

Tabla de Contenido

Introducción	1
<i>Streptomyces</i> productoras de metabolitos secundarios con potencial terapéutico . .	1
<i>Streptomyces sp.</i> HST28: características y potencialidad como productora de agentes terapéuticos	1
Metabolitos Secundarios: Lazo Péptidos sus características y actividades terapéuticas	3
Características estructurales y genómicas de los lazo péptidos	3
Principales Lazo péptidos producidos por cepas de <i>Streptomyces</i>	5
Minería de genomas como herramienta para la identificación de nuevos cluster bio- sintéticos	6
Expresión heteróloga para la producción eficiente de metabolitos de interés .	7
Objetivos	7
Objetivos	8
Objetivo General	8
Objetivos Específicos	8
Resultados y discusión	8
1. Identificación y reconstrucción de los clusters de los lazo péptidos	10
1.1. Resumen	10
1.2. Metodología de identificación, reconstrucción de clusters biosintéticos y análi- sis bioinformático	11
1.3. Clústers de lazo péptidos identificados en la cepa <i>Streptomyces sp.</i> HST28 . .	12
1.4. Conclusiones	16
2. Modelo <i>in silico</i> de lazo péptidos	17
2.1. Resumen	17
2.2. Introducción	18
2.2.1. Modelamiento <i>in silico</i> de proteínas y péptidos, usos y ventajas	18
2.3. Metodología para la creación de modelos <i>in silico</i> específica para lazo péptidos	19
2.4. Análisis de las características estructurales y funcionales de lazo péptidos con estructura 3D reportada	19
2.5. Diseño y análisis de modelo <i>in silico</i> de LP1	20
2.5.1. Análisis de los ángulos de los residuos para modelos de LP1 a través del gráfico de Ramachandran	26
2.6. Diseño y análisis de modelo <i>in silico</i> LP2	28

2.6.1.	Análisis de los ángulos de los residuos para modelos de LP2 a través del gráfico de Ramachandran	33
2.7.	Diseño y análisis de modelo <i>in silico</i> LP3	36
2.7.1.	Análisis de los ángulos de los residuos para modelos de LP3 a través del gráfico de Ramachandran	41
2.8.	Diseño y análisis de modelo <i>in silico</i> LP4	43
2.8.1.	Análisis de los ángulos de los residuos para modelos de LP4 a través del gráfico de Ramachandran	51
2.9.	Potencial electrostático como clave en el estudio de interacciones de péptidos y proteínas con otras moléculas	54
2.9.1.	Campo electrostático del modelo representante de LP1	54
2.9.2.	Campo electrostático del modelo representante de LP2	56
2.9.3.	Campo electrostático del modelo representante de LP3	57
2.9.4.	Campo electrostático del modelo representante de LP4	59
2.10.	Conclusiones	61
3.	Expresión heteróloga de los clusters, bioensayos y detección de los lazo péptidos	62
3.1.	Resumen	62
3.2.	Metodología capítulo	63
3.2.1.	Metodología general de expresión heteróloga y bioensayos	63
3.2.2.	Metodología de detección de los lazo péptidos por espectrometría de masa	64
3.3.	Resultados del aislamiento de los genes de lazo péptidos por expresión heteróloga	65
3.4.	Bioensayos de los clones heterólogos de lazo péptidos obtenidos	69
3.5.	Experimentos de detección de lazo péptidos por espectrometría de masa	73
3.6.	Conclusiones	74
	Conclusiones generales y proyecciones	74
	Bibliografía	76
	Apéndices	86
	A. Lista de cepas	88
	B. Lista de plásmidos	90
	C. Lista de cebadores	91
	D. Mapa de vectores y construcciones	93
	E. Medios, soluciones, tampones, kits y reactivos	96
E.1.	Recetas medios agar	96
E.2.	Recetas medios líquidos	97
E.3.	Recetas de soluciones para microbiología	98
E.3.1.	Soluciones de antibióticos	99

E.4. Kits	99
F. Protocolos	100
F.1. Extracción de plasmidios y ADN genómico	100
F.2. Preparación de células competentes y transformación de <i>E. coli</i>	100
F.2.1. Protocolo de preparación de células <i>E. coli</i> competentes con cloruro de calcio	100
F.2.2. Protocolo de preparación de células <i>E. coli</i> electrocompetentes	101
F.2.3. Transformación de <i>E. coli</i> competentes con cloruro de calcio	101
F.2.4. Transformación de <i>E. coli</i> electrocompetentes	101
F.3. Procedimientos generales para el cultivo y la manipulación genética de cepas de <i>Streptomyces</i>	102
F.3.1. Preparación stock de esporas	102
F.3.2. Conjugación entre cepa de <i>E. coli</i> ET12567 y <i>Streptomyces coelicolor</i>	103
F.4. Bioensayos sobre <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Micrococcus luteus</i> y cepas de hongos patógenos de plantas	104
F.4.1. Protocolo para bioensayos sobre <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Micrococcus luteus</i>	104
F.4.2. Protocolo para bioensayos sobre cepas de hongos patógenos de plantas	104
G. Material suplementario	106
G.1. Secuencia nucleotídicas de los cluters de los lazo péptidos	106
G.2. Lazo péptidos de comparación	111