especifica en (3.9). Primero se hizo gel para muestras MAI2213, 2321, y el control con y sin inducción, crecidas en medio AIM (**Figura 17**). Luego en otro gel se sembraron las mismas muestras, pero crecidas en medio LB (**Figura 18**).

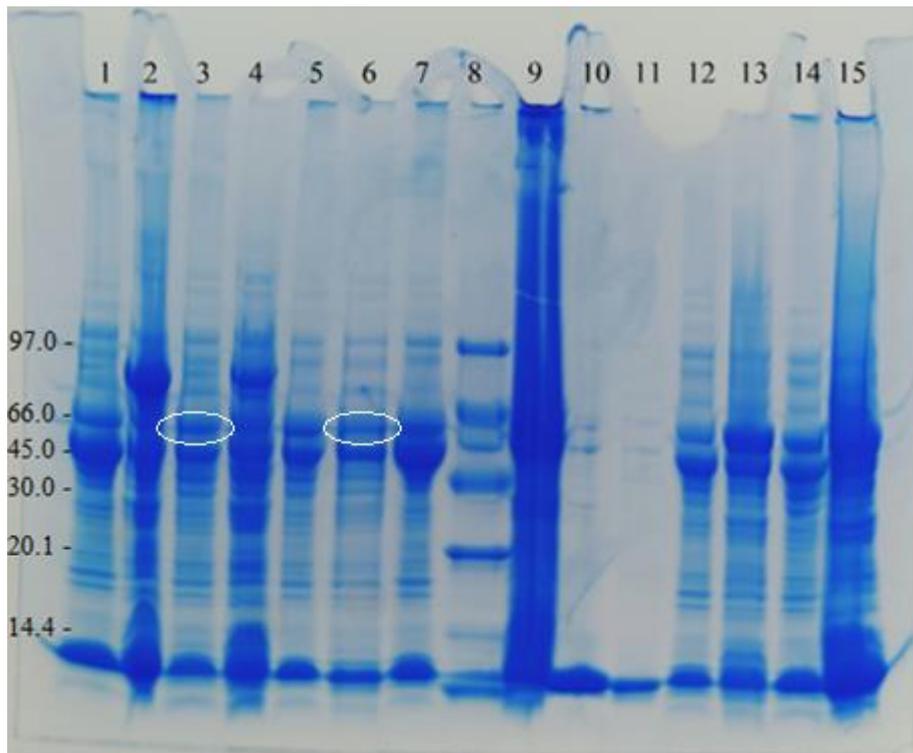


Figura 17. Gel de poliacrilamida muestras crecidas en AIM. **1-** RebH-RebF 28°C fs / **2-** RebH-RebF 28°C fi / **3-** RebH-RebF 20°C fs / **4-** RebH-RebF 20°C fi / **5-** 2321 20°C fs / **6-** 2321 20°C fi / **7-** 2321 28°C fs / **8-** Marcador de peso moelcular (MPM) / **9-** 2321 28°C fi / **10-** RebH-RebF antes de inducir / **11-** MAI2213 28°C fs / **12-** MAI2213 28°C fi / **13-** MAI2213 20°C fs / **14-** MAI2213 20°C fi. Se muestran los valores de las bandas del MPM a la izquierda de la figura y encerradas en blanco ejemplos de las bandas que hacen referencia a las proteínas de interés.

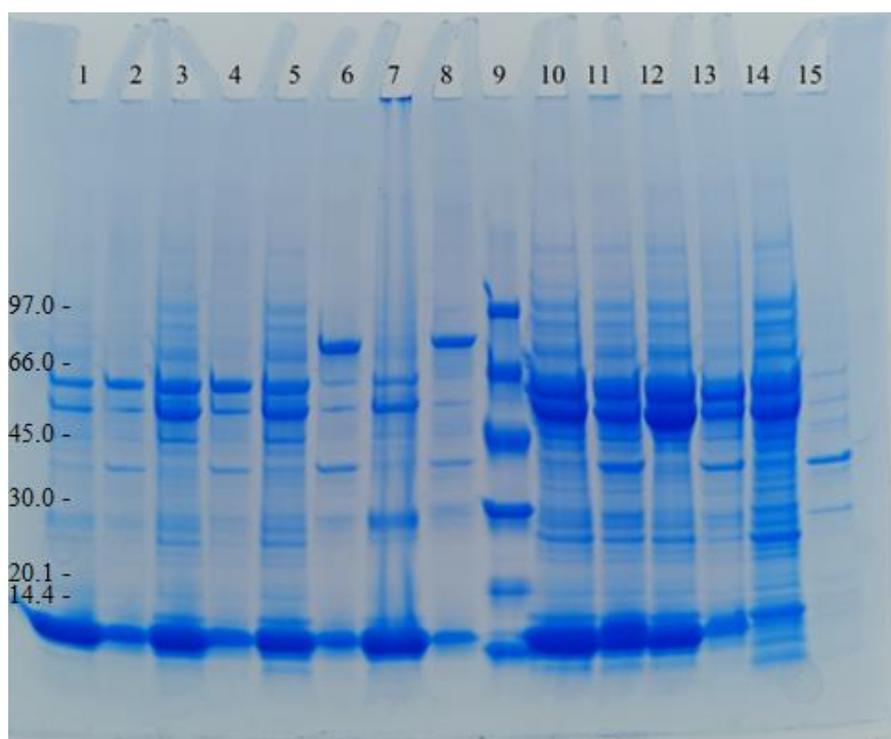


Figura 18. Gel de poliacrilamida muestras crecidas en AIM. **1-** MAI2213 20°C fs / **2-** MAI2213 20°C fi / **3-** MAI2213 28°C fs / **4-** MAI2213 28°C fi / **5-** RebH-RebF 20°C fs / **6-** RebH-RebF 20°C fi / **7-** RebH-RebF 28°C fs / **8-** RebH-RebF 28°C fi / **9-** Marcador de peso molecular (MPM) / **10-** 2321 20°C fs / **11-** 2321 20°C fi / **12-** 2321 28°C fs / **13-** 2321 28°C fi / **14-** C- s / **15-** C- i. Se muestran los valores de las bandas del MPM a la izquierda de la figura.

En el análisis de los geles, la banda correspondiente a la chaperona tiene un peso molecular (PM) muy similar al de nuestros genes de interés, de aproximadamente 60 kDa. Esta similitud complica la diferenciación entre estas proteínas. No obstante, es posible observar bandas claras y de tamaño considerable utilizando el marcador de peso molecular como referencia. Esto nos permite concluir que existe una posible expresión de las proteínas. Para profundizar en nuestro estudio, preparamos dos geles distintos para las muestras etiquetadas como 2321, MAI2274 y FAD_{reductasa}, utilizando un gel diferente para cada medio de cultivo en que se desarrollaron (presentados en las **Figuras 19 y 20**). Dado que las muestras se observaron demasiado concentradas en el gel de la Figura 17, decidimos diluirlas a la mitad para esta ocasión. Como control negativo, empleamos la cepa de *E. coli TUNER* transformada con los vectores pACYC y pET22, sin ningún inserto de ADN.

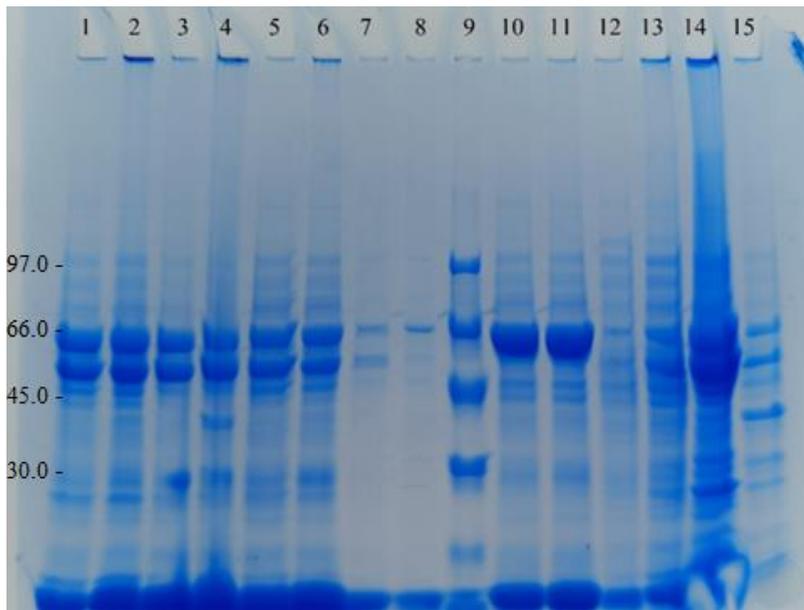


Figura 19. Gel de poliacrilamida muestras crecidas en AIM. **1-** 2231 20°C fs / **2-** 2231 20°C fi / **3-** 2231 28°C fs / **4-** 2231 28°C fi / **5-** MAI2274 20°C fs / **6-** MAI2274 20°C fi / **7-** MAI2274 28°C fs / **8-** MAI2274 28°C fi / **9-** Marcador de peso molecular (MPM) / **10-** FADr 20°C fs / **11** FADr 20°C fi / **12-** FADr 28°C fs / **13-** FADr 20°C fi / **14-** C- fs / **15-** C-fi. Se muestran los valores de las bandas del MPM a la izquierda de la figura.

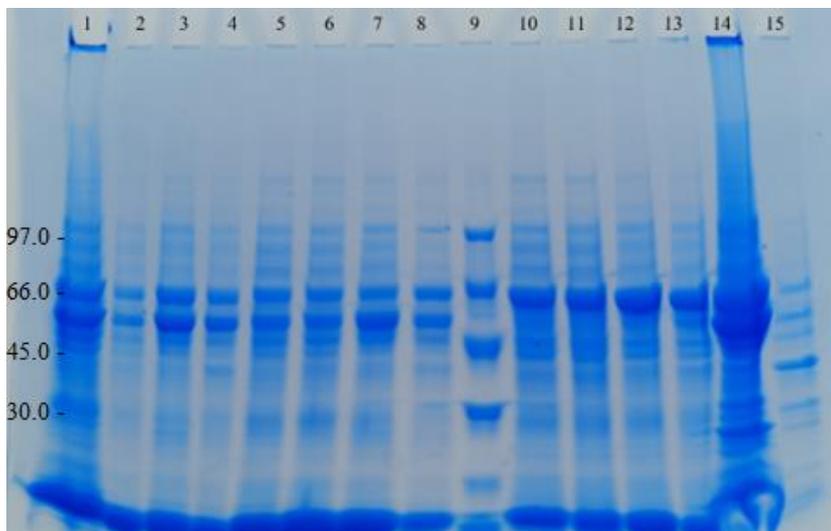


Figura 20. Gel de poliacrilamida muestras crecidas en LB. **1-** 2231 20°C fs / **2-** 2231 20°C fi / **3-** 2231 28°C fs / **4-** 2231 28°C fi / **5-** MAI2274 20°C fs / **6-** MAI2274 20°C fi / **7-** MAI2274 28°C fs / **8-** MAI2274 28°C fi / **9-** Marcador de peso moelcular (MPM) / **10-** FADr 20°C fs / **11** FADr 20°C fi / **12-** FADr 28°C fs / **13-** FADr 20°C fi / **14-** C- fs / **15-** C-fi. Se muestran los valores de las bandas del MPM a la izquierda de la figura.

En el análisis de los geles, observamos que la expresión era vista en ambos medios, pero sobre todo en el AIM. El control positivo RebH-RebF muestra una leve expresión a 20°C en el medio AIM, aunque existe una alta expresión insoluble. Además, aunque la expresión es predominante a 28°C, también es notable a 20°C. Basándonos en estos resultados, decidimos escalar la producción cultivando las células en matraces de 500 mL con 100 mL de medio AIM, replicando el proceso para asegurar una cantidad suficiente de células. Además, optamos por establecer una temperatura intermedia de 25°C para nuestros estudios de biotransformación, buscando un equilibrio óptimo entre la expresión y la estabilidad de las proteínas.

4.7 Estudio de Halogenación

Se llevó a cabo un estudio para analizar la halogenación del triptófano utilizando una cepa que expresa RebH, empleada como control positivo para evaluar la halogenación. En el experimento se incluyeron diversas muestras: un control de células, un estándar de triptófano a una concentración de 1 mg/mL, y un vial correspondiente a la reacción de halogenación. Estos componentes se detallan en la **Figura 25**.

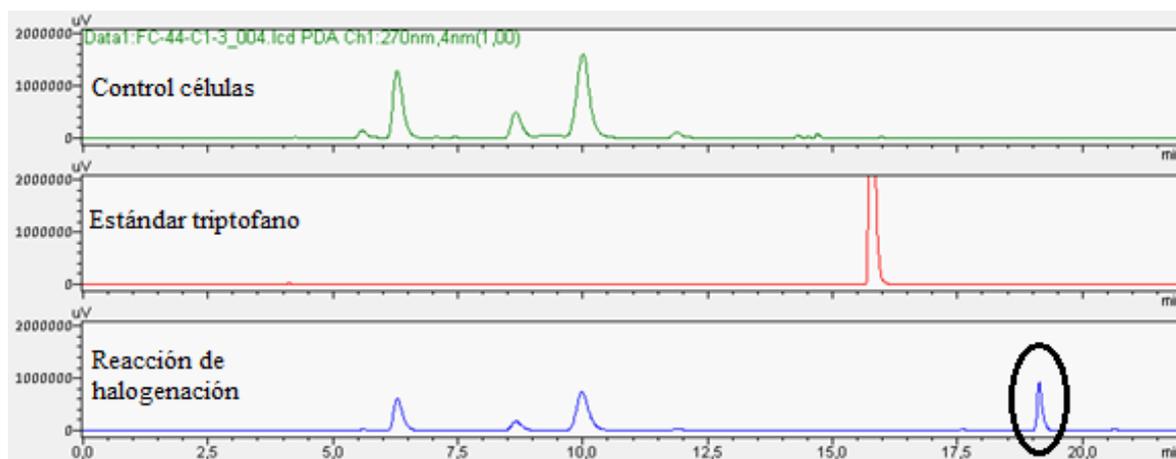


Figura 21. Cromatograma del crudo de la biotransformación utilizando RebH-RebF y los correspondientes controles. Círculo negro: posible producto.

En el análisis espectrométrico, los resultados revelaron diferentes patrones de picos para cada muestra. En el espectro del control de células (verde), se observaron picos a

los 6.5, 8.7, y 12 minutos. Por otro lado, el estándar de triptófano (negro) mostró un pico a los 16 minutos. La muestra de la reacción presentó todos los picos anteriormente mencionados, como además uno a los 19.3 minutos, el cual no figura en los controles y es por tanto considerado un posible producto halogenado.

Se realizó también la biotransformación del lisado de cuatro cepas distintas (2321, 2231, MAI2213, y MAI2274), de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección 3.10. Los resultados mostraron picos en los mismos tiempos de retención que los observados en la biotransformación con las enzimas RebH-RebF. En todas las biotransformaciones realizadas con las cuatro cepas, se observó un pico que coincide con el posible producto halogenado ya que tiene el mismo tiempo de retención, lo que sugiere una actividad consistente entre las cepas. Estos hallazgos se detallan en la **Figura 22**.

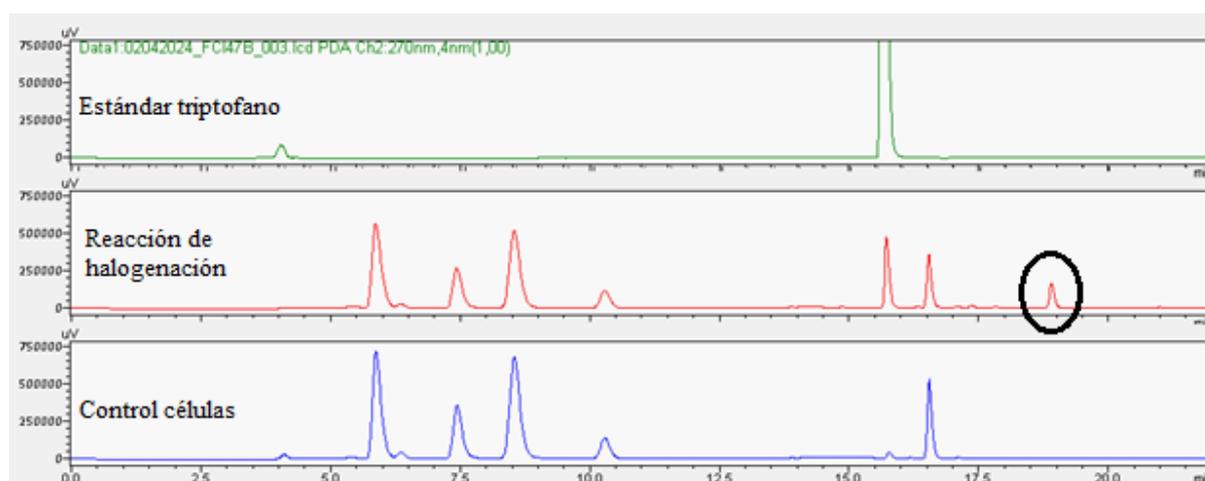


Figura 22. Cromatograma de la biotransformación utilizando MAI2274 (rojo) y los correspondientes controles: verde: estándar triptófano, azul: control células.

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Esta tesis ha contribuido significativamente a la biotecnología al identificar cuatro halogenasas en cepas nativas de *Streptomyces* a través de minería genómica. Logramos clonar estas enzimas en vectores pET-28a(+) y expresarlas en *E. coli* BL21(DE3) recombinante. Las pruebas de actividad halogenasa en extractos crudos de estas cepas mostraron resultados prometedores, con bandas de expresión claras en geles de poliacrilamida que corresponden a los pesos moleculares de los genes estudiados. La purificación y caracterización exhaustiva de estas enzimas permitirá evaluar su potencial para el desarrollo de productos comerciales. Los estudios mediante HPLC sugieren que las cepas pueden halogenar el núcleo indólico del triptófano, sugiriendo que estas halogenasas son biocatalizadores efectivos para la biotransformación del sustrato. Para confirmar la estructura y posición de la halogenación en el triptófano, se realizarán análisis adicionales utilizando espectroscopía de masas y resonancia magnética nuclear (RMN).

Estos hallazgos indican que las cepas de *Streptomyces spp.* nativas poseen un gran potencial para la producción de compuestos halogenados. Los datos obtenidos también subrayan el potencial de estos microorganismos para desarrollar biocatalizadores que podrían emplearse en la síntesis de compuestos indólicos psicodélicos y sus derivados. Este trabajo no solo amplía nuestro conocimiento sobre las capacidades enzimáticas de las cepas de *Streptomyces* nativas, sino que también contribuye al desarrollo de nuevas tecnologías en biocatálisis.

En etapas futuras, exploraremos también otros sistemas de expresión, como el sistema pBAD para el cual ya se ha diseñado los primers. Además, mejorar los métodos de concentración de las enzimas, por ejemplo, mediante liofilización, y desarrollar un protocolo para su purificación son pasos críticos para aumentar la actividad enzimática y facilitar estudios más detallados.

BIBLIOGRAFÍA

- Ainsley, J., Mulholland, A. J., Black, G. W., Sparagano, O., Christov, C. Z., & Karabancheva-Christova, T. G. (2018). Structural Insights from Molecular Dynamics Simulations of Tryptophan 7-Halogenase and Tryptophan 5-Halogenase. *ACS Omega*, 3(5), 4847–4859. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00385>
- Alonso, F., Beletskaya, I. P., & Yus, M. (2002). Metal-Mediated Reductive Hydrodehalogenation of Organic Halides. *Chemical Reviews*, 102(11), 4009–4092. <https://doi.org/10.1021/cr0102967>
- Andorfer, M. C., Belsare, K. D., Girlich, A. M., & Lewis, J. C. (2017). Aromatic Halogenation by Using Bifunctional Flavin Reductase–Halogenase Fusion Enzymes. *ChemBioChem*, 18(21), 2099–2103. <https://doi.org/10.1002/cbic.201700391>
- Anne Zaparucha, Véronique de Berardinis, C. V. V. (2018). Chapter 1: Genome mining for enzyme discovery. In *Modern Biocatalysis: Advances Towards Synthetic Biological systems* (pp. 1–27). <https://doi.org/10.1039/9781788010450-00001>
- Bornscheuer, U. T. (2018). The fourth wave of biocatalysis is approaching. In *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* (Vol. 376, Issue 2110). Royal Society Publishing. <https://doi.org/10.1098/rsta.2017.0063>
- Borodovsky, M., Ruddl, K. E., & Koonin, E. V. (1994). Intrinsic and extrinsic approaches for detecting genes in a bacterial genome. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 22, Issue 22).
- Büchler, J., Papadopoulou, A., & Buller, R. (2019a). Recent advances in flavin-dependent halogenase biocatalysis: Sourcing, engineering, and application. In *Catalysts* (Vol. 9, Issue 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/catal9121030>

- Büchler, J., Papadopoulou, A., & Buller, R. (2019b). Recent advances in flavin-dependent halogenase biocatalysis: Sourcing, engineering, and application. In *Catalysts* (Vol. 9, Issue 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/catal9121030>
- Buedenbender, S., Rachid, S., Müller, R., & Schulz, G. E. (2009a). Structure and Action of the Myxobacterial Chondrochloren Halogenase CndH: A New Variant of FAD-dependent Halogenases. *Journal of Molecular Biology*, 385(2), 520–530. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.10.057>
- Buedenbender, S., Rachid, S., Müller, R., & Schulz, G. E. (2009b). Structure and Action of the Myxobacterial Chondrochloren Halogenase CndH: A New Variant of FAD-dependent Halogenases. *Journal of Molecular Biology*, 385(2), 520–530. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.10.057>
- Challis, G. L. (2008). Genome mining for novel natural product discovery. In *Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 51, Issue 9, pp. 2618–2628). <https://doi.org/10.1021/jm700948z>
- Corne, R., & Mongeau, R. (2019). Utilisation des psychédéliques en psychiatrie : lien avec les neurotrophines. In *Biologie aujourd'hui* (Vol. 213, Issues 3–4, pp. 121–129). NLM (Medline). <https://doi.org/10.1051/jbio/2019015>
- Croce, V., López-Radencio, A., Lapaz, M. I., Pianzola, M. J., Moyna, G., & Siri, M. I. (2021). An Integrative Approach for the Characterization of Plant-Pathogenic *Streptomyces* spp. Strains Based on Metabolomic, Bioactivity, and Phylogenetic Analysis. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.643792>
- Crowe, C., Molyneux, S., Sharma, S. V., Zhang, Y., Gkotsi, D. S., Connaris, H., & Goss, R. J. M. (2021a). Halogenases: A palette of emerging opportunities for synthetic biology-synthetic chemistry and C-H functionalisation. *Chemical Society Reviews*, 50(17), 9443–9481. <https://doi.org/10.1039/d0cs01551b>
- Crowe, C., Molyneux, S., Sharma, S. V., Zhang, Y., Gkotsi, D. S., Connaris, H., & Goss, R. J. M. (2021b). Halogenases: A palette of emerging opportunities for

synthetic biology-synthetic chemistry and C-H functionalisation. *Chemical Society Reviews*, 50(17), 9443–9481. <https://doi.org/10.1039/d0cs01551b>

Domergue, J., Erdmann, D., Fossey-Jouenne, A., Petit, J. L., Debard, A., de Berardinis, V., Vergne-Vaxelaire, C., & Zaparucha, A. (2019). XszenFHal, a novel tryptophan 5-halogenase from *Xenorhabdus szentirmaii*. *AMB Express*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0898-y>

Dong, C., Flecks, S., Unversucht, S., Haupt, C., Van Pée, K. H., & Naismith, J. H. (2005a). Structural biology: Tryptophan 7-halogenase (PrnA) structure suggests a mechanism for regioselective chlorination. *Science*, 309(5744), 2216–2219. <https://doi.org/10.1126/science.1116510>

Dong, C., Flecks, S., Unversucht, S., Haupt, C., Van Pée, K. H., & Naismith, J. H. (2005b). Structural biology: Tryptophan 7-halogenase (PrnA) structure suggests a mechanism for regioselective chlorination. *Science*, 309(5744), 2216–2219. <https://doi.org/10.1126/science.1116510>

Dong, C., Flecks, S., Unversucht, S., Haupt, C., Van Pée, K. H., & Naismith, J. H. (2005c). Structural biology: Tryptophan 7-halogenase (PrnA) structure suggests a mechanism for regioselective chlorination. *Science*, 309(5744), 2216–2219. <https://doi.org/10.1126/science.1116510>

Dong, C., Flecks, S., Unversucht, S., Haupt, C., Van Pée, K. H., & Naismith, J. H. (2005d). Structural biology: Tryptophan 7-halogenase (PrnA) structure suggests a mechanism for regioselective chlorination. *Science*, 309(5744), 2216–2219. <https://doi.org/10.1126/science.1116510>

Dong, C., Kotsch, A., Dorward, M., Van Pée, K. H., & Naismith, J. H. (2004). Crystallization and X-ray diffraction of a halogenating enzyme, tryptophan 7-halogenase, from *Pseudomonas fluorescens*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 60(8), 1438–1440. <https://doi.org/10.1107/S09074444904012521>

- Dorrestein, P. C., Yeh, E., Garneau-Tsodikova, S., Kelleher, N. L., & Walsh, C. T. (2005a). *Dichlorination of a pyrrolyl-S-carrier protein by FADH 2-dependent halogenase PltA during pyoluteorin biosynthesis*. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0506964102
- Dorrestein, P. C., Yeh, E., Garneau-Tsodikova, S., Kelleher, N. L., & Walsh, C. T. (2005b). *Dichlorination of a pyrrolyl-S-carrier protein by FADH 2-dependent halogenase PltA during pyoluteorin biosynthesis*. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0506964102
- Doss, M. K., Madden, M. B., Gaddis, A., Nebel, M. B., Griffiths, R. R., Mathur, B. N., & Barrett, F. S. (2022). Models of psychedelic drug action: Modulation of cortical-subcortical circuits. In *Brain* (Vol. 145, Issue 2, pp. 441–456). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/brain/awab406>
- Dubendorfft, J. W., & Studier, F. W. (1991). Controlling Basal Expression in an Inducible T7 Expression System by Blocking the Target T7 Promoter with Zac Repressor. In *J. Mol. Biol* (Vol. 219).
- Fisher, B. F., Snodgrass, H. M., Jones, K. A., Andorfer, M. C., & Lewis, J. C. (n.d.). *Site-Selective C-H Halogenation using Flavin-Dependent Halogenases Identified via Family-Wide Activity Profiling*.
- Flecks, S., Patallo, E. P., Zhu, X., Ernyei, A. J., Seifert, G., Schneider, A., Dong, C., Naismith, J. H., & Van Pée, K. H. (2008). New insights into the mechanism of enzymatic chlorination of tryptophan. *Angewandte Chemie - International Edition*, 47(49), 9533–9536. <https://doi.org/10.1002/anie.200802466>
- Fraleley, A. E., Garcia-Borràs, M., Tripathi, A., Khare, D., Mercado-Marin, E. V., Tran, H., Dan, Q., Webb, G. P., Watts, K. R., Crews, P., Sarpong, R., Williams, R. M., Smith, J. L., Houk, K. N., & Sherman, D. H. (2017). Function and Structure of MalA/MalA', Iterative Halogenases for Late-Stage C-H Functionalization of Indole Alkaloids. *Journal of the American Chemical Society*, 139(34), 12060–12068. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b06773>

- Frese, M., Guzowska, P. H., Voß, H., & Sewald, N. (2014). Regioselective enzymatic halogenation of substituted tryptophan derivatives using the FAD-dependent halogenase RebH. *ChemCatChem*, 6(5), 1270–1276. <https://doi.org/10.1002/cctc.201301090>
- Gao, P., & Huang, Y. (2009a). Detection, distribution, and organohalogen compound discovery implications of the reduced flavin adenine dinucleotide-dependent halogenase gene in major filamentous actinomycete taxonomic groups. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(14), 4813–4820. <https://doi.org/10.1128/AEM.02958-08>
- Gao, P., & Huang, Y. (2009b). Detection, distribution, and organohalogen compound discovery implications of the reduced flavin adenine dinucleotide-dependent halogenase gene in major filamentous actinomycete taxonomic groups. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(14), 4813–4820. <https://doi.org/10.1128/AEM.02958-08>
- Gribble, G. W. (2015). Biological activity of recently discovered halogenated marine natural products. In *Marine Drugs* (Vol. 13, Issue 7, pp. 4044–4136). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/md13074044>
- Hammer, P. E., Burd, W., Steven Hill, D., Ligon, J. M., & Van Pée, K.-H. (n.d.). *Conservation of the pyrrolnitrin biosynthetic gene cluster among six pyrrolnitrin-producing strains.*
- Institute of Electrical and Electronics Engineers. (2012). *Effects of rooting via outgroups on ingroup topology in phylogeny.* IEEE.
- Jeon, J., Lee, J., Jung, S.-M., Shin, J. H., Song, W. J., & Rho, M. (2021). *Genomic Determinants Encode the Reactivity and Regioselectivity of Flavin-Dependent Halogenases in Bacterial Genomes and Metagenomes.* <https://doi.org/10.1128/mSystems>

- Johannes, T. W., Woodyer, R. D., & Zhao, H. (2007). Efficient regeneration of NADPH using an engineered phosphite dehydrogenase. *Biotechnology and Bioengineering*, 96(1), 18–26. <https://doi.org/10.1002/bit.21168>
- Kamerbeek, N. M., Janssen, D. B., Van Berkel, W. J. H., & Fraaije, M. W. (2003). Baeyer-Villiger Monooxygenases, an Emerging Family of Flavin-Dependent Biocatalysts. In *Advanced Synthesis and Catalysis* (Vol. 345, Issues 6–7, pp. 667–678). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/adsc.200303014>
- Keller, S., Wage, T., Hohaus, K., Hölzer, M., Eichhorn, E., & van Pée, K. H. (2000). Purification and Partial Characterization of Tryptophan 7-Halogenase (PrnA) from *Pseudomonas fluorescens* This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) through the Graduiertenkolleg "Struktur-Eigenschafts-Beziehungen bei Heterocyclen. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 39(13), 2300–2302. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20000703\)39:13<2300::AID-ANIE2300>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20000703)39:13<2300::AID-ANIE2300>3.0.CO;2-I)
- Kirner, S., Hammer, P. E., Steven Hill, D., Altmann, A., Fischer, I., Weislo, L. J., Lanahan, M., Van Pé, K. E., & Ligon, J. M. (1998). NOTES Functions Encoded by Pyrrolnitrin Biosynthetic Genes from *Pseudomonas fluorescens*. In *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* (Vol. 180, Issue 7).
- Kong, L., Wang, Q., Deng, Z., & You, D. (2020). Flavin adenine dinucleotide-dependent halogenase XanH and engineering of multifunctional fusion halogenases. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(18). <https://doi.org/10.1128/AEM.01225-20>
- Latham, J., Brandenburger, E., Shepherd, S. A., Menon, B. R. K., & Micklefield, J. (2018). Development of Halogenase Enzymes for Use in Synthesis. *Chemical Reviews*, 118(1), 232–269. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00032>
- Latham, J., Henry, J. M., Sharif, H. H., Menon, B. R. K., Shepherd, S. A., Greaney, M. F., & Micklefield, J. (2016). Integrated catalysis opens new arylation

- pathways via regiodivergent enzymatic C-H activation. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms11873>
- Lingkon, K., & Bellizzi, J. J. (2020). Structure and Activity of the Thermophilic Tryptophan-6 Halogenase BorH. *ChemBioChem*, 21(8), 1121–1128. <https://doi.org/10.1002/cbic.201900667>
- Mahmood, D., Alenezi, S. K., Anwar, M. J., Azam, F., Qureshi, K. A., & Jaremko, M. (2022). New Paradigms of Old Psychedelics in Schizophrenia. In *Pharmaceuticals* (Vol. 15, Issue 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ph15050640>
- Mcgrath, J., Waskeu ; J. J. Dunn, L., Studier, F. W., Chambedin, ; M, Ring, J., Golomb, ; M, Chamberlin, M., Chen, ; W, Tabor, S., & Struhl, K. (1970). 60 EXPRESSION IN E. coll [6] Use of T7 RNA Polymerase to Direct Expression of Cloned Genes. In *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* (Vol. 228, Issue 2).
- Menon, B. R. K., Brandenburger, E., Sharif, H. H., Klemstein, U., Shepherd, S. A., Greaney, M. F., & Micklefield, J. (2017). RadH: A Versatile Halogenase for Integration into Synthetic Pathways. *Angewandte Chemie*, 129(39), 12003–12007. <https://doi.org/10.1002/ange.201706342>
- Menon, B. R. K., Latham, J., Dunstan, M. S., Brandenburger, E., Klemstein, U., Leys, D., Karthikeyan, C., Greaney, M. F., Shepherd, S. A., & Micklefield, J. (2016). Structure and biocatalytic scope of thermophilic flavin-dependent halogenase and flavin reductase enzymes. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 14(39), 9354–9361. <https://doi.org/10.1039/c6ob01861k>
- Menon, B. R. K., Richmond, D., & Menon, N. (2022a). Halogenases for biosynthetic pathway engineering: Toward new routes to naturals and non-naturals. *Catalysis Reviews - Science and Engineering*, 64(3), 533–591. <https://doi.org/10.1080/01614940.2020.1823788>
- Menon, B. R. K., Richmond, D., & Menon, N. (2022b). Halogenases for biosynthetic pathway engineering: Toward new routes to naturals and non-naturals. *Catalysis*

Reviews - Science and Engineering, 64(3), 533–591.
<https://doi.org/10.1080/01614940.2020.1823788>

Neubauer, P. R., Widmann, C., Wibberg, D., Schröder, L., Frese, M., Kottke, T., Kalinowski, J., Niemann, H. H., & Sewald, N. (2018a). A flavin-dependent halogenase from metagenomic analysis prefers bromination over chlorination. *PLoS ONE*, 13(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196797>

Neubauer, P. R., Widmann, C., Wibberg, D., Schröder, L., Frese, M., Kottke, T., Kalinowski, J., Niemann, H. H., & Sewald, N. (2018b). A flavin-dependent halogenase from metagenomic analysis prefers bromination over chlorination. *PLoS ONE*, 13(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196797>

Neubauer, P. R., Widmann, C., Wibberg, D., Schröder, L., Frese, M., Kottke, T., Kalinowski, J., Niemann, H. H., & Sewald, N. (2018c). A flavin-dependent halogenase from metagenomic analysis prefers bromination over chlorination. *PLoS ONE*, 13(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196797>

Neubauer, P. R., Widmann, C., Wibberg, D., Schröder, L., Frese, M., Kottke, T., Kalinowski, J., Niemann, H. H., & Sewald, N. (2018d). A flavin-dependent halogenase from metagenomic analysis prefers bromination over chlorination. *PLoS ONE*, 13(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196797>

Ortega, M. A., Cogan, D. P., Mukherjee, S., Garg, N., Li, B., Thibodeaux, G. N., Maffioli, S. I., Donadio, S., Sosio, M., Escano, J., Smith, L., Nair, S. K., & Van Der Donk, W. A. (2017). Two Flavoenzymes Catalyze the Post-Translational Generation of 5-Chlorotryptophan and 2-Aminovinyl-Cysteine during NAI-107 Biosynthesis. *ACS Chemical Biology*, 12(2), 548–557. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b01031>

Payne, J. T., Andorfer, M. C., & Lewis, J. C. (2013). Regioselective arene halogenation using the FAD-dependent halogenase RebH. *Angewandte Chemie - International Edition*, 52(20), 5271–5274. <https://doi.org/10.1002/anie.201300762>

- Payne, J. T., Poor, C. B., & Lewis, J. C. (2015). Directed evolution of rebh for site-selective halogenation of large biologically active molecules. *Angewandte Chemie - International Edition*, *54*(14), 4226–4230. <https://doi.org/10.1002/anie.201411901>
- Sheldon, R. A., & Brady, D. (2019). Broadening the Scope of Biocatalysis in Sustainable Organic Synthesis. In *ChemSusChem* (Vol. 12, Issue 13, pp. 2859–2881). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/cssc.201900351>
- Sheldon, R. A., Brady, D., & Bode, M. L. (2020). The Hitchhiker's guide to biocatalysis: Recent advances in the use of enzymes in organic synthesis. *Chemical Science*, *11*(10), 2587–2605. <https://doi.org/10.1039/c9sc05746c>
- Shepherd, S. A., Karthikeyan, C., Latham, J., Struck, A. W., Thompson, M. L., Menon, B. R. K., Styles, M. Q., Levy, C., Leys, D., & Micklefield, J. (2015). Extending the biocatalytic scope of regiocomplementary flavin-dependent halogenase enzymes. *Chemical Science*, *6*(6), 3454–3460. <https://doi.org/10.1039/c5sc00913h>
- Shepherd, S. A., Menon, B. R. K., Fisk, H., Struck, A. W., Levy, C., Leys, D., & Micklefield, J. (2016). A Structure-Guided Switch in the Regioselectivity of a Tryptophan Halogenase. *ChemBioChem*, *17*(9), 821–824. <https://doi.org/10.1002/cbic.201600051>
- Smith, D. R. M., Uria, A. R., Helfrich, E. J. N., Milbredt, D., Van Pée, K. H., Piel, J., & Goss, R. J. M. (2017). An Unusual Flavin-Dependent Halogenase from the Metagenome of the Marine Sponge *Theonella swinhoei* WA. *ACS Chemical Biology*, *12*(5), 1281–1287. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b01115>
- Spasic, J., Mandic, M., Djokic, L., & Nikodinovic-Runic, J. (2018). *Streptomyces* spp. in the biocatalysis toolbox. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*(8), 3513–3536. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8884-x>

- Timmins, A., & De Visser, S. P. (2018). A comparative review on the catalytic mechanism of nonheme iron hydroxylases and halogenases. In *Catalysts* (Vol. 8, Issue 8). MDPI. <https://doi.org/10.3390/catal8080314>
- Van Der Donk, W. A., & Zhao, H. (2003). Recent developments in pyridine nucleotide regeneration. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 14, Issue 4, pp. 421–426). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(03\)00094-6](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00094-6)
- Woodley, J. M. (2020). New Frontiers in Biocatalysis for Sustainable Synthesis. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 21, 22–26. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2019.08.006>
- Yeh, E., Blasiak, L. C., Koglin, A., Drennan, C. L., & Walsh, C. T. (2007a). Chlorination by a long-lived intermediate in the mechanism of flavin-dependent halogenases. *Biochemistry*, 46(5), 1284–1292. <https://doi.org/10.1021/bi0621213>
- Yeh, E., Blasiak, L. C., Koglin, A., Drennan, C. L., & Walsh, C. T. (2007b). Chlorination by a long-lived intermediate in the mechanism of flavin-dependent halogenases. *Biochemistry*, 46(5), 1284–1292. <https://doi.org/10.1021/bi0621213>
- Yeh, E., Garneau, S., & Walsh, C. T. (2005a). *Robust in vitro activity of RebF and RebH, a two-component reductasehalogenase, generating 7-chlorotryptophan during rebeccamycin biosynthesis.* www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0500755102
- Yeh, E., Garneau, S., & Walsh, C. T. (2005b). *Robust in vitro activity of RebF and RebH, a two-component reductasehalogenase, generating 7-chlorotryptophan during rebeccamycin biosynthesis.* www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0500755102