



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA, BIOTECNO-
LOGÍA Y MATERIALES

CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS LAZO PÉPTIDOS PRODUCIDOS POR
STREPTOMYCES SP. HST28

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS DE LA
INGENIERÍA, MENCIÓN QUÍMICA
MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

ANARIKY ESPERANZA NEGRETE GODOY

PROFESORES GUÍA:
BARBARA ANDREWS FARROW
JUAN A. ASENJO DE LEUZE DE LANCIZOLLE

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
ALVARO OLIVERA NAPPA
ORIANA SALAZAR AGUIRRE

SANTIAGO DE CHILE

2018

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR
AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA
Y AL GRADO DE MAGÍTER EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA, MEN-
CIÓN QUÍMICA
POR: ANARIKY ESPERANZA NEGRETE GODOY
FECHA: 2018
PROF. GUÍA: BARBARA ANDREWS FARROW
JUAN A. ASENJO DE LEUZE DE LANCIZOLLE

CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS LAZO PÉPTIDOS PRODUCIDOS POR STREPTOMYCES SP. HST28

El estudio de *Streptomyces*, bacterias Gram positivas del filo *Actinobacteria* y cosmopolitas (encontradas en diferentes tipos de ambientes), ha llevado al descubrimiento de un gran número de metabolitos secundarios con potencial terapéutico. Uno de los nuevos tipos de moléculas producidas por estas bacterias son los lazo péptidos. Estos se caracterizan por formar un lazo dentro de su estructura y por presentar actividad antimicrobiana, citotóxica contra diferentes líneas celulares de cáncer y actividad inhibitoria de la replicación de ciertos virus, entre otras. Nuevos estudios han hallado cepas de *Streptomyces* en ambientes extremos. Una de ellas es la cepa *Streptomyces* sp. HST28 aislada desde el Salar de Huasco en el norte chileno. Análisis de actividad realizados a este organismo arrojaron potencial antibiótico, antifúngico y citotóxico, además su genoma fue secuenciado dando paso a la realización de minería de genomas sobre su secuencia.

El presente trabajo se enfocó en la identificación de los lazo péptidos presentes en *Streptomyces* sp. HST28 y su caracterización. Para esto se utilizó la estrategia de minería de genomas ubicando los clústers de genes de estos péptidos, luego estos clústers fueron reconstruidos de manera bioinformática. Como segunda etapa se realizó la expresión heteróloga de cada lazo péptido empleando como huésped *Streptomyces coelicolor* M1152 y M1154. Una vez clonados se detectó el péptido a través de espectrometría de masa y se evaluó su actividad. Paralelamente al estudio de laboratorio se realizó una investigación *in silico* de cada lazo péptido creando modelos por homología de secuencia y estructurales, usando como plantilla o molde lazo péptidos ya descritos y caracterizados estructuralmente, buscando similitudes en campos electrostáticos, distribuciones de hidrofobicidad y espaciales.

Se encontraron cuatro clústers de genes de lazo péptidos en el genoma de *Streptomyces* sp. HST28, nombrados como LP1, LP2, LP3 y LP4. Tres de estos lazo péptidos fueron clasificados como clase II y uno de clase I (LP1). La organización de sus clústers es acorde a lo encontrado en bibliografía a excepción del de LP3. Las secuencias codificantes para los cuatro péptidos se clonaron en el vector pIJ10257, que posee el promotor constitutivo *ermE**. Solo LP1 y LP3 fueron clonados exitosamente en *S. coelicolor* M1152, el producto predicho para LP1 no fue encontrado en los clones analizados por espectrometría de masa. En la investigación *in silico* se logró modelar los cuatro lazo péptidos y se realizó una comparación preliminar con otras estructuras, deduciendo que es posible implementar esta metodología para tener una aproximación del comportamiento de estas moléculas.

"Happiness can be found, even in the darkest of times, if one only remembers to turn on the light."— Harry Potter and the Prisoner of Azkaban.

Dedicado a mi padre, la persona que me recordó encender la luz en momentos de oscuridad, guiando mi camino con cariño, amor y comprensión.

Agradecimientos

Quisiera expresar todo mi agradecimiento, en primer lugar a mis profesores guía Juan y Barbara por darme la oportunidad de participar en este proyecto, al grupo GBA que para cualquier duda estaban dispuestos a ayudarme y enseñarme, particularmente a Jean por su paciencia y Carlos por guiarme en el proceso. Agradezco a los profesores del departamento de ingeniería química, biotecnología y materiales por todas sus enseñanzas, particularmente a la profesora Oriana siempre dispuesta a transmitir sus conocimientos, siendo la primera persona que me enseñó el trabajo de laboratorio, también destaco al profesor Álvaro que a pesar de estar siempre ocupado me recibió para responder mis dudas poniendo entusiasmo y desafíos nuevos en el área de modelamiento tanto en este trabajo como en el concurso iGEM. Un agradecimiento especial al profesor Marcel Jaspars y a Scott Jarmusch por permitir realizar mis últimos análisis en sus laboratorios en el centro MBC (*Marine Biodiscovery Center*) de la Universidad de Aberdeen, Escocia, Reino Unido.

En segundo lugar, pero no menos importante quiero agradecer a mi familia, en especial a mi tía Silvia por su cariño y ayuda, a mis tatas que siempre me reciben con algo rico y especialmente a mi padre Luis Alberto, por su sacrificio, esfuerzo, compañía y aliento en los momentos difíciles. A mi compañero de vida Ernesto que logra siempre sacarme una sonrisa y hacer cada día mas especial que el anterior. Gracias a mis compañeros y amigos presentes y pasados, quienes han compartido su conocimiento, alegrías y cariño con una entrega desinteresada.

Finalmente quisiera plasmar en estas líneas, mi gratitud a todos quienes de una u otra forma han influido en la formación de la persona que soy, con valores y fortaleza para enfrentar los desafíos.

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

Índice de Tablas

1.	Actividad Antibiótica de la cepa <i>Streptomyces sp.</i> HST28	2
2.	Actividad Antifúngica de la cepa <i>Streptomyces sp.</i> HST28.	2
3.	Actividad Citotóxica de la cepa <i>Streptomyces sp.</i> HST28	2
4.	Lista de lazo péptidos encontrados en cepas de <i>Streptomyces</i>	5
1.1.	Clusters identificados y su posición en el genoma de <i>S. sp</i> HST28.	12
2.1.	Tabla comparativa de templados seleccionados para modelar LP1	21
2.2.	Interacciones por puentes de hidrógeno encontradas en modelo LP1-m5-4	24
2.3.	Interacciones por puentes de hidrógeno encontradas en modelo LP1-m6	26
2.4.	Tabla comparativa de templados seleccionados para modelar LP2	29
2.5.	Interacciones por puentes de hidrógeno encontradas en modelo LP2-m2-1	31
2.6.	Interacciones por puentes de hidrógeno encontradas en modelo LP2-m5-2	33
2.7.	Tabla comparativa de templados seleccionados para modelar LP3	36
2.8.	Interacciones por puentes de hidrógeno encontradas en modelo LP3-m1-4	39
2.9.	Interacciones por puentes de hidrógeno encontradas en modelo LP3-m3-2	41
2.10.	Tabla comparativa de templados seleccionados para modelar LP4	44
2.11.	Interacciones por puentes de hidrógeno encontradas en modelo LP4-m4-1	47
2.12.	Interacciones por puentes de hidrógeno encontradas en modelo LP4-m6-5	49
2.13.	Interacciones por puentes de hidrógeno encontradas en modelo LP4-m7-3	51
3.1.	Estados de ionización esperados para cada lazo péptido.	73
G.5.	Lazo péptidos de comparación usados para modelos in silico.	111
G.5.	Lazo péptidos de comparación usados para modelos in silico.	112
G.6.	Aminoácidos característicos observados en lazo péptidos templados para modelos in silico	112
G.6.	Aminoácidos característicos observados en lazo péptidos templados para modelos in silico	113
G.7.	Características estructurales observadas y actividad de lazo péptidos templados para modelos in silico	114
G.7.	Características estructurales observadas y actividad de lazo péptidos templados para modelos in silico	115
G.7.	Características estructurales observadas y actividad de lazo péptidos templados para modelos in silico	116
G.8.	Resumen del gráfico de Ramachandran para los lazo péptidos templados.	117
G.9.	Distancias del enlace que forma el ciclo de los lazo péptidos reportados	118

Índice de Ilustraciones

1.	Diagrama de la estructura 3D de las diferentes clases de lazo péptidos	3
2.	Esquema de clusters de lazo péptidos presentes en <i>Streptomyces</i>	4
1.1.	Identificación del clúster de LP1	13
1.2.	Identificación del clúster de LP2	13
1.3.	Identificación del clúster de LP3	14
1.4.	Identificación del clúster de LP4	15
2.1.	Predicción 2D de LP1 realizada por PRISM.	20
2.2.	Modelo preliminar de LP1.	22
2.3.	Modelo LP1-m5-4 después de dinámica molecular.	23
2.4.	Modelo LP1-m6 después de dinámica molecular.	25
2.5.	Gráficos de Ramachandran para los modelos de LP1	27
2.6.	Predicción 2D de LP2 realizada por PRISM.	28
2.7.	Modelo preliminar de LP2.	29
2.8.	Modelo LP2-m2-1 después de dinámica molecular.	30
2.9.	Modelo LP1-m6 después de dinámica molecular.	32
2.10.	Gráfico de Ramachandran para modelos de LP2.	34
2.11.	Predicción 2D de LP3 realizada por PRISM.	36
2.12.	Modelo preliminar de LP3.	37
2.13.	Modelo LP3-m1-4 después de dinámica molecular.	38
2.14.	Modelo LP3-m3-2 después de dinámica molecular.	40
2.15.	Gráfico de Ramachandran para modelos de LP3.	42
2.16.	Predicción 2D de LP4 realizada por PRISM.	43
2.17.	Modelo preliminar de LP4.	45
2.18.	Modelo LP4-m4-1 después de dinámica molecular.	46
2.19.	Modelo LP4-m6-5 después de dinámica molecular.	48
2.20.	Modelo LP4-m7-3 después de dinámica molecular.	50
2.21.	Gráfico de Ramachandran para modelo LP4-m4-1.	52
2.22.	Gráfico de Ramachandran para modelo LP4-m6-5.	52
2.23.	Gráfico de Ramachandran para modelo LP4-m7-3.	53
2.24.	Estructura, hidrofobicidad y campo electrostático del modelo LP1-m6-2039	55
2.25.	Estructura, hidrofobicidad y campo electrostático del templado 5jpl (LP2006).	55
2.26.	Estructura, hidrofobicidad y campo electrostático del modelo LP2-m5-2-4534	56
2.27.	Estructura, hidrofobicidad y campo electrostático del templado 2n5c (Chaxapeptin).	57
2.28.	Estructura, hidrofobicidad y campo electrostático del modelo LP3-m3-2-1540	58

2.29. Estructura, hidrofobicidad y campo electrostático del templado 2mfv (Xanthomonin II).	58
2.30. Estructura, hidrofobicidad y campo electrostático del modelo LP4-m4-1-4412	59
2.31. Estructura, hidrofobicidad y campo electrostático del modelo LP4-m6-5-3669	60
2.32. Estructura, hidrofobicidad y campo electrostático del templado 5gov (Sphaericin).	60
2.33. Estructura, hidrofobicidad y campo electrostático del templado 2n6v (Astexin3).	61
3.1.	64
3.2. PCR en gradiente del gen de LP1.	65
3.3. PCR en gradiente de los genes de LP2, LP3 y LP4.	66
3.4. PCR gradiente LP2 y LP3 con mejor resolución del gel de agarosa.	66
3.5. Gel para purificación de lazo péptidos 2 y 3.	67
3.6. Comprobación de ligación y transformación en clones de <i>E. coli</i> TOP10.	68
3.7. Comprobación de clonamiento del vector en células <i>E. coli</i> EZT.	69
3.8. Comprobación de conjugación en <i>Streptomyces coelicolor</i>	69
3.9. Bioensayos de los clones de lazo péptido contra <i>Bacillus subtilis</i>	70
3.10. Bioensayos de los clones de lazo péptido contra <i>Micrococcus luteus</i>	71
3.11. Bioensayos de los clones de lazo péptido contra <i>Aspergillus niger</i>	71
3.12. Bioensayos de los clones de lazo péptido contra el hongo <i>Alternaria alternata</i>	72
D.1. Mapa de pIJ10257. Usado para clonamiento de genes bajo el promotor constitutivo <i>ermE*</i>	93
D.2. pAN001 derivado de pIJ10257 que porta el gen del lazo péptido 1.	94
D.3. pAN002 derivado de pIJ10257 que porta el gen del lazo péptido 2.	94
D.4. pAN003 derivado de pIJ10257 que porta el gen del lazo péptido 3.	95
D.5. pAN004 derivado de pIJ10257 que porta el gen del lazo péptido 4.	95
F.1. Representación esquemática del proceso de preparación de stocks de esporas para cepas de <i>Streptomyces</i>	103

Introducción

***Streptomyces* productoras de metabolitos secundarios con potencial terapéutico**

Streptomyces son bacterias Gram positivas del filo *Actinomycetes* estudiadas por su alto potencial de producción de metabolitos secundarios con acción antimicrobiana y citotóxica (Demain and Fang, 2000; Madigan et al., 2015). Cerca del 50 % de los *Streptomyces* que se han aislado producen antibióticos (Madigan et al., 2015). Estas bacterias se caracterizan por ser cosmopolitas, esto quiere decir que se han encontrado en diferentes tipos de ambientes. Otras características que las destacan son su capacidad esporulante, la gran capacidad metabólica que poseen y además pueden producir una cantidad considerable de metabolitos secundarios. Estos metabolitos especializados son producidos por rutas de biosíntesis codificados en el genoma de las bacterias. Los genomas de *Streptomyces* están dotados con varios de estas rutas de biosíntesis (Hodgson, 2000).

El estudio de nuevos *Streptomyces* da paso al descubrimiento de alternativas para el tratamiento de enfermedades y la búsqueda de nuevos antibióticos que combatan microorganismos difíciles de tratar por las mutaciones que han, experimentado haciéndolos resistentes a los medicamentos ya existentes (Hein, 2017). Otra aplicación importante es como alternativa al estudio de curas para el cáncer debido a la actividad citotóxica que se ha encontrado en varios de estos organismos.

***Streptomyces* sp. HST28: características y potencialidad como productora de agentes terapéuticos**

La cepa *Streptomyces* sp. HST28 fue aislada desde el Salar de Huasco que está localizado a 3800 metros sobre el nivel del mar (Cortés and Dorador, 2017).

Las condiciones ambientales en este lugar son extremas: bajas temperaturas (media 5°C), alta oscilación de temperatura (de -20°C a 20°C), baja presión atmosférica (> 40 %), alta radiación solar (< 1100Wm²), alta salinidad (Cortés, 2014; Vega, 2016).

Luego de ser aislada, el extracto de la cepa fue probado a través de bioensayos, los resultados se muestran en las Tablas 1, 2 y 3 (Cortés and Dorador, 2017). Se destaca la efectividad

en la inhibición bacteriana y su alta citotoxicidad.

Tabla 1: Actividad Antibiótica de la cepa *Streptomyces sp.* HST28. Extractos probados a una concentración de 1% p/v, y los resultados están expresados como porcentaje de inhibición del crecimiento.

Tipo	Patógena Humana			Fitopatógena	
	<i>Stapylococcus epidermis</i>	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>	<i>Erwinia amylovora</i>
Extracto-Medio					
HST28-GYM	97	98	100	100	22
HST28-SPM	100	100	100	100	-

En la tabla 1 se observa la efectividad antibiótica de la cepa en la mayoría de los patógenos probados, menos en *Erwinia amylovora*.

Tabla 2: Actividad Antifúngica de la cepa *Streptomyces sp.* HST28. Extractos probados a una concentración de 1% p/v, y los resultados están expresados como porcentaje de inhibición del crecimiento.

Tipo	Patógena Humana		Fitopatógena	
	<i>Candida albicans</i>	<i>Trychophyton rubrum</i>	<i>Septoria tritici</i>	<i>Phythophtora infestans</i>
Extracto-Medio				
HST28-GYM	45	37	94	27
HST28-SPM	39	29	89	25

Tabla 3: Actividad Citotóxica de la cepa *Streptomyces sp.* HST28. Extractos probados a una concentración de 1% p/v, y los resultados están expresados como porcentaje de inhibición del crecimiento.

Tipo	Línea Celular	
	NIH-3T3	HepG2
Extracto-Medio		
HST28-GYM	100	100
HST28-SPM	97	100

Los extractos en las Tablas 1, 2 y 3 fueron probados a una concentración de 1% p/v, y los resultados están expresados como porcentaje de inhibición (Cortés and Dorador, 2017), GYM y SPM son dos medios diferentes que se utilizan para expresión específica de metabolitos secundarios.

Estas pruebas otorgan una base para la investigación de los metabolitos presentes en la cepa, uno de estos son los Lazo Péptidos, algunos de estos péptidos reportados han presentado actividad antimicrobiana a demás de otras actividades biológicas (Hegemann et al., 2015).

Metabolitos Secundarios: Lazo Péptidos sus características y actividades terapéuticas

Los metabolitos secundarios son moléculas pequeñas encontradas en el metabolismo de diferentes organismos, tanto animales, plantas o bacterias, sus funciones son principalmente de supervivencia para ellos, como ataques de agente externos, invasión de otro organismo, etc. (Demain and Fang, 2000). La producción de metabolitos secundarios muchas veces está asociada a la disminución de nutrientes de crecimiento en el medio (Avignone-Rossa et al., 2013), estos no son esenciales para el crecimiento celular (Vaishnav and Demain, 2011).

Estudios recientes han determinado que los *Streptomyces* son grandes productores de metabolitos secundarios con diversas actividades, los lazo péptidos son uno de esto (Avignone-Rossa et al., 2013; Bibb, 2005).

Características estructurales y genómicas de los lazo péptidos

Los lazo péptidos son conocidos por su potencial terapéutico y antimicrobiano (Hegemann et al., 2015), su descubrimiento es reciente, por lo tanto existen pocos caracterizados completamente. A pesar de esto, debido a sus buenos resultados como posibles agentes terapéuticos, su estudio cobra una importancia relevante.

Estos péptidos están clasificados en tres grupos, dependiendo del número de enlaces disulfuro que tenga en su configuración. Lazo péptidos de clase I tiene dos enlaces disulfuro, los de clase II no tienen y los de clase III tiene solo uno de estos enlaces (tal como se muestra en la Figura 1).

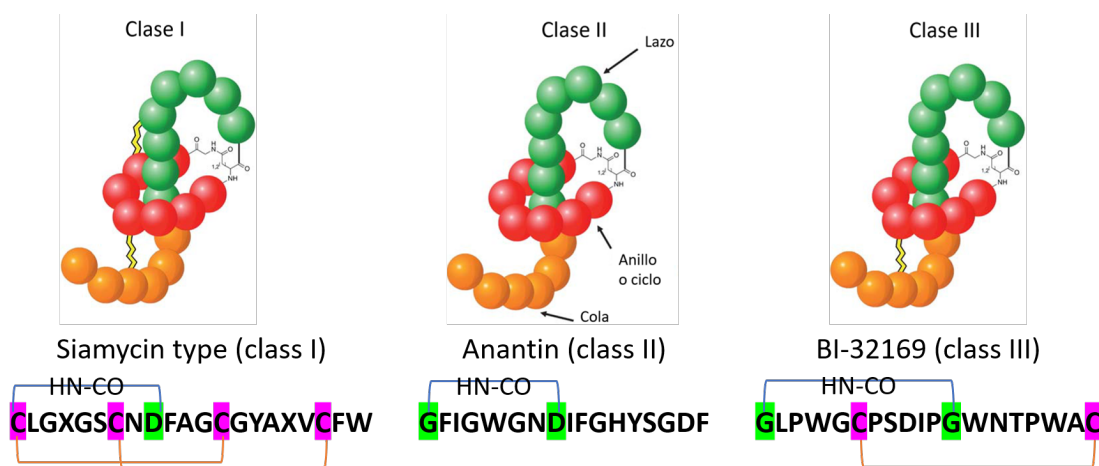


Figura 1: Diagrama de la estructura 3D de las diferentes clases de lazo péptidos (Maksimov et al., 2012a). La figura muestra las partes principales de la estructura del péptido como son el lazo (en verde), el anillo o ciclo (en rojo) y la cola (en naranja). Además, se agregaron las secuencias aminoacídicas de 3 lazo péptidos representativos de cada clase y donde se sitúan los enlaces de la estructura secundaria característicos en cada uno.

Los lazo péptidos pertenecen a la familia de péptidos bacteriales sintetizados ribosomal-

mente y modificados post-transcripcionalmente por enzimas específicas (RiPPs, por sus siglas en inglés) (Li et al., 2015b). Los primeros estudios de estas moléculas han mostrado que la identificación de sus clústers es bastante sencilla, ya que tienen una estructura común, las partes principales son las siguientes:

- **Prepéptido o péptido precursor (A)**: secuencia donde está contenida la información del lazo péptido.
- **Ciclasa (C)**: proteína encargada de ayudar a la formación del ciclo en el lazo.
- **Factor sigma (B1)**: corresponde al dominio N-terminal de la proteína B (Hegemann et al., 2015; Li et al., 2015b).
- **Proteasa (B2)**: corresponde al dominio C-terminal de la proteína B (Hegemann et al., 2015; Li et al., 2015b).
- **ABC Transportador (D)**: proteína transportadora presente en algunos cluster de lazo péptidos.
- **Otros (E/F)**: dominios que se encuentran dentro del cluster pero no tienen una función para la maduración del péptido, se pueden encontrar como enzimas de oxidoreducción, no se conoce su función específica.

Estas partes en general se organizan como muestra la Figura 2, donde el dominio del prepéptido siempre está antes de los dominios C, B1 y B2 (siempre juntos en diferentes posiciones). Estos dominios son los encargados del procesamiento y plegamiento final del lazo péptido. La proteína transportadora y otros dominios se pueden encontrar antes o después de este grupo.

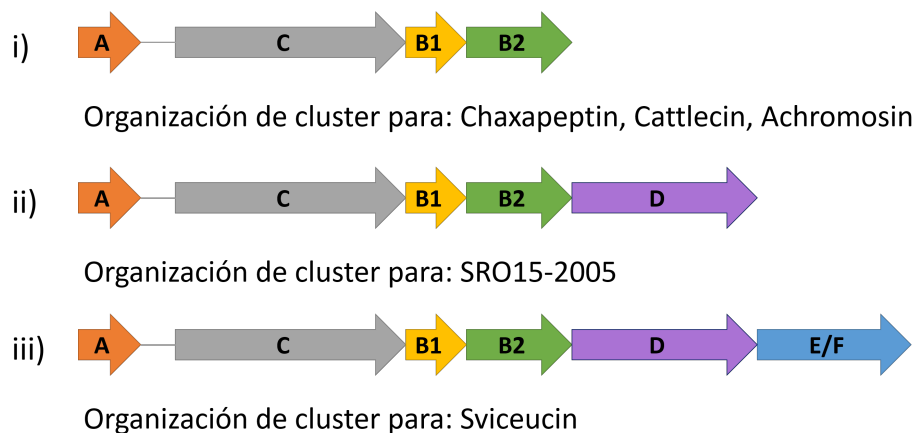


Figura 2: Esquema de clusters de lazo péptidos presentes en *Streptomyces*. Los clústers reportados hasta ahora en cepas de *Streptomyces* mantienen esta organización en *Actinobacteria* en general (Hegemann et al., 2015; Kaweewan et al., 2017; Sugai et al., 2017; Zhu et al., 2016). **A**: péptido precursor o prepéptido, **C**: ciclasa, **B1**: factor sigma, **B2**: proteasa, **D**: ABC transportador, **E/F**: otros dominios.

Principales Lazo péptidos producidos por cepas de *Streptomyces*

Estos péptidos han sido encontrados en diversos tipos de organismos destacando en particular los *Streptomyces*. También se ha descrito su estructura y en algunos casos su funcionalidad. A modo de ejemplo en la Tabla 4 se muestra una lista de lazo péptidos encontrados en *Streptomyces* y su función. Se puede apreciar que resaltan algunos por su actividad inhibidora o antagonista de líneas celulares de cáncer (actividad citotóxica).

Tabla 4: Lista de lazo péptidos encontrados en cepas de *Streptomyces* con su nombre, clase, organismo y actividad*.

Nombre Péptido	Lazo	Clase	Cepa	Actividad	Referencia
Aborycin/RP 71955		I	<i>Streptomyces griseoflavus</i>	Actividad antimicrobiana, inhibidor de VIH	(Helynck et al., 1993; Potterat et al., 1994)
Siamycin type		I	<i>Streptomyces spp.</i>	Inhibidor de la fusión y replicación del VIH	(Tsunakawa et al., 1995)
Chaxapeptin		II	<i>Streptomyces leeuwenhoekii</i> C58	Inhibidor de la línea celular de cáncer de pulmón A549	(Elsayed et al., 2015)
RES-701 type		II	<i>Streptomyces sp.</i> RE-701/RE-896	Inhibidor del receptor tipo-b de la endotelina	(Morishita et al., 1994)
SRO15-2005		II	<i>Streptomyces roseosporus</i>	Sin actividad encontrada	(Kersten et al., 2011)
Sungsanpin		II	<i>Streptomyces sp.</i>	Inhibidor de la línea celular de cáncer de pulmón A549	(Um et al., 2013)
Achromosin		II	<i>Streptomyces achromogenes</i>	Actividad antimicrobiana	(Kaweewan et al., 2017)
Anantin		II	<i>Streptomyces coeruleus</i>	Inhibidor del factor atriurético articular	(Vega, 2016)
Cattlecin		II	<i>Streptomyces cattleya</i>	Sin actividad encontrada	(Sugai et al., 2017)
Sviceucin/SSV-2083		II	<i>Streptomyces sviceps</i>	Actividad antimicrobiana	(Li et al., 2015a)
BI-32169		III	<i>Streptomyces sp.</i> DSM 14996	Inhibidor del receptor del glucagon	(Knappe et al., 2010; Potterat et al., 2004)

* (Elsayed et al., 2015; Hegemann et al., 2015; Maksimov et al., 2012a).

Esos antecedentes dan base suficiente para realizar estudios de búsqueda dirigida para lazo péptidos en *Streptomyces* específicamente en la cepa *Streptomyces sp.* HST28. Para esta búsqueda dirigida se utiliza la estrategia "minería de genomas".

Minería de genomas como herramienta para la identificación de nuevos clúster de genes biosintéticos

Desde siempre se han buscado nuevas moléculas bioactivas que puedan ser utilizadas de manera terapéutica. En los últimos años se desarrollaron diferentes técnicas de secuenciación que permitieron conocer los genomas completos de varios organismos (Zerikly and Challis, 2009), por lo tanto han facilitado la búsqueda de nuevos genes de lazo péptido.

Se crearon bases de datos públicas con estos genomas que permitieron el desarrollo de herramientas bioinformáticas capaces de analizar los genomas e identificar nuevos productos (Corre and Challis, 2009; Nett et al., 2009). Teniendo esta información se fueron reconstruyendo los clúster biosintéticos de cada organismo a partir de moléculas ya estudiadas y de su estructura genómica. Así es como nace la minería de genomas (Corre and Challis, 2009; Kersten et al., 2011; Nett et al., 2009).

Por consiguiente la minería de genomas se define como el uso de herramientas bioinformáticas, genética molecular y análisis químico de los productos de los clústers encontrados en el genoma de un organismo basándose en clústers ya estudiados y reportados en bases de datos (Bachmann et al., 2014; Gomez-Escribano and Bibb, 2013).

Para realizar esta búsqueda primero se debe tener la secuenciación del genoma del organismo; se procede a la anotación de él a través de plataformas como RAST (Aziz et al., 2008; Brettin et al., 2015; Overbeek et al., 2014), luego se realiza una homología de secuencias contra bases de datos de metabolitos secundarios anotados de otros organismos, utilizando otras herramientas bioinformáticas, tales como PRISM (Skinnider et al., 2015, 2016) y antiSMASH (Blin et al., 2013; Medema et al., 2011; Weber et al., 2015), las que tienen la particularidad de dar una predicción estructural del metabolito secundario encontrado. Con este procedimiento no solo se obtiene la descripción del metabolito, sino que, se puede obtener el clúster putativo que codifica para esta molécula, que incluyen las proteínas chaperonas, de transporte, etc.

Una vez realizada esta identificación *in silico* se debe comprobar la presencia de estos clusters en el organismo. Con esta finalidad se utilizan principalmente dos métodos: la expresión homóloga, donde se busca la producción de los metabolitos por el organismo sometándolo a modificaciones transcripcionales, transduccionales o de elementos metabólicos con la finalidad de activar las vías de producción, y la expresión heteróloga en super hospederos, que consiste en el clonamiento del cluster biosintético en un organismo diferente al microorganismo nativo productor del metabolito (Bachmann et al., 2014; Scheffler et al., 2012). Esta última técnica es la mas utilizada en el caso de *Streptomyces* (Bachmann et al., 2014; Gomez-Escribano and Bibb, 2013).

Expresión heteróloga para la producción eficiente de metabolitos de interés

Expresión heteróloga es un mecanismo que consiste en clonar los cluster biosintéticos en cepas de expresión y analizar su producción de metabolitos para identificar nuevos compuestos (Bachmann et al., 2014). El componente clave para una expresión heteróloga exitosa es la elección del super hospedero o super host (organismos donde se clonará el material genético), se debe buscar una especie hospedadora genéticamente relacionada con el organismo desde donde se aislaron los genes (Castro Figueroa, 2015; Gomez-Escribano and Bibb, 2013; Li et al., 2015b). Para esto se han realizado estudios donde se crean cepas específicas que tienen delecionadas sus vías de producción de metabolitos secundarios, lo que hace más fácil el reconocimiento de nuevas moléculas al utilizar técnicas de espectrometría de masa (Gomez-Escribano and Bibb, 2011, 2013).

Descripción del proyecto y justificación

El proyecto que se presenta a continuación buscó encontrar nuevos lazo péptidos en el genoma de *Streptomyces* sp. HST28 y luego caracterizarlos. Para esto se estudió bioinformáticamente el genoma de *Streptomyces* sp. HST28 para identificar los clústers de genes específicos que podrían codificar una lazo péptido. Una vez identificados los clústers se procede a su caracterización y clasificación teórica. Un paso extra realizado fue el modelamiento estructural en 3D de los lazo péptidos utilizando homología de estructuras contra otros lazo péptidos encontrados en bibliografía. Como segunda etapa se realizó el clonamiento heterólogo de los clústers de genes identificados, fue escogida esta metodología por la eficiencia reportada en bibliografía. Por último se analizó la producción de los péptidos en los clones obtenidos.

Objetivos

Objetivo General

Identificar genes de biosíntesis de lazo péptidos presentes en *Streptomyces* sp. HST28 y caracterizar al menos uno de estos lazo péptidos, para luego evaluar la bioactividad específica que posee.

Objetivos Específicos

1. Identificar y reconstruir utilizando bioinformática, los clústers de genes de los lazo péptidos presentes en el genoma de *Streptomyces* sp. HST28
2. Expresar heterológamente los clústers en el super huésped *Streptomyces coelicolor* M1152 o M1154.
3. Detectar los péptidos en los extractos del cultivo microbiano y caracterización a través de espectrometría de masa (HPLC-ESI-MS/MS).
4. Purificar los péptidos detectados mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-MS).
5. Evaluar los péptidos purificados mediante bioensayos de actividad antimicrobiana.

Resultados y discusión

Capítulo 1

Identificación y reconstrucción de los clusters de los lazo péptidos

1.1. Resumen

Este capítulo muestra cómo se utiliza la minería de genomas para predecir la presencia de lazo péptidos en la cepa de *Streptomyces* sp. HST28. Se logró identificar cuatro clusters de lazo péptidos utilizando esta metodología y éstos coincidieron, por homología de secuencia, con clusters de otros lazo péptidos presentes en bases de datos.

Tres de estos péptidos fueron clasificados como clase II y el último como clase I. Fueron nombrados según su aparición en el genoma como LP1, LP2, LP3 y LP4. Los dominios encontrados para LP1 y LP2 destacan por la presencia de un transportador a parte del núcleo biosintético conformado por un prepéptido, una ciclasa, un factor sigma y una proteasa, presentes en este orden para clusters de *Streptomyces* en general. El cluster de LP3 está definido solo por el núcleo biosintético y por último LP4 presentó la particularidad de tener dos dominios para ciclasa, pudiendo ser esto una característica de este cluster o indicar que no es un lazo péptido, siendo necesarios estudios extras.

Como conclusión se obtuvieron cuatro posibles clusters de lazo péptidos con los cuales es posible trabajar su expresión heteróloga y estudio *in silico* de los péptidos.

1.2. Metodología de identificación, reconstrucción de clusters biosintéticos y análisis bioinformático

El material genético utilizado para este estudio es de *Streptomyces* sp. HST28, la secuenciación de su genoma fue realizada en el trabajo de Cortés (2014), al tener este análisis se procedió a la predicción de sus metabolitos secundarios. Para la reconstrucción y anotación de sus clústers se utilizaron las plataformas y programas en siguiente orden:

- RAST (Aziz et al., 2008; Brettin et al., 2015; Overbeek et al., 2014): plataforma para la anotación del genoma, solo identifica los dominios que podría codificar una proteína sin detallar si es parte de un clúster o si es un metabolito secundario del organismo. Utilizado en primer lugar para identificar las proteínas putativas presentes en el genoma.
- PRISM (Skinnider et al., 2015, 2016) y antiSMASH (Blin et al., 2013; Medema et al., 2011; Weber et al., 2015): plataformas online utilizadas para la identificación de los clúster biosintéticos, identifican principalmente los clústers de metabolitos secundarios y la clasificación de la proteína que codifican. Una vez anotado el genoma, estas plataformas pueden predecir los clústers dentro de este.
- Artemis (Rutherford et al., 2000) : programa para visualizar y seleccionar los clústers a utilizar, aquí se analizan los datos obtenidos en las plataformas anteriores.

Luego de tener identificados los clústers específicos de lazo péptidos, se procedió a buscar las homologías de los genes a través de BLAST (Altschul et al., 1990), aplicando la siguiente lógica:

- **Prepéptido o péptido precursor (A)**: generalmente clasificada como proteína hipotética por BLAST.
- **Ciclasa (C)**: identificado en BLAST como gen de la familia asparagina sintasa.
- **Factor sigma (B1)**: identificado en la familia coenzima PQQ para síntesis de proteína D (PqqD) por BLAST.
- **Proteasa (B2)**: identificado por BLAST dentro de la superfamilia Transglut_core3.
- **ABC Transportador (D)**: identificado en BLAST como gen de la familia ABC transporter.
- **Otros (E/F)**: identificado en BLAST como gen para enzimas de oxidoreducción.

Las letras entre paréntesis son el código utilizado para cada dominio con la finalidad de hacer homología con la Figura 2.

Teniendo ya identificados los clústers se procedió a la creación de los partidores que se utilizarán para clonarlos en vectores de sobre-expresión y clonar heterológamente los lazo péptidos.

El vector seleccionado para la clonación es pIJ10257, que destaca por poseer un promotor constitutivo *ermE** (detallado en el capítulo B) y la maquinaria para realizar una integración del material clonado en los sitios *AttP* con sistema de integrasa del bacteriófago BT1 en cepas de *Streptomyces*. Su descripción y mapa se puede encontrar en los anexos B y D respectivamente.

Cebadores sentido se idearon para que coincidieran con el marco de lectura del promotor, ubicándolos en el inicio del prepéptido. Cebadores antisentido se ubicaron después del termino del dominio B2, así se asegura el clonamiento de los dominios sintéticos, ya que los clústers completos son muy extensos y su expresión sería mas complicada experimentalmente. Ya teniendo los cebadores, se validan utilizando la plataforma on line Primer3 plus (Untergasser et al., 2012).

1.3. Clústers de lazo péptidos identificados en la cepa *Streptomyces sp.* HST28

Se identificaron cuatro posibles clústers de lazo péptidos. A cada uno de estos se les nombró con respecto a su aparición dentro del genoma, tal como se muestra en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1: Clústers identificados y su posición en el genoma de *Streptomyces sp.* HST28.

Nombre	Posición	Tamaño (pb)
LP1	2571700...2577378	5696
LP2	2828231...2832938	4709
LP3	3336204...3338833	2634
LP4	7202783...7205030	2673

El clúster de LP1 se muestra en la Figura 1.1; es posible observar que para este lazo péptido se pudieron encontrar todos los componentes del clúster, incluyendo la proteína transportadora, y estos coinciden con la homología tomada.

La imagen 1.1 destaca la secuencia aminoacídica del prepéptido y donde comienza el péptido, evidenciado la presencia de 2 cisteínas que indican el origen de un enlace di-sulfuro. Con los criterios anteriores LP1 puede ser clasificado como clase III (ver Figura 2).

En la Figura 1.1.ii se presenta una tabla con las homologías de cada dominio, encontrando contratos con proteínas presentes en otros *Streptomyces* y coincidencia con la clasificación antes dada. El dominio D de proteína transportadora pude estar un poco lejos de los dominios principales pero podría pertenecer a la maquinaria del lazo péptido por estar después de los dominios E y F (Hegemann et al., 2015; Zhu et al., 2016).

Según los análisis de la plataforma PRISM el clúster de LP2 es el que se muestra en la Figura 1.2, este esquema da a conocer dos posibles proteínas transportadoras. Una característica interesante de este péptido es su secuencia aminoacídica, ya que es diferente a la que se ve comúnmente porque comienza con leucina en vez de glicina, este cambio no debería afectar el tipo de enlace que se origina al formar el ciclo y su clasificación correspondería a un lazo péptido clase II por no presentar cisteínas en su estructura.

La identificación por homología de los dominios del clúster de LP2 arroja que todos ellos tienen una similitud a los dominios de otros lazo péptidos, incluso el péptido precursor se homologó con otro en otra especie de *Streptomyces*.

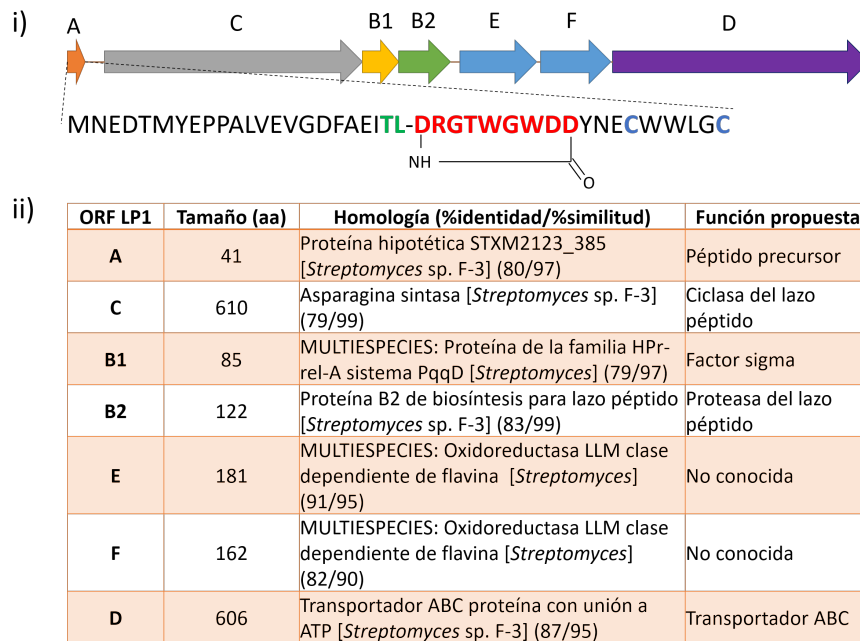


Figura 1.1: Identificación del clúster de LP1. i) Esquema del clúster y secuencia aminoacídica del péptido precursor, Las letras sobre el cluster representan las funciones codificadas. Se utiliza la misma nomenclatura que en la Figura 2. ii) Partes del clúster, tamaño, homología según BLAST de cada parte y función propuesta con respecto a la predicción.

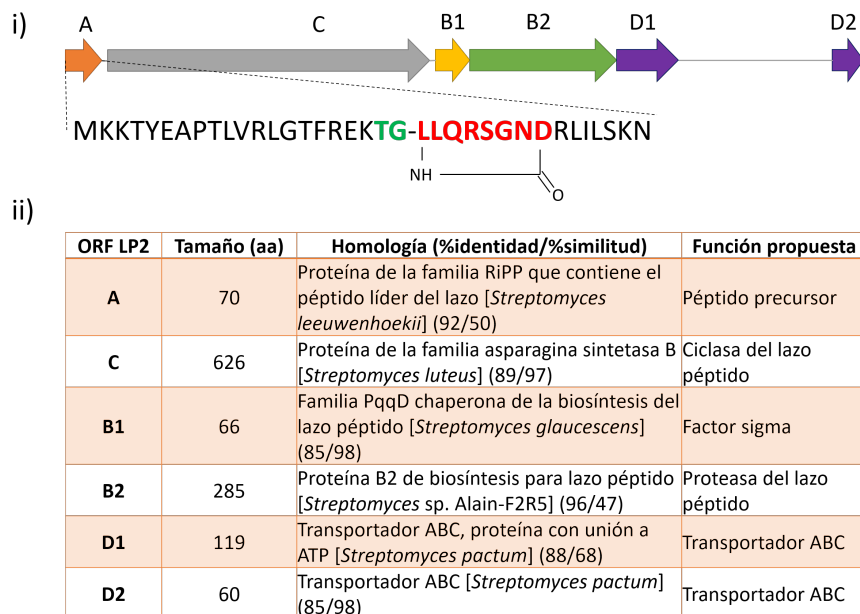


Figura 1.2: Identificación del clúster de LP2. i) Esquema del clúster y secuencia aminoacídica del péptido precursor, Las letras sobre el cluster representan las funciones codificadas. Se utiliza la misma nomenclatura que en la Figura 2. ii) Partes del clúster, tamaño, homología según BLAST de cada parte y función propuesta con respecto a la predicción.

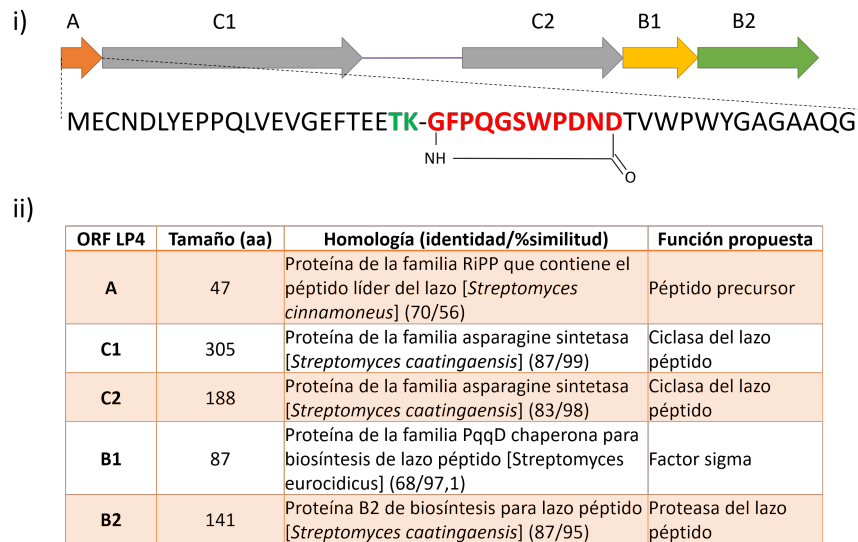


Figura 1.4: Identificación del clúster de LP4. **i)** Esquema del clúster y secuencia aminoacídica del péptido precursor, Las letras sobre el cluster representan las funciones codificadas. Se utiliza la misma nomenclatura que en la Figura 2. **ii)** Partes del clúster, tamaño, homología según BLAST de cada parte y función propuesta con respecto a la predicción.

La incongruencia entre ambos análisis se podría explicar al observar los dominios mostrados en la Figura 1.4.i, donde se ven dos posibles sitios de la proteína C (nombrados como C1 y C2), generalmente esta proteína corresponde a una sola sección dentro del clúster de lazo péptido (Hegemann et al., 2015; Zhu et al., 2016). Con esta única particularidad en el clúster, LP4 se clasifica como clase II.

La creación de partidores se llevó a cabo siguiendo el protocolo presentado en esta sección. Se pone énfasis en esta construcción ya que, con estos se realizará la expresión heteróloga de los clústers, los dominios que serán clonados son: A, B1, B2 y C. No serán clonados los dominios D y E/F porque no son parte importante dentro de la biosíntesis, a demás por la dificultad de clonar clúster mayores a 3500 pb.

Las consideraciones para crear estos cebadores fueron:

1. Conservar el marco de lectura del primer gen del clúster de biosíntesis de lazo péptido para clonarlo corriente abajo del promotor constitutivo *ermE** presente en el vector pIJ10257 (detallado en el capítulo B); por esto es que se escogió el sitio de restricción NdeI, ya que su corte deja un codón codificante para metionina al inicio del clúster alineado con el marco de lectura requerido.
2. Para escoger el segundo sitio de restricción se tuvo en cuenta que fuera de extremo cohesivo y único en el vector, HindIII cumplía con esto.
3. La temperatura de alineamiento de la pareja de partidores no debe diferir en más de ± 2 o 3 °C.

Al final se construyeron los vectores *in silico* utilizando las plataforma Benchling (2018), los cuales se pueden ver en el anexo D.

1.4. Conclusiones

1. Se identificaron cuatro clústers de genes de lazo péptidos en el genoma de *Streptomyces* sp. HST28.
2. Se clasificó cada lazo péptido en su clase correspondiente basándose en su secuencia nucleotídica, LP1 clase III, LP2, LP3 y LP4 clase II.
3. La arquitectura de los clústers de los lazo péptidos encontrados son consistentes con los reportados en literatura.
4. Los partidores fueron diseñados tomando las consideraciones para que pudieran ser utilizados en la etapa de clonación heteróloga de los clústers.

Capítulo 2

Modelo *in silico* de lazo péptidos

2.1. Resumen

Las herramientas computacionales son muy útiles en el estudio de nuevas estructuras biológicas, particularmente de proteínas y péptidos, los cuales pueden ser diseñados en tres dimensiones solo teniendo su secuencia aminoacídica. Para este proceso se emplea la comparación con estructura de moléculas ya reportadas.

En esta sección se buscó crear modelos computacionales (*in silico*) de los lazo péptidos encontrados en el genoma de *Streptomyces* sp. HST28 en el Capítulo 1. Con esta finalidad primero se generó una base de datos de las estructuras de lazo péptidos ya encontradas y descritas, las que fueron analizadas detalladamente, luego se seleccionaron aquellas moléculas que coincidían con las características de los péptidos que se construirían.

Después de la selección de templados para los modelos, se creó cada uno y posteriormente es analizado, se describen sus interacciones internas, puentes de hidrógeno, puentes salinos, interacciones hidrofóbicas, los valores de cada residuo en el gráfico de Ramachandran, entre otros.

Los modelos para LP1, LP2, LP3 y LP4 fueron creados y caracterizados, luego se calcula el campo electrostático de algunos de estos modelos y se contrastan con los campos de sus templados encontrando algunas similitudes de cargas y espaciales para algunos de los péptidos, otros no presentaron similitudes.

Una investigación más detallada de las interacciones electrostáticas de lazo péptidos ya descritos podría determinar patrones en relación a la actividad que estos tengan o formación de estructuras complejas.

2.2. Introducción

2.2.1. Modelamiento *in silico* de proteínas y péptidos, usos y ventajas

El modelamiento *in silico* de proteínas se basa en una construcción de modelos 3D realizando una comparación entre la secuencia aminoacídica de la proteína objetivo con la de una o más estructuras ya predichas, las que se utilizan como templados. El proceso básico que se utiliza para realizar estas predicciones es hacer primero un alineamiento de los templados (secuencia aminoacídica) con la proteína objetivo, para con esto construir el modelo luego evaluarlo a través del gráfico de Ramachandran que presenta los ángulos típicos de cada residuo permitiendo aproximar la estructura predicha a una real (Lovell et al., 2002) y potencial electrostático. Si la evaluación no es favorable se vuelve a la etapa de construcción del modelo (Fiser et al., 2000; Martí-Renom et al., 2000; Šali and Blundell, 1993).

La utilidad de aplicar esta estrategia es obtener una caracterización funcional previa de proteínas que se estén estudiando recientemente y cuyo estudio en laboratorio no haya sido realizado aún (Webb and Sali, 2016). Además de la predicción funcional también se puede utilizar como herramienta de diseño de mutagénesis dirigida y generar una base de datos de familias de proteínas, ya que para estos modelos se tiene que estudiar detenidamente cada estructura conocida (Cuff and Barton, 2000).

Para obtener una predicción funcional el modelo es sometido a dinámicas moleculares, con esto se puede ver la estabilidad de la estructura, la energía libre en diferentes estados y la interacción sobre compuestos o ligandos de interés (Chen et al., 2009; Plattner et al., 2017; van Gunsteren and Berendsen, 1990).

Existen algunos problemas con esta metodología de predicción, ya que la relación entre secuencia y funcionalidad de las proteínas muchas veces no es directa, si no que depende de otros factores (Devos and Valencia, 2000). Por otra parte, el resultado del modelamiento por homología de secuencias en muchos casos no es correcto, por esto se utiliza paralelamente un análisis de la estructura 3D del templado (Fiser, 2017).

Por consiguiente en esta sección se propone la creación de modelos de lazo péptidos basados en homología de secuencias y a análisis estructurales de templados, de esta forma se puede construir una metodología para el futuro modelamiento de esta familia de péptidos y su predicción funcional.

2.3. Metodología para la creación de modelos *in silico* específica para lazo péptidos

El análisis de la estructura 3D de los lazo péptidos basándose en comparaciones con otros ya estudiados se realizó de la siguiente manera.

1. Se creó una base de datos local de los lazo péptidos utilizados para la comparación. Archivos obtenidos directamente desde la página *Protein Data Bank* (Berman et al., 2000; Rose et al., 2017) guardados en formato pdb.
2. Se realizó una comparación de los péptidos, donde se incluyeron sus características estructurales 3D, comparación de secuencias, actividad (si la tuvieran), clase, organismo, entre otros aspectos.
3. Luego se procedió a realizar un alineamiento múltiple de la secuencia peptídica contra la base de datos creada, utilizando el programa Modeller (Fiser et al., 2000; Webb and Sali, 2016).
4. Con el análisis comparativo y el alineamiento de las secuencias se procedió a ver cual se asemejaba mas a cada lazo péptido y se eligieron los templados a utilizar.
5. Para obtener los modelos se utilizó el programa Chimera (Pettersen et al., 2004), por su facilidad de visualizar los modelos en el momento a través de su interfaz.
6. Ya creados los modelos, se hizo una primera selección visual, si el modelo lograba formar el lazo característico o no viendo la cercanía de los aminoácidos que forman el enlace del ciclo.
7. Los primeros modelos seleccionados fueron sometidos a minimización y dinámica molecular simple utilizando las herramientas incorporadas en Chimera.
8. Después de estas modificaciones se analizaron los modelos a través de diferentes plataformas de validación, donde se buscaron los principales parámetros utilizando el gráfico de Ramachandran (Lovell et al., 2002) y el cálculo de potenciales electrostáticos.
9. Por último se realizó una comparación de estos con los parámetros de sus templados, así el que este mas cerca de estos parámetros se puede validar como modelo teórico.

2.4. Análisis de las características estructurales y funcionales de lazo péptidos con estructura 3D reportada

Con la finalidad de generar modelos de lazo péptidos *in silico* contundentes es que se creó una base de datos de los lazo péptidos con estructuras ya reportadas. Analizando cada estructura es que se construyeron las tablas G.5, G.6 y G.7 (ver Anexo G.2), desde éstas se seleccionaron los templados para la construcción de los modelos de LP1, LP2, LP3 y LP4.

Después se analizaron mas a fondo los templados seleccionados para cada lazo péptido y luego se realizó una comparación de estos con los modelos resultantes.

2.5. Diseño y análisis de modelo *in silico* de LP1

Para LP1 se obtuvo la predicción de PRISM mostrada en la Figura 2.1 donde se revela el enlace entre D1 y D9, además se evidencia un enlace covalente entre las cisteínas C13 y C18.

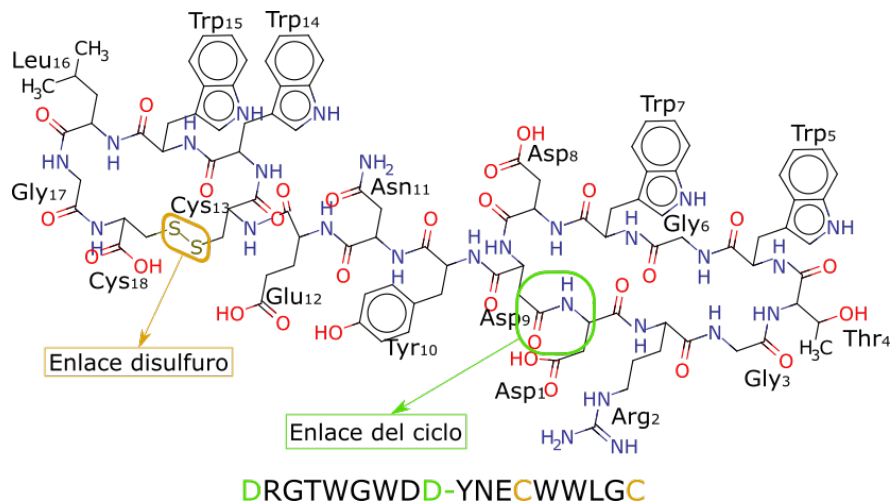


Figura 2.1: Predicción 2D de LP1 realizada por PRISM. Se muestra destacado en café el enlace disulfuro que se genera entre C13 y C18 y en verde el enlace que forma el ciclo entre D1 y D9.

Empleando esta predicción se buscan los templados más acordes que faciliten la creación del modelo para LP1. Utilizando las tablas del Anexo G.2 se seleccionaron los templados caracterizados en la Tabla 2.1.

El primer templado elegido fue LP2006 (5jpl) debido a que tienen dos cisteínas en su secuencia por lo tanto es de clase III, al igual que LP1. Este péptido es el único de su clase con estructura estudiada. Algunas diferencias son que en 5jpl el enlace del ciclo es con E8 y LP1 lo debería realizar con D9, además LP1 comienza con D y no con G como pasa con los lazo péptidos comúnmente, por estas razones se buscaron otros templados que pudieran satisfacer los requerimientos anteriores.

Los templados seleccionados finalmente fueron Streptomomicin (2mw3) que comienza con S y el ciclo se cierra D8; Chaxapeptin (2n5c) que comienza con G pero su enlace es con D9 y presenta un porcentaje de identidad mayor a otros posibles templados con respecto a LP1, también tiene la particularidad de encajar bien en la estructura el residuo que se encuentra justo antes de atravesar el anillo; por último Caulonodin V (2mlj) comienza con S pero su enlace es con E9, este templado es el que menor porcentaje de identidad presentaba con respecto a LP1.

Considerando el análisis anterior, se construyeron modelos preliminares. Estos se generaron a partir de combinaciones de los templados, obteniéndose 20 modelos. El primer filtro aplicado fue ver la distancia entre los aminoácidos que forman el enlace del ciclo (D1 y D9), distinguiendo 3 modelos, de los cuales se eligió uno para el análisis detallado.

Tabla 2.1: Tabla comparativa de planteados seleccionados para modelar LP1

PDB: Nombre	5jpl: LP2006	2mw3: Streptomomicin
Organismo	<i>Nocardioptis alba</i>	<i>Streptomonospora alba</i>
Referencia	(Warren et al., 2017)	(Metelev et al., 2015)
Secuencia	GRPNWGF E -NDWS- CVRVC	SLGSSPYND-ILGY P - A LIVIYP
Clase	III	II
Largo	17	21
N° aa ciclo	8	9
N° aa asa	4	5
aa antes del ciclo	S12 (puentes de hidrógeno con E8, F7)	P14
aa después del ciclo	C13 (puentes de hidrógeno con R2, G1)	A15 (puentes de hidrógeno con Y7)
Método	NMR	NMR
Características estructura	Enlace disulfuro entre cisteína terminal y cisteína que cruza el ciclo, estructura compacta, ondas suaves en ciclo	Estructura del ciclo adecuado a P14, poco compacto, asa cubre enlace del ciclo
Actividad	Antimicrobiana	Antimicrobiana
PDB: Nombre	2n5c: Chaxapeptin	2mlj: Caulonodin V
Organismo	<i>Streptomyces leeuwenhoekii</i>	<i>Caulobacter sp.</i> (strain K31)
Referencia	(Elsayed et al., 2015)	(Elsayed et al., 2015)
Secuencia	GFGSKPL D -SFGL- NFF	SIGDSGLR E -SMSSQTY- WP
Clase	II	II
Largo	15	18
N° aa ciclo	8	9
N° aa asa	4	7
aa antes del ciclo	L12 (puentes de hidrógeno con G1)	Y16 (puentes de hidrógeno con S1, G3)
aa después del ciclo	N13 (puentes de hidrógeno con P6, L7)	W17
Método	NMR	NMR
Características estructura	Estructura adecuada a L12, enlace del ciclo cubierto por el asa, estructura compacta con puentes de hidrógeno	Y16, W17 residuos aromáticos grandes, estructura adecuada a los residuos con ondas subes en el ciclo, poco compacto con puentes de hidrógeno
Actividad	Actividad inhibidora significativa contra línea celular de cáncer de pulmón humano A549, actividad antibacteriana contra bacterias gram positivas	No conocida

La Figura 2.2 muestra el modelo preliminar seleccionado. Se puede destacar la cercanía de los residuos que debería formar el enlace, en el caso de la formación del enlace disulfuro las cisteínas se encuentran alejadas y obstaculizadas por el triptófano 14 (W14).

En la imagen se percibe la forma de lazo característica que se busca, los residuos que atraviesan el lazo son un ácido glutámico (E12) sobre el ciclo y una cisteína (C14) bajo este, esta configuración se asemeja principalmente al planteadado 5jpl. Los residuos no están acomodados en la estructura y faltan interacciones entre las diferentes partes de la molécula que hagan que se compacte y sea más rígida.

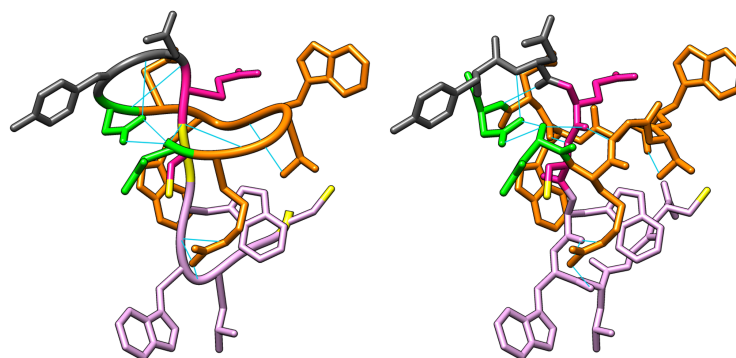


Figura 2.2: Modelo preliminar de LP1, construido con los templados 5jpl, 2mw3 y 2n5c. Se encuentra coloreados en **verde** los residuos que forman el enlace (D1 y D9), en **naranja** los residuos del ciclo, en **rosado** los residuos que se encuentran antes y después del ciclo (E12 y C14), en **gris** los residuos del asa, en **amarillo** las cisteínas y en **morado claro** los residuos de la cola. Asimismo en **celeste** se pueden ver líneas que representan posibles puentes de hidrógeno que estabilizan la estructura.

La segunda etapa consistió en ajustar la estructura a través de dinámica molecular, para esto primero se rotó C13 y W14 dejando la cisteína en posición cercana a C18, después se fuerza un enlace entre cisteínas, a pesar de que la distancia no sea óptima. Luego de las modificaciones se realizó la dinámica con la finalidad de que los residuos se ajusten formando interacciones que compacten y disminuyan la energía de la molécula.

Antes de cada dinámica se sometió el modelo a una minimización con la finalidad de tener la menor energía posible entre los residuos. Se obtuvieron 5000 cuadros de cada modelo creado inicialmente, las Figuras 2.3 y 2.4 destacan dos cuadros de modelos diferentes y la hidrofobicidad de su superficie. El patrón de la superficie es muy similar en cada frame, sobresale una gran región hidrofílica superior y una pequeña hidrofóbica donde se encuentra una leucina (L16) como aminoácido predominante.

Un análisis más detallado del modelo de la estructura de LP1-m5-4 se puede encontrar en la Tabla 2.2. Particularmente aquí las interacciones que estabilizan la molécula se encuentran equiparadas entre las cadenas laterales y el esqueleto de carbono, recalcando un posible puente salino entre arginina 2 y ácido aspártico 1 (R2 y D1).

Se puede apreciar destacado en amarillo en la Tabla 2.2 la relación presente entre los residuos que deberían formar el enlace, las distancia entre ellos para ambos frame es mayor a 2,8 Å, algo que puede ser mejorado forzando el enlace y luego minimizando la energía de la estructura. Por otro lado, el enlace disulfuro tiene una distancia de 2,032 y 2,073 (Å) en cada modelo, lo que está dentro del promedio de distancia para este tipo de enlace.

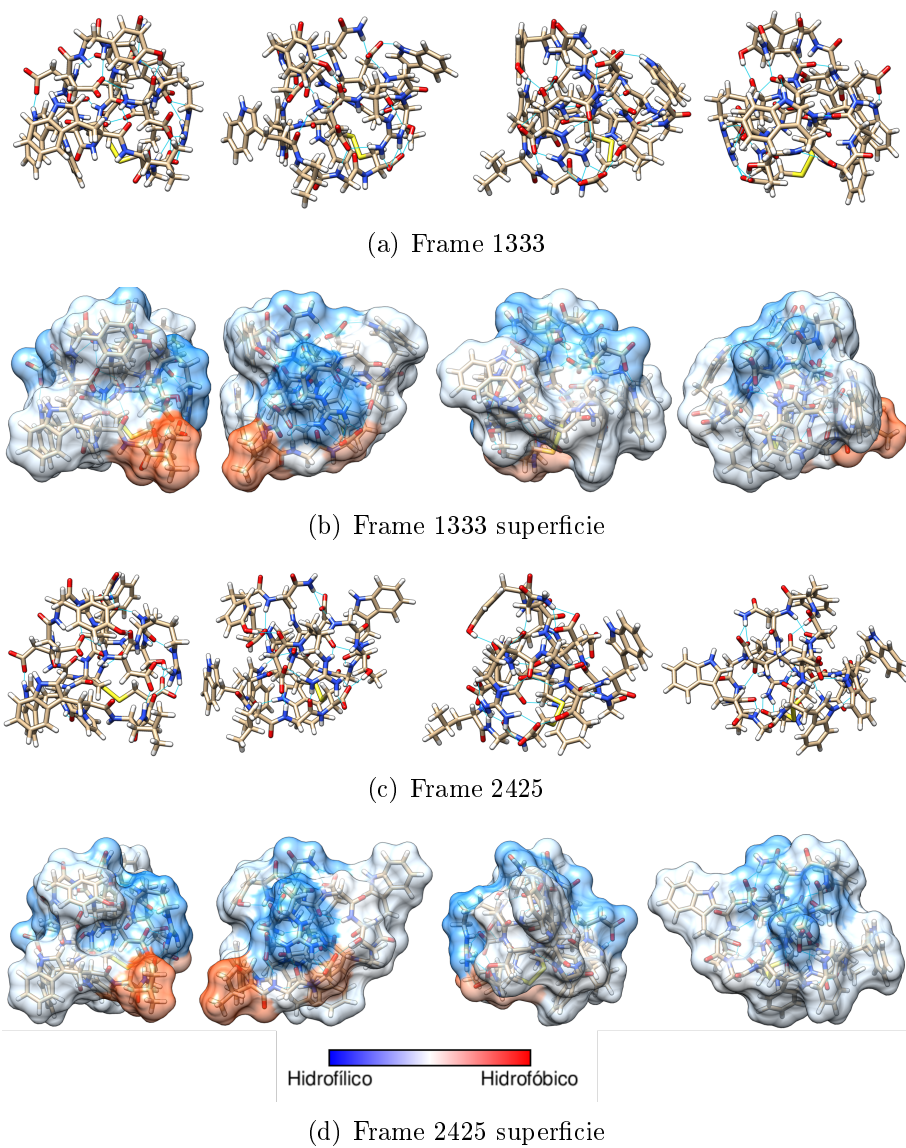


Figura 2.3: Modelo LP1-m5-4 después de dinámica molecular. (a) y (b) muestran el cuadro o frame 1333 de la dinámica molecular junto con la hidrofobicidad de la superficie. (c) y (d) muestran el cuadro o frame 2425 de la dinámica molecular junto con la hidrofobicidad de la superficie.

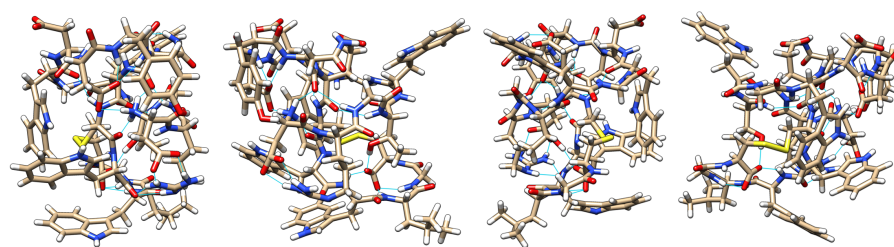
Tabla 2.2: Interacciones por puentes de hidrógeno encontradas en modelo LP1-m5-4. En amarillo se encuentra destacada la interacción donde se debería formar el enlace del ciclo, en celeste se destacan los átomos que forman parte del esqueleto de carbono y en blanco los que se encuentran en las cadenas laterales. Las filas destacadas en rojo son posibles puentes salinos dentro de la estructura.

Frame 1333					Frame 2425				
Dador (D)	Acceptor (A)	Hidrógeno	Distancia D..A (Å)	Distancia D-H..A (Å)	Dador (D)	Acceptor (A)	Hidrógeno	Distancia D..A (Å)	Distancia D-H..A (Å)
ASP 1 N	ASP 9 OD1	ASP 1 H2	2.829	2.070	ASP 1 N	ASP 9 OD1	ASP 1 H1	2.823	2.082
ASP 1 N	GLU 12 O	ASP 1 H1	2.730	1.827	ASP 1 N	GLU 12 O	ASP 1 H3	2.658	1.766
ASP 1 N	TRP 15 O	ASP 1 H3	3.211	2.398	ARG 2 NE	ARG 2 O	ARG 2 HE	2.746	1.799
ARG 2 NE	ARG 2 O	ARG 2 HE	2.711	1.927	ARG 2 NH1	ASP 1 OD2	ARG 2 HH11	2.772	1.781
ARG 2 NH1	ASP 1 OD1	ARG 2 HH11	2.823	1.852	ARG 2 NH1	GLY 17 O	ARG 2 HH12	2.788	1.850
ARG 2 NH1	CYS 18 O	ARG 2 HH12	2.752	1.755	ARG 2 NH2	CYS 18 O	ARG 2 HH22	2.674	1.877
ARG 2 NH2	ARG 2 O	ARG 2 HH21	2.954	2.240	ARG 2 NH2	CYS 18 OXT	ARG 2 HH21	2.782	1.973
ARG 2 NH2	CYS 18 O	ARG 2 HH22	2.975	2.076	GLY 3 N	GLU 12 OE1	GLY 3 H	2.718	1.778
ARG 2 NH2	CYS 18 OXT	ARG 2 HH22	2.794	1.893	THR 4 N	ARG 2 O	THR 4 H	3.039	2.241
GLY 3 N	GLU 12 OE1	GLY 3 H	2.741	1.774	THR 4 OG1	CYS 18 OXT	THR 4 HG1	2.582	1.621
THR 4 OG1	CYS 18 OXT	THR 4 HG1	2.592	1.612	GLY 6 N	THR 4 O	GLY 6 H	2.789	1.861
TRP 5 NE1	GLU 12 OE2	TRP 5 HE1	2.756	1.796	TRP 7 NE1	TRP 14 O	TRP 7 HE1	3.296	2.348
GLY 6 N	THR 4 O	GLY 6 H	2.803	1.895	TYR 10 OH	ASP 1 O	TYR 10 HH	3.033	2.097
ASP 9 N	ASN 11 O	ASP 9 H	3.099	2.276	ASN 11 N	ASP 9 OD1	ASN 11 H	2.958	1.966
TYR 10 OH	ASP 1 O	TYR 10 HH	2.722	1.770	ASN 11 ND2	GLU 12 OE1	ASN 11 HD22	2.744	1.895
ASN 11 N	ASP 9 OD1	ASN 11 H	2.855	1.844	ASN 11 ND2	GLU 12 OE2	ASN 11 HD22	3.128	2.159
ASN 11 ND2	GLU 12 OE1	ASN 11 HD22	2.744	1.734	CYS 13 N	TRP 7 O	CYS 13 H	2.663	1.712
CYS 13 N	TRP 7 O	CYS 13 H	2.922	1.967	TRP 14 NE1	ASP 8 OD2	TRP 14 HE1	2.774	1.770
TRP 14 NE1	ASP 8 OD2	TRP 14 HE1	2.817	1.835	GLY 17 N	ASP 1 OD1	GLY 17 H	2.747	1.777
GLY 17 N	ASP 1 OD1	GLY 17 H	2.845	1.825					

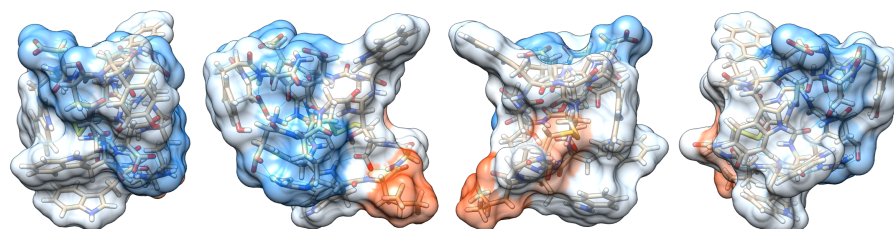
Ahora el análisis para el modelo LP1-m6 es similar al anterior donde en la Figura 2.4 se observa la estructura de dos cuadros del modelo con las respectivas hidrofobicidades en sus superficies. Leucina 16 (L16) vuelve a destacar como zona hidrofóbica, además tiene un anillo hidrofílico marcado contrario, esta configuración puede determinar alguna interacción con otras moléculas o entre estas mismas formando estructuras complejas.

En la Tabla 2.3 se aprecian los puentes de hidrógenos formados en cada caso, existe una diferencia en la cantidad de puentes formados y también en la configuración de éstos, en el frame 2039 se pueden advertir pocas interacciones entre residuos que esten solo en el esqueleto de carbono, no si en el frame 2987, esto puede significar una mayor compactación de la estructura. Dentro de las interacciones se observa un posible puente salino entre arginina 2 y ácido aspártico 1 (R2 y D1) en ambas situaciones.

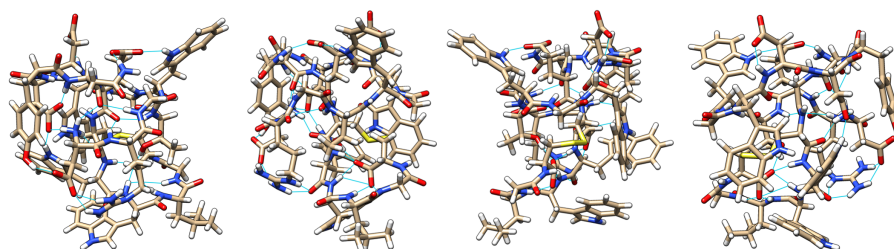
Una cosa importante dentro de la Tabla 2.3 es la interacción encontrada entre los residuos que forman el enlace del ciclo, teniendo distancias entre átomos menores que en el modelo anterior. La distancia del enlace disulfuro es similar.



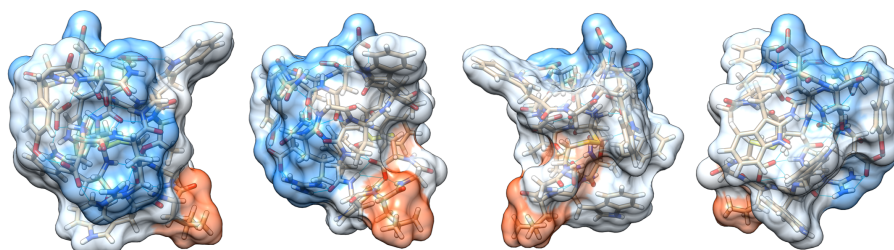
(a) Frame 2039



(b) Frame 2039 superficie



(c) Frame 2987



Hidrofílico  Hidrofóbico

(d) Frame 2987 superficie

Figura 2.4: Modelo LP1-m6 después de dinámica molecular. (a) y (b) muestran el cuadro o frame 2039 de la dinámica molecular junto con la hidrofobicidad de la superficie. (c) y (d) muestran el cuadro o frame 2987 de la dinámica molecular junto con la hidrofobicidad de la superficie.

Tabla 2.3: Interacciones por puentes de hidrógeno encontradas en modelo LP1-m6. En amarillo se encuentra destacada la interacción donde se debería formar el enlace del ciclo, en celeste se destacan los átomos que forman parte del esqueleto de carbono y en blanco los que se encuentran en las cadenas laterales.

Frame 2039					Frame 2987				
Dador (D)	Aceptor (A)	Hidrógeno	Distancia D..A (Å)	Distancia D-H..A (Å)	Dador (D)	Aceptor (A)	Hidrógeno	Distancia D..A (Å)	Distancia D-H..A (Å)
ASP 1 N	ASP 9 OD2	ASP 1 H3	2.633	1.738	ASP 1 N	ASP 9 OD2	ASP 1 H1	2.631	1.785
ASP 1 N	ASN 11 O	ASP 1 H2	2.591	1.722	ASP 1 N	ASN 11 O	ASP 1 H3	2.841	2.009
ASP 1 N	CYS 13 O	ASP 1 H1	2.638	1.669	ASP 1 N	CYS 13 O	ASP 1 H2	2.778	1.860
ARG 2 NE	TRP 14 O	ARG 2 HE	2.952	1.976	ARG 2 N	GLU 12 O	ARG 2 H	3.333	2.349
ARG 2 NH1	ASP 1 OD1	ARG 2 HH11	2.695	1.716	ARG 2 NE	TRP 14 O	ARG 2 HE	2.888	1.964
ARG 2 NH2	ASP 1 OD2	ARG 2 HH22	2.792	1.854	ARG 2 NH1	ASP 1 OD2	ARG 2 HH11	2.813	1.912
ARG 2 NH2	TRP 14 O	ARG 2 HH21	2.988	2.081	ARG 2 NH2	ASP 1 OD2	ARG 2 HH22	2.827	1.963
GLY 3 N	ASN 11 O	GLY 3 H	3.258	2.300	ARG 2 NH2	TRP 14 O	ARG 2 HH21	2.715	1.796
THR 4 N	GLU 12 O	THR 4 H	3.298	2.400	GLY 3 N	ASN 11 O	GLY 3 H	2.972	1.955
THR 4 OG1	CYS 18 OXT	THR 4 HG1	2.769	1.809	THR 4 N	GLU 12 O	THR 4 H	2.776	1.911
TYR 10 N	ASP 9 OD1	TYR 10 H	2.606	1.622	THR 4 OG1	CYS 18 OXT	THR 4 HG1	2.711	1.703
ASN 11 N	ASP 9 OD1	ASN 11 H	2.994	2.003	TRP 5 NE1	GLU 12 OE2	TRP 5 HE1	3.004	2.091
ASN 11 ND2	GLU 12 OE1	ASN 11 HD21	3.065	2.279	ASP 8 N	ASP 8 OD2	ASP 8 H	2.684	1.840
CYS 13 N	TRP 7 O	CYS 13 H	3.029	2.146	TYR 10 OH	ASP 1 OD1	TYR 10 HH	2.744	1.815
TRP 15 N	CYS 18 OXT	TRP 15 H	2.748	1.885	ASN 11 N	ASP 9 OD1	ASN 11 H	3.134	2.132
LEU 16 N	CYS 18 O	LEU 16 H	3.007	2.018	ASN 11 ND2	GLU 12 OE1	ASN 11 HD21	2.820	1.855
GLY 17 N	CYS 18 O	GLY 17 H	2.811	1.838	TRP 14 N	CYS 18 OXT	TRP 14 H	2.789	1.792
					TRP 14 NE1	ASP 9 OD2	TRP 14 HE1	2.787	1.856
					TRP 15 N	CYS 18 O	TRP 15 H	3.337	2.617
					TRP 15 N	CYS 18 OXT	TRP 15 H	2.818	1.792
					LEU 16 N	CYS 18 O	LEU 16 H	2.866	1.853
					GLY 17 N	CYS 18 O	GLY 17 H	2.863	1.880

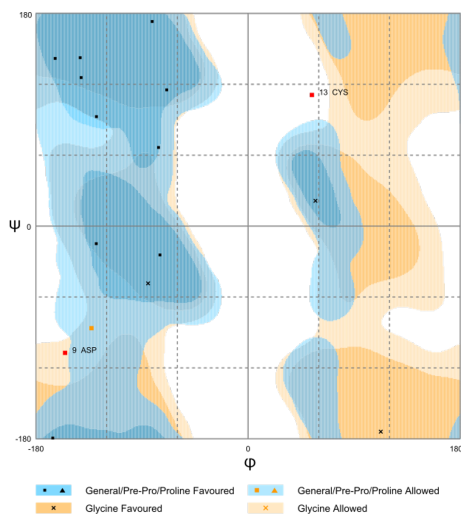
2.5.1. Análisis de los ángulos de los residuos para modelos de LP1 a través del gráfico de Ramachandran

La Figura 2.5 muestran los gráficos de Ramachandran de los modelos LP1.

Evaluando cada modelo, LP1-m5-4 presenta la mayor parte de sus residuos dentro de las zonas favorables y permitidas del gráfico, pero tiene dos residuos en la zona atípica, lejos de los sectores azules, ácido aspártico 9 (D9) y cisteína 13 (C13), estos son de los residuos más importantes dentro de la molécula, por esto es desfavorable que no cumplan con los ángulos permitidos por el gráfico. Si analizamos la Tabla G.8 este problema no se encuentra en los templados utilizados.

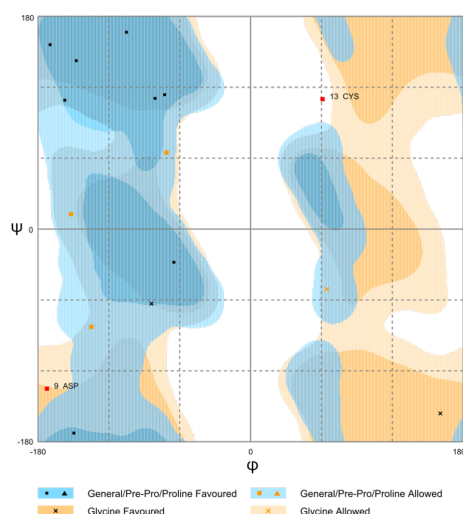
El modelo LP1-m6 también tiene la mayor parte de sus residuos dentro de las áreas favorables y permitidas, en el caso del frame 2039 se presentan dos residuos en la región atípica, glicina 6 (G6) y ácido glutámico 12 (E12), pero la glicina al ser un aminoácido pequeño, sin cadena lateral y poco impedimento estérico, se puede presentar en zonas atípicas, por esto la única complicación sería con E12 que está justo antes del ciclo.

Para el frame 2987 de LP1-m6 se agregan dos residuos más a la zona atípica, es decir, tiene cuatro residuos en esta región, glicina 6 (G6), ácido glutámico 12 (E12), glicina 17 (G17) y tirosina 10 (Y10), el caso de G17 es parecido al de G6 ya analizado, en cambio Y10 presenta un impedimento estérico mayor al ser un residuo aromático por lo tanto su presencia en zona atípica es desfavorable para el modelo, en este caso al ubicarse justo al borde de las zonas azules se puede dar una excepción en el residuo.



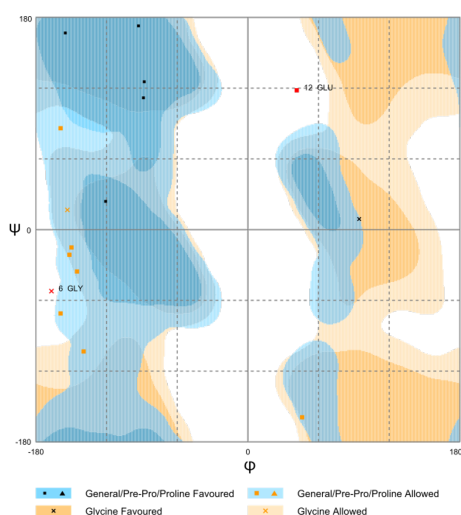
Número de residuos en región favorable	13 (81,2%)
Número de residuos en región permitida	1 (6,2%)
Número de residuos en región atípica	2 (12,5%)

(a) Modelo LP1-m5-4 frame 1333



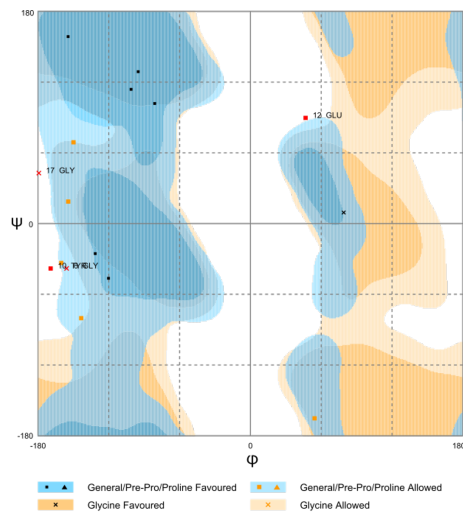
Número de residuos en región favorable	10 (62,5%)
Número de residuos en región permitida	4 (25%)
Número de residuos en región atípica	2 (12,5%)

(b) Modelo LP1-m5-4 frame 2425



Número de residuos en región favorable	6 (37,5%)
Número de residuos en región permitida	8 (50%)
Número de residuos en región atípica	2 (12,5%)

(c) LP1-m6 frame 2039



Número de residuos en región favorable	7 (43,8%)
Número de residuos en región permitida	5 (31,2%)
Número de residuos en región atípica	4 (25%)

(d) LP1-m6 frame 2987

Figura 2.5: Gráficos de Ramachandran para los modelos de LP1 (Lovell et al., 2002). Los puntos marcados en rojo son aquellos residuos que se encuentran en las zonas atípicas del gráfico.

2.6. Diseño y análisis de modelo *in silico* LP2

El modelamiento de LP2 fue realizado con el mismo procedimiento que LP1. La Figura 2.6 muestra el enlace del ciclo entre leucina 1 (L1) y ácido aspártico 8 (D8).

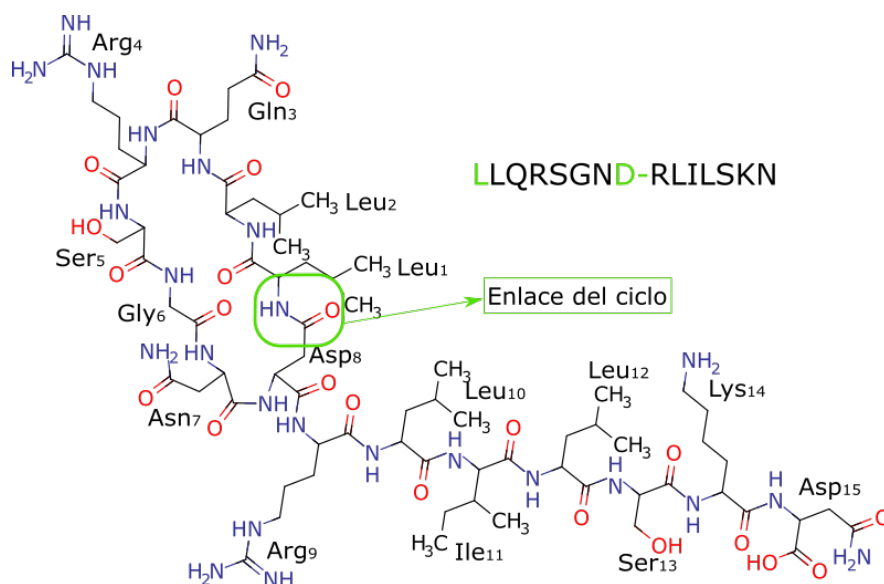


Figura 2.6: Predicción 2D de LP2 realizada por PRISM. Se muestra destacado en verde el enlace que forma el ciclo entre L1 y D8.

Analizando la secuencia aminoacídica y las anotaciones de las Tablas del Anexo G.2 se tienen las siguientes observaciones: en todas las estructuras de menos de 17 aminoácidos las asas tienen entre 3 y 4 residuos, a lo menos presentan 2 residuos en la cola, si el residuo antes del ciclo es aromático el que está a continuación también lo es, cuando el residuo antes del ciclo no es aromático se cumple que es más grande o similar en tamaño (para el caso glicina-glicina) que el de después.

Con las observaciones anteriores se examina la secuencia de LP2, concluyendo que leucina 12 (L12) es el aminoácido que debería estar antes del ciclo porque serina 13 (S13) es de un tamaño menor, el asa quedaría con 4 residuos y la cola con 3. Para que el modelo ajuste correctamente la leucina, se seleccionaron los plantados presentes en la Tabla 2.4, los cuales cumplen con tener una leucina antes del ciclo y 4 aminoácidos en el asa.

Se construyeron alrededor de 20 modelos, luego se analizó la ubicación de los residuos que forman el enlace y desde ahí se seleccionan los modelos que más se ajustan a los requerimientos. Uno de los modelos que cumplía con las especificaciones es el que se muestra en la Figura 2.7. Se observa que la leucina 12 (en rosado) se encuentra justo por encima del anillo y serina 13 por debajo, cumpliéndose con los supuestos planteados.

Las dinámicas moleculares realizadas a este modelo buscan compactar la estructura, formando así la mayor cantidad de interacciones entre sus átomos. En las Figuras 2.8 y 2.9 se muestran dos modelos de LP2 sometidos a dinámica molecular, produciendo 5000 cuadros de cada uno, después de una evaluación preliminar de todos los cuadros se detallan dos frame de cada modelo.

Tabla 2.4: Tabla comparativa de plantados seleccionados para modelar LP2

PDB: Nombre	5xm4: Subterisin	2n5c: Chaxapeptin
Organismo	Novosphingobium subterraneum	Streptomyces leeuwenhoekii
Referencia	(Kuroha et al., 2017)	(Elsayed et al., 2015)
Secuencia	GPPGDRIE-FGV L -AQLPG	GFGSKPLD-SF G L-NFF
Clase	II	II
Largo	17	15
N° aa ciclo	8	8
N° aa asa	4	4
aa antes del ciclo	L12	L12 (puentes de hidrógeno con G1)
aa después del ciclo	A13 (puentes de hidrógeno con R6)	N13 (puentes de hidrógeno con P6, L7)
Método	NMR	NMR
Características estructura	Ciclo ondas suaves, estructura compacta	Estructura adecuada a L12, enlace del ciclo cubierto por el asa, estructura compacta con puentes de hidrógeno
Actividad	No conocida	Actividad inhibidora significativa contra línea celular de cáncer de pulmón humano A549, actividad antibacteriana contra bacterias gram positivas

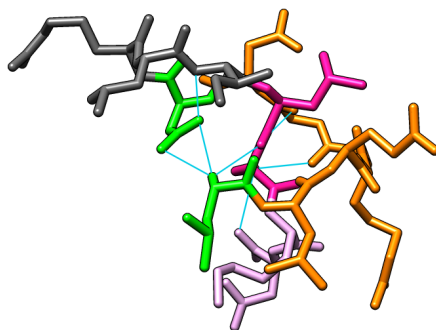


Figura 2.7: Modelo preliminar de LP2, construido con los plantados 5xm4 y 2n5c. Se encuentra coloreados en **verde** los residuos que forman el enlace (L1 y D8), en **naranja** los residuos del ciclo, en **rosado** los residuos que se encuentran antes y después del ciclo (L12 y S13), en **gris** los residuos del asa y en **morado claro** los residuos de la cola. Asimismo en **celeste** se pueden ver líneas que representan posibles puentes de hidrógeno que estabilizan la estructura.

El modelo LP2-m2-1 (Figura 2.8) tiene representada la hidrofobicidad de su superficie en 2.8.b y 2.8.d, estas imágenes muestran dos zona bien delimitadas, una hidrofóbica y otra hidrofílica, el sector hidrofóbico esta conformado por todas las cadenas laterales de leucina e isoleucina de la estructura, en la parte neutra se encuentras las serinas (5 y 13) y el resto

de los residuos forman la zona azul hidrofílica. Esta configuración podría determinar algún tipo de interacción entre los péptidos o con otras agentes.

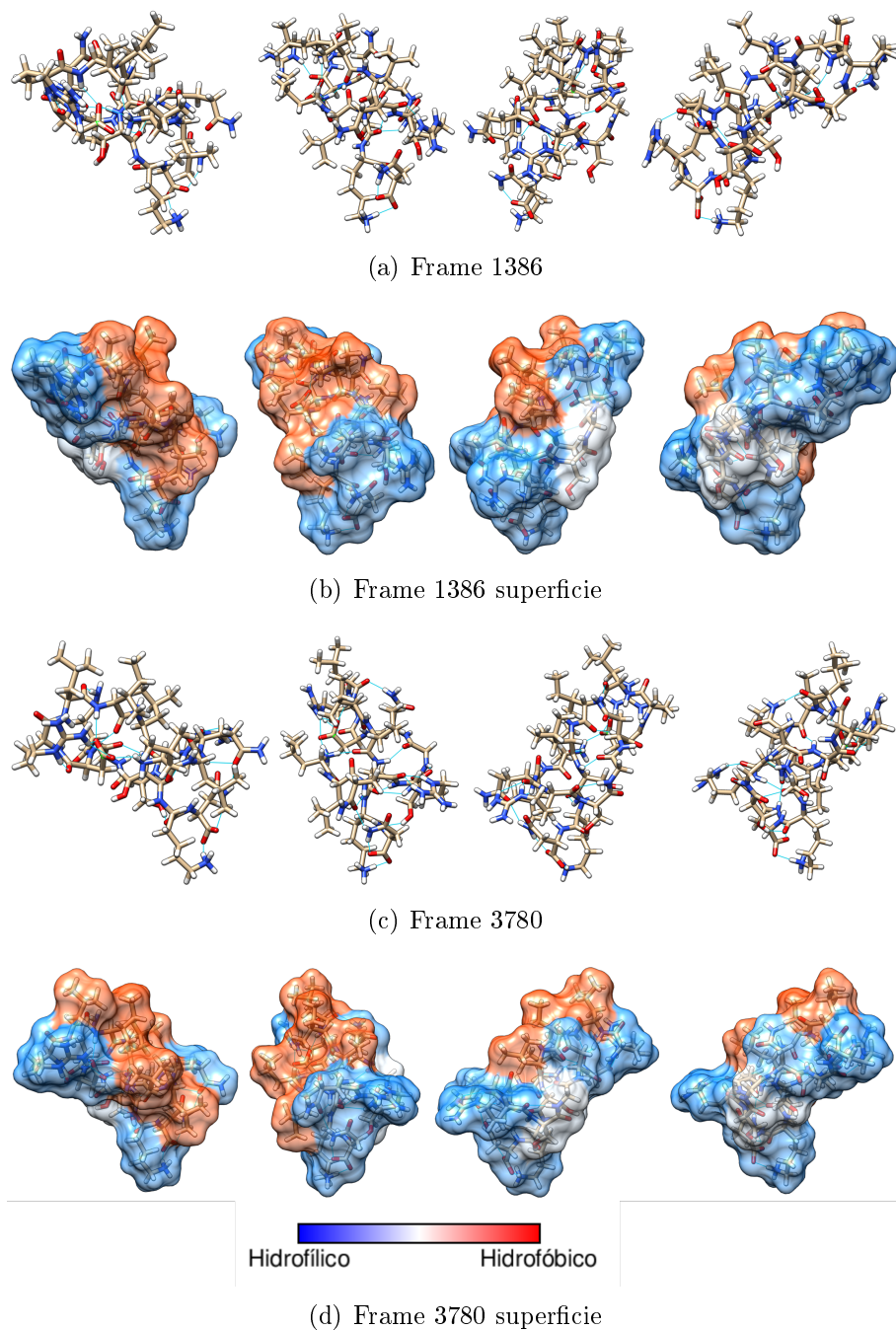


Figura 2.8: Modelo LP2-m2-1 después de dinámica molecular. (a) y (b) muestran el cuadro o frame 1386 de la dinámica molecular junto con la hidrofobicidad de la superficie. (c) y (d) muestran el cuadro o frame 3780 de la dinámica molecular junto con la hidrofobicidad de la superficie.

Tabla 2.5: Interacciones por puentes de hidrógeno encontradas en modelo LP2-m2-1. En amarillo se encuentra destacada la interacción donde se debería formar el enlace del ciclo, en celeste se destacan los átomos que forman parte del esqueleto de carbono, en blanco los que se encuentran en las cadenas laterales y en rojo los que forman posibles puentes salinos.

Frame 1386					Frame 3780				
Dador (D)	Aceptor (A)	Hidrógeno	Distancia D..A (Å)	Distancia D-H..A (Å)	Dador (D)	Aceptor (A)	Hidrógeno	Distancia D..A (Å)	Distancia D-H..A (Å)
LEU 1 N	ASP 8 OD2	LEU 1 H3	2.916	2.152	LEU 1 N	ASP 8 OD1	LEU 1 H2	2.687	1.857
LEU 1 N	ILE 11 O	LEU 1 H2	2.708	1.778	LEU 1 N	LEU 12 O	LEU 1 H1	3.006	2.105
ARG 4 N	SER 13 O	ARG 4 H	2.747	1.958	GLN 3 N	GLN 3 OE1	GLN 3 H	2.961	2.235
ARG 4 NH2	GLN 3 O	ARG 4 HH22	2.822	1.935	ARG 4 N	SER 13 O	ARG 4 H	3.162	2.167
SER 5 N	SER 13 O	SER 5 H	2.990	2.259	ARG 4 NE	GLN 3 O	ARG 4 HE	2.680	1.700
ARG 9 NE	ASP 8 O	ARG 9 HE	2.736	1.820	ARG 4 NH2	GLN 3 O	ARG 4 HH22	3.297	2.539
LEU 10 N	ASP 8 OD2	LEU 10 H	3.051	2.101	SER 5 N	SER 13 O	SER 5 H	3.098	2.372
SER 13 N	GLY 6 O	SER 13 H	2.751	1.816	SER 5 OG	LYS 14 O	SER 5 HG	2.486	1.605
LYS 14 NZ	ASN 15 O	LYS 14 HZ2	2.795	1.794	GLY 6 N	ARG 4 O	GLY 6 H	2.895	1.907
ASN 15 ND2	ASN 15 OXT	ASN 15 HD21	2.919	1.958	ASN 7 ND2	LEU 10 O	ASN 7 HD22	2.880	1.903
					ASP 8 N	ILE 11 O	ASP 8 H	2.597	1.712
					ARG 9 NE	ASP 8 O	ARG 9 HE	2.790	1.873
					ARG 9 NH2	ASP 8 OD1	ARG 9 HH21	3.077	2.186
					ARG 9 NH2	ASP 8 OD2	ARG 9 HH21	2.741	1.890
					ILE 11 N	ASP 8 OD2	ILE 11 H	2.900	1.951
					SER 13 N	GLY 6 O	SER 13 H	3.070	2.193
					LYS 14 NZ	ASN 15 O	LYS 14 HZ3	2.645	1.642
					ASN 15 ND2	GLN 3 OE1	ASN 15 HD22	3.049	2.164
					ASN 15 ND2	ASN 15 OXT	ASN 15 HD21	2.887	1.906

En la Tabla 2.5 se aprecian las interacciones encontradas en cada frame del modelo LP2-m2-1, el frame 1386 tiene menos interacciones, esto puede deberse a su cercanía del comienzo de la dinámica, ya que, en un principio se relaja la estructura y al pasar la simulación se van acomodando los átomos buscando disminuir la energía creando relaciones con otros (Chen et al., 2009; Karplus and McCammon, 2002), las interacciones creadas en este caso son mayoritariamente en el esqueleto de carbono. El frame 3780 posee más vínculos dentro de su estructura, siendo predominantes también las formadas con el esqueleto de carbono, una singularidad de este cuadro es que muestra un posible puente salino entre arginina 9 (R9) y ácido aspártico 8 (D8), esta interacción puede ser contraproducente con la formación del enlace del ciclo entre L1 y D8 (relación destacada en amarillo en la tabla), en el caso de formarse el lazo, este puente salino no sería posible porque D8 es el único aminoácido de la estructura con carga negativa.

La distancia entre L1 y D8 es de 2,916 y 2,687 (Å) para los frame 1386 y 3780 respectivamente, quiere decir que su distancia es muy larga aún para formar el enlace (ver Tabla G.9 donde se encuentran las distancias de este enlace en los templados utilizados). Ambas estructuras necesitan mas ajustes para que cumplan con la configuración del anillo y del enlace deseada.

Siguiendo ahora con el modelo LP2-m5-2 (Figura 2.9), se puede observar que su configuración espacial es diferente que el modelo anterior, sus zonas hidrofílicas e hidrofóbicas están conformadas por los mismos aminoácidos que el modelo LP2-m2-1 y el área hidrofílica se encuentra mas compactada.

La Tabla 2.6 presenta las interacciones encontradas en el modelo LP2-m5-2, el frame 3381 es el que tiene mas conexiones entre sus residuos, destacando varios puentes de hidrógeno entre cadenas laterales, el frame 4534 posee menos puentes de hidrógeno.

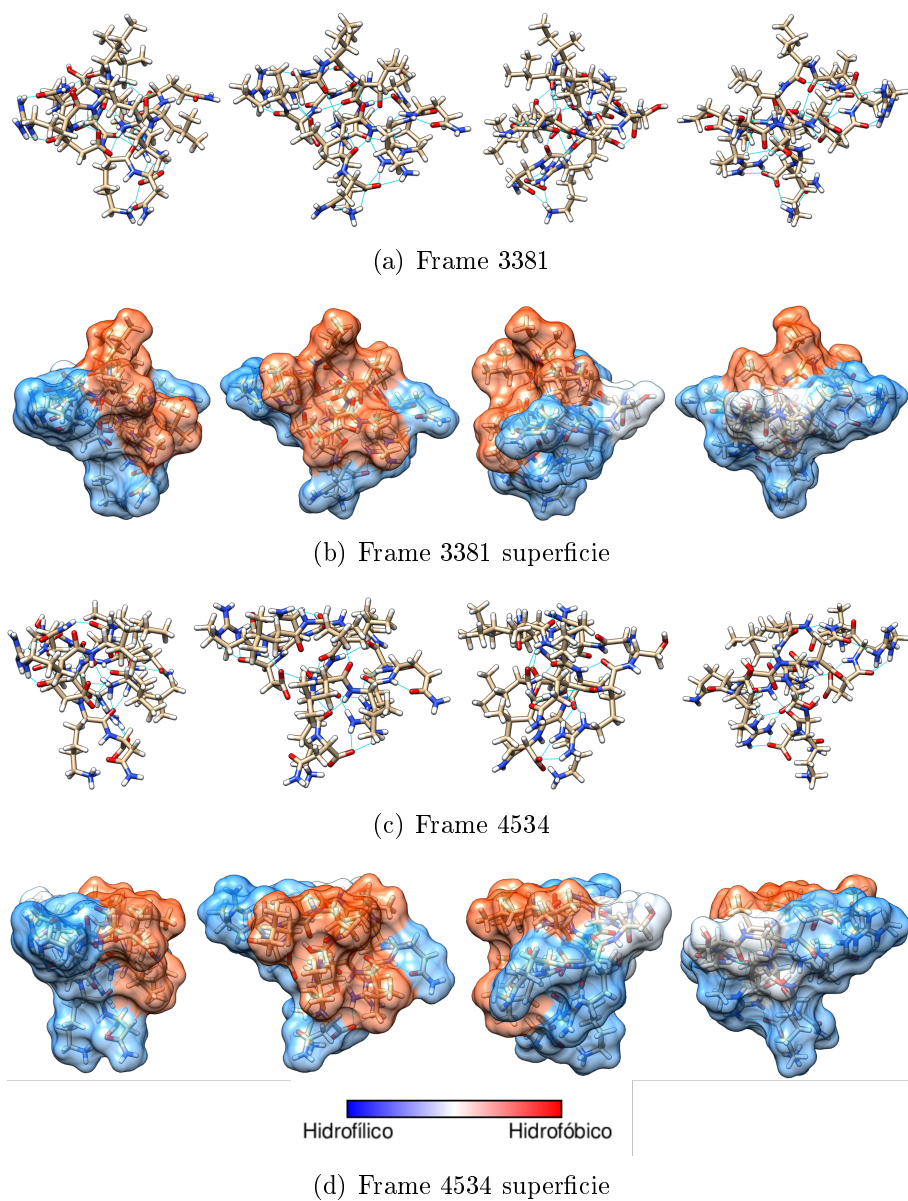


Figura 2.9: Modelo LP1-m6 después de dinámica molecular. **(a)** y **(b)** muestran el cuadro o frame 3381 de la dinámica molecular junto con la hidrofobicidad de la superficie. **(c)** y **(d)** muestran el cuadro o frame 4534 de la dinámica molecular junto con la hidrofobicidad de la superficie.

Tabla 2.6: Interacciones por puentes de hidrógeno encontradas en modelo LP2-m5-2. En amarillo se encuentra destacada la interacción donde se debería formar el enlace del ciclo, en celeste se destacan los átomos que forman parte del esqueleto de carbono y en blanco los que se encuentran en las cadenas laterales.

Frame 3381					Frame 4534				
Dador (D)	Aceptor (A)	Hidrógeno	Distancia D..A (Å)	Distancia D-H..A (Å)	Dador (D)	Aceptor (A)	Hidrógeno	Distancia D..A (Å)	Distancia D-H..A (Å)
LEU 1 N	ASP 8 OD2	LEU 1 H1	2.660	1.720	LEU 1 N	ASP 8 OD1	LEU 1 H2	2.803	1.957
LEU 1 N	LEU 10 O	LEU 1 H2	3.049	2.224	LEU 1 N	LEU 12 O	LEU 1 H3	2.630	1.677
LEU 1 N	LEU 12 O	LEU 1 H2	2.787	2.038	LEU 1 N	LYS 14 O	LEU 1 H1	3.068	2.219
LEU 1 N	LYS 14 O	LEU 1 H3	2.852	1.994	LEU 2 N	LYS 14 O	LEU 2 H	2.808	1.813
LEU 2 N	LYS 14 O	LEU 2 H	2.812	1.882	GLN 3 N	GLN 3 OE1	GLN 3 H	2.723	1.795
GLN 3 N	GLN 3 OE1	GLN 3 H	2.973	2.129	ARG 4 N	LEU 2 O	ARG 4 H	2.832	1.868
ARG 4 N	LEU 2 O	ARG 4 H	2.737	1.909	ARG 4 NE	LEU 2 O	ARG 4 HE	3.256	2.565
ARG 4 NE	LEU 2 O	ARG 4 HE	3.172	2.498	ARG 4 NE	SER 13 O	ARG 4 HE	2.774	1.983
ARG 4 NE	SER 13 O	ARG 4 HE	3.402	2.549	ARG 4 NH1	ASN 15 OXT	ARG 4 HH12	3.251	2.448
ARG 4 NH1	ASN 15 OXT	ARG 4 HH12	3.006	2.213	ARG 4 NH2	SER 13 O	ARG 4 HH22	2.669	1.726
ARG 4 NH2	SER 13 O	ARG 4 HH22	2.892	1.936	ARG 4 NH2	ASN 15 OXT	ARG 4 HH21	2.756	1.834
ARG 4 NH2	ASN 15 O	ARG 4 HH21	2.917	2.200	ASN 7 ND2	ILE 11 O	ASN 7 HD21	3.269	2.406
ARG 4 NH2	ASN 15 OXT	ARG 4 HH21	2.663	1.726	ARG 9 N	ASP 8 OD1	ARG 9 H	2.737	1.865
ASN 7 ND2	ILE 11 O	ASN 7 HD21	2.932	1.952	ARG 9 NE	ASP 8 O	ARG 9 HE	2.819	2.044
ASP 8 N	LEU 12 O	ASP 8 H	3.413	2.495	ARG 9 NH2	ASN 7 OD1	ARG 9 HH21	2.808	1.978
ARG 9 N	ASP 8 OD1	ARG 9 H	2.620	1.798	ARG 9 NH2	ASP 8 O	ARG 9 HH22	2.675	1.798
ARG 9 NE	ASP 8 O	ARG 9 HE	2.857	2.094	LEU 12 N	LEU 1 O	LEU 12 H	2.793	2.062
ARG 9 NH1	ASN 7 OD1	ARG 9 HH11	2.928	2.159	SER 13 N	ARG 4 O	SER 13 H	3.621	2.583
ARG 9 NH2	ASP 8 O	ARG 9 HH22	2.610	1.859					
LEU 10 N	ASP 8 OD1	LEU 10 H	3.174	2.292					
LEU 12 N	LEU 1 O	LEU 12 H	3.388	2.566					
SER 13 N	ARG 4 O	SER 13 H	3.083	2.079					
SER 13 OG	SER 5 O	SER 13 HG	2.959	2.234					
LYS 14 NZ	ASN 15 O	LYS 14 HZ3	2.866	2.090					
LYS 14 NZ	ASN 15 OD1	LYS 14 HZ1	2.792	1.802					

Particularmente los residuos que forman el enlace del ciclo tienen distancias de 2,66 y 2,803 (Å) para los fram 3381 y 4534 respectivamente, estas distancia son menores que las del modelo LP2-m2-1 pero aún no es la óptima (ver Tabla G.9 donde se encuentran las distancias de este enlace en los templado utilizados).

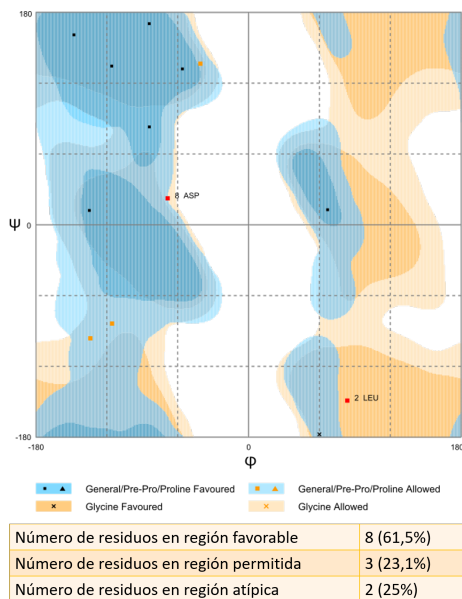
Analizando los modelos hasta este punto, el mas cercano a la estructura deseada es el LP2-m5-2 frame 3381, porque satisface la mayoría de los puentes de hidrógeno internos que podría tener la molécula y la distancia de los residuos que forman el enlace es la mas baja, pero aún hay que acercar estos aminoácidos para que se favorezca el enlace.

2.6.1. Análisis de los ángulos de los residuos para modelos de LP2 a través del gráfico de Ramachandran

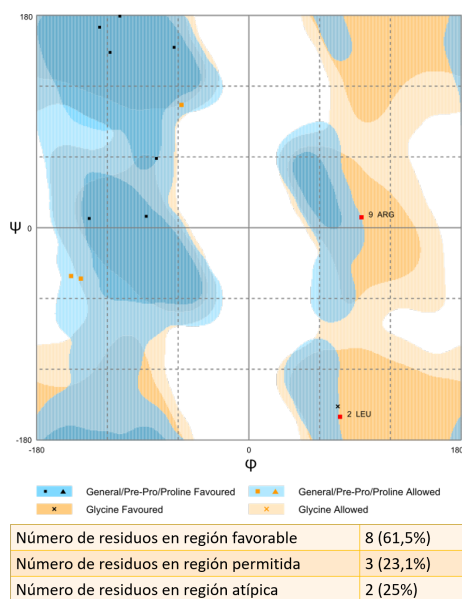
La Figura 2.10 muestra los gráficos de Ramanchandran de los modelos LP2. La mayoría de los residuos de la molécula en los modelos están dentro de las regiones favorables y permitidas.

Estudiando por separado cada modelo, se puede observar LP2-m2-1 tiene dos residuos en su zona atípica en ambos cuadros, en el frame 1386 están el ácido aspártico 8 (D8) que puede ser problemático al realizar el enlace del ciclo y la leucina 2 (L2) la cual puede estar interactuando hidrofobicamente con los demás residuos hidrofóbicos formándose así una configuración atípica. El frame 3780 tiene la misma leucina en zona atípica y la arginina 9

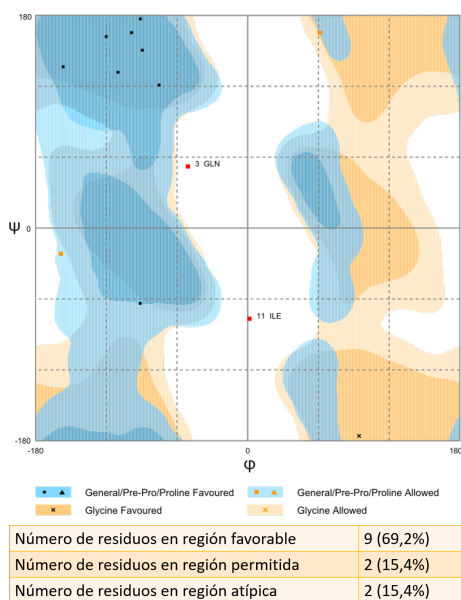
(R9) cuya cadena lateral tiene cercanía con D8 tratando de formar un puente salino, esta relación encontrada en la dinámica puede ser poco favorable en la configuración espacial de R9.



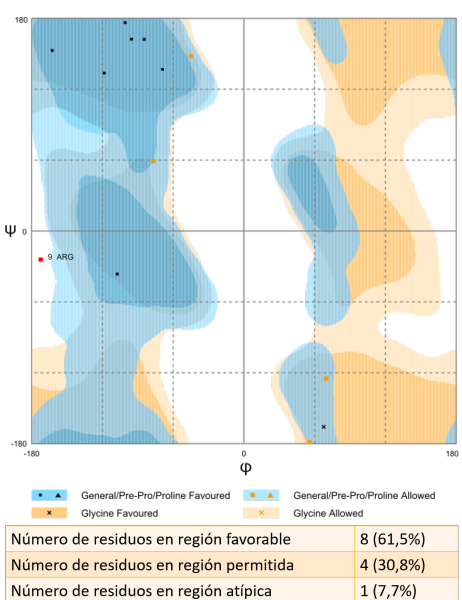
(a) Modelo LP2-m2-1 frame 1386



(b) Modelo LP2-m2-1 frame 3780



(c) Modelo LP2-m5-2 frame 3381



(d) Modelo LP2-m5-2 frame 4534

Figura 2.10: Gráfico de Ramachandran para modelos de LP2 (Lovell et al., 2002). Los puntos marcados en rojo son aquellos residuos que se encuentran en las zonas atípicas del gráfico.

El frame 3381 de LP2-m5-2 es el que presenta mayor cantidad de interacciones entre sus residuos, en el gráfico se muestran dos de ellos en regiones atípicas, glutamina 3 (Q3) e isoleucina 11 (I11), I11 puede estar formando una configuración atípica por los mismos

motivos que la leucina anteriormente y Q3 podría ser acomodado para que cumpla con el gráfico.

Por último el frame 4534 de LP2-m5-2 solo presenta un aminoácido en zona atípica, arginina 9 este residuo se encuentra espacialmente fuera del alcance de otras cadenas laterales afines, por esto puede que fuerce puentes de hidrógeno con el esqueleto de carbono teniendo que adoptar alguna configuración atípica.

2.7. Diseño y análisis de modelo *in silico* LP3

La estructura 2D predicha por PRISM para LP3 se muestra en la Figura 2.11, en este caso el enlace del anillo se forma con G1 y D7, se destaca además el largo de este lazo, 13 aminoácidos, dentro de las estructuras presentes en la Tabla G.2 no se encuentra ninguno de ese largo, el mas corto tiene 14 aminoácidos.

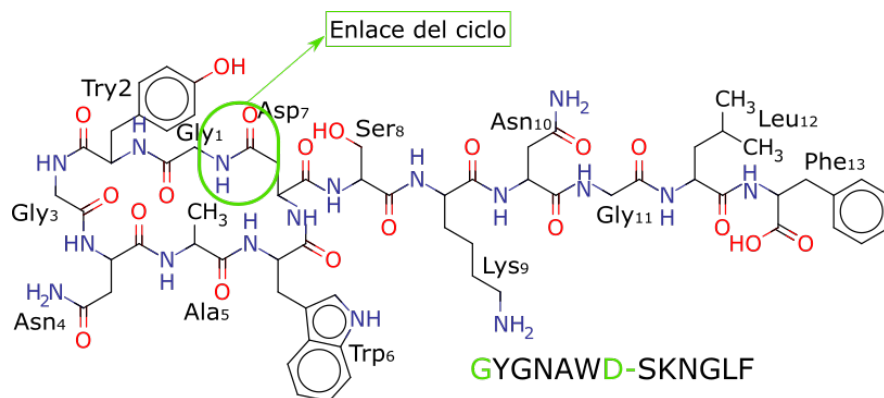


Figura 2.11: Predicción 2D de LP3 realizada por PRISM. Se muestra destacado en verde el enlace que forma el ciclo entre G1 y D7.

Según la configuración aminoacídica de LP3 se seleccionaron los templados presentes en la Tabla 2.7 para construir su modelo, se tuvo en cuenta que dentro de los residuos que están después de D7 solo el último es aromático, por otra parte analizando los lazo péptidos pequeños conocidos se encontró que los aminoácidos que atraviesan el anillo son pequeño, en LP3 los mas pequeños son N10 y G11, suponiendo entonces que estos deberían ser los que están en esa posición.

Tabla 2.7: Tabla comparativa de templados seleccionados para modelar LP3

PDB: Nombre	2mfv: Xanthomonin II	4nag: Xanthomonin I
Organismo	<i>Xanthomonas gardneri</i>	<i>Xanthomonas gardneri</i>
Referencia	Hegemann2014a	Hegemann2014a
Secuencia	GGPLAGE-EMG-GITT	GGPLAGE-EIG-GFNVPG
Clase	II	II
Largo	14	16
N° aa ciclo	7	7
N° aa asa	3	3
aa antes del ciclo	G10 (puentes de hidrógeno con G1, G2)	G10 (puentes de hidrógeno con G2, E7)
aa después del ciclo	G11	G11 (puentes de hidrógeno con L4)
Método	NMR	Difracción de rayos X
Características estructura	Residuos pequeños atraviesan el ciclo, ciclo uniforme, molécula pequeña, compacta pero con pocos puentes de hidrógeno	Ciclo uniforme, estructura compacta por puentes de hidrógeno, residuos que atraviesan el ciclo pequeños
Actividad	Sin actividad antimicrobiana, sin información de otra actividad	Sin actividad antimicrobiana, sin información de otra actividad

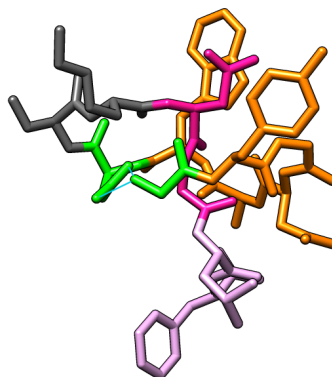


Figura 2.12: Modelo preliminar de LP3, construido con los templados 2mfv y 4nag. Se encuentra coloreados en **verde** los residuos que forman el enlace (G1 y D7), en **naranja** los residuos del ciclo, en **rosado** los residuos que se encuentran antes y después del ciclo (E12 y C14), en **gris** los residuos del asa y en **morado claro** los residuos de la cola. Asimismo en **celeste** se pueden ver líneas que representan posibles puentes de hidrógeno que estabilizan la estructura.

Uno de los 25 modelos creados, se presenta en la Figura 2.12, notando el cumplimiento de los requerimientos para esta molécula, donde glicina 11 se encuentra justo atravesando el ciclo, esto es posible debido al tamaño de este aminoácido, entonces sobre el ciclo estaría asparagina 10 (N10) y bajo el leucina 12 (L12), este tipo de arreglo se puede observar en los lazo péptidos pequeños, principalmente en los mostrados en la Tabla 2.7. Ahora solo hace falta ajustar la molécula a través de dinámica molecular.

Fueron escogidos dos modelos de LP3, los cuales se sometieron a dinámica molecular obteniendo 5000 cuadros de cada uno, desde donde se seleccionaron dos de cada modelo para ser analizados. Los criterios de selección fueron: encontrar la mínima distancia entre los átomos que forman el ciclo y lograr satisfacer la mayor parte de los puentes de hidrógeno internos de la molécula.

En el modelo LP3-m1-4 mostrado en la Figura 2.13, se puede apreciar la configuración espacial de los residuos, la región hidrofóbica (roja) esta conformada por alanina 5 (A5), leucina 12 (L12) y fenilalanina 13 (F13), el sector hidrofílico presenta algunos residuos catalogados hidrofóbicos, como triptófano o tirosina, pero sus cargas están equiparadas haciendo que sean neutros y estén de color blanco en la figura (Finkelstein and Ptitsyn, 2016; Matthews and Acids, 2001). Así existen dos zonas claramente marcadas, una hidrofílica (azul) y otra hidrofóbica (roja).

Analizando las interacciones del modelo LP3-m1-4 que se presentan en la Tabla 2.8 se puede observar que tiene varias conexiones con el esqueleto de carbono y muy pocas solo entre cadenas laterales, además ninguno de los casos presenta algún puente salino. Se puede apreciar en color amarillo la interacción entre los átomos que deberían formar el enlace del ciclo, siendo su distancia muy grande, 2,789 y 2,668 (Å) para el frame 2670 y 3877 respectivamente, estos valores están fuera del promedio comparado con otros lazo péptidos

(ver Tabla G.9 donde se encuentran las distancias de este enlace en los templados utilizados).

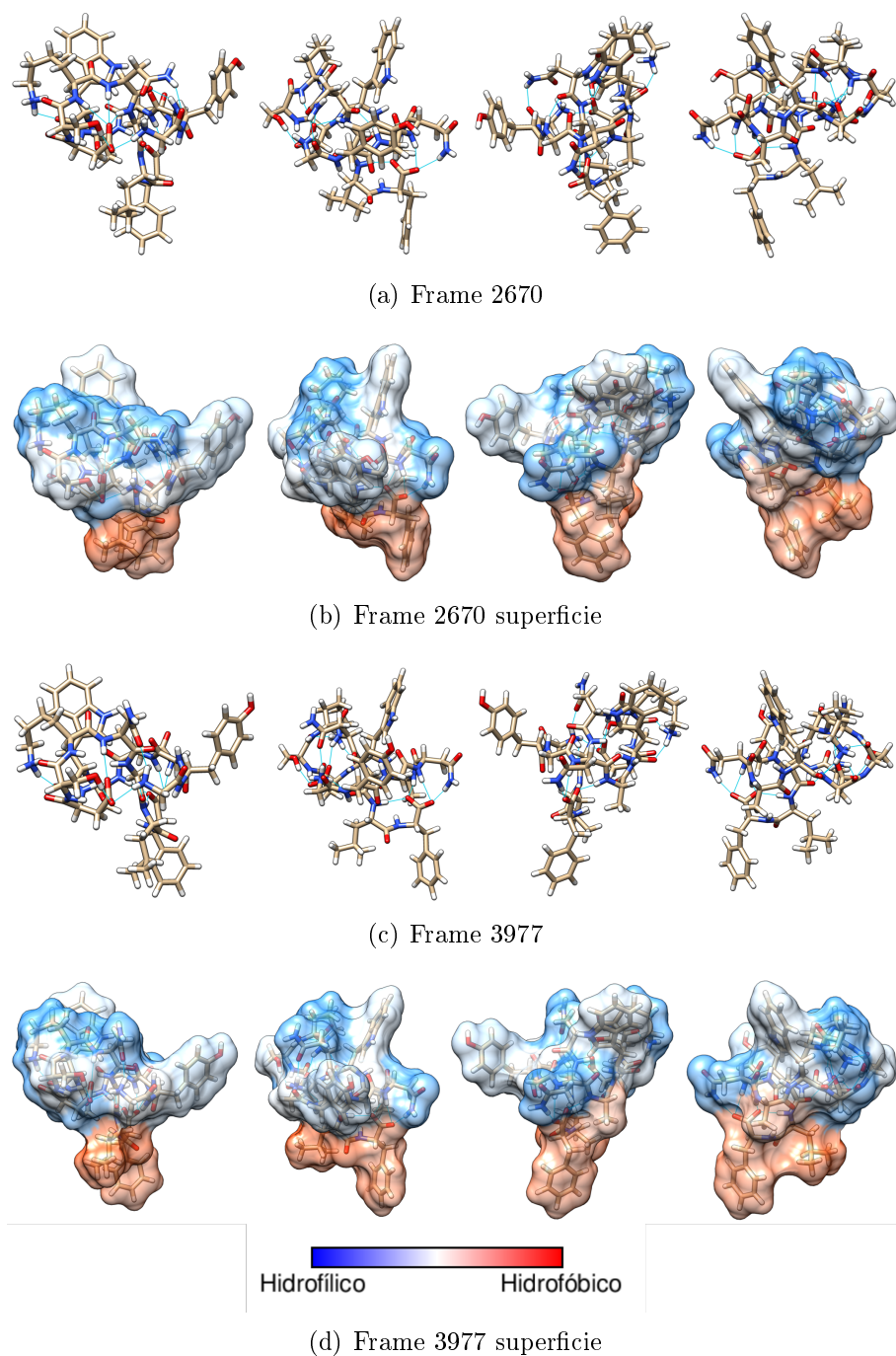


Figura 2.13: Modelo LP3-m1-4 después de dinámica molecular. (a) y (b) muestran el cuadro o frame 2670 de la dinámica molecular junto con la hidrofobicidad de la superficie. (c) y (d) muestran el cuadro o frame 3977 de la dinámica molecular junto con la hidrofobicidad de la superficie.

Tabla 2.8: Interacciones por puentes de hidrógeno encontradas en modelo LP3-m1-4. En amarillo se encuentra destacada la interacción donde se debería formar el enlace del ciclo, en celeste se destacan los átomos que forman parte del esqueleto de carbono y en blanco los que se encuentran en las cadenas laterales.

Frame 2670					Frame 3877				
Dador (D)	Aceptor (A)	Hidrógeno	Distancia D..A (Å)	Distancia D-H..A (Å)	Dador (D)	Aceptor (A)	Hidrógeno	Distancia D..A (Å)	Distancia D-H..A (Å)
GLY 1 N	ASP 7 OD2	GLY 1 H1	2.789	1.802	GLY 1 N	ASP 7 OD2	GLY 1 H3	2.668	1.957
GLY 3 N	ASN 10 O	GLY 3 H	3.053	2.162	GLY 1 N	ASN 10 OD1	GLY 1 H2	2.718	1.776
ASN 4 N	PHE 13 O	ASN 4 H	2.885	1.938	GLY 1 N	GLY 11 O	GLY 1 H1	2.913	2.021
ASN 4 ND2	PHE 13 O	ASN 4 HD22	3.002	2.088	ASN 4 N	PHE 13 O	ASN 4 H	3.119	2.087
ALA 5 N	PHE 13 OXT	ALA 5 H	2.928	1.935	ASN 4 ND2	PHE 13 O	ASN 4 HD22	2.645	1.655
SER 8 OG	ASP 7 OD2	SER 8 HG	2.645	1.672	ALA 5 N	PHE 13 OXT	ALA 5 H	2.752	1.796
LYS 9 N	ASP 7 OD1	LYS 9 H	3.249	2.272	SER 8 OG	ASP 7 OD2	SER 8 HG	2.632	1.693
LYS 9 NZ	TRP 6 O	LYS 9 HZ1	2.963	2.303	LYS 9 NZ	TRP 6 O	LYS 9 HZ3	2.830	1.846
ASN 10 N	ASP 7 OD1	ASN 10 H	2.998	2.073	LYS 9 NZ	SER 8 O	LYS 9 HZ2	2.752	1.907
ASN 10 ND2	GLY 1 O	ASN 10 HD21	2.709	1.965	ASN 10 N	ASP 7 OD1	ASN 10 H	2.857	1.982
GLY 11 N	ASP 7 OD1	GLY 11 H	3.019	2.124	LEU 12 N	PHE 13 OXT	LEU 12 H	2.925	1.893
LEU 12 N	PHE 13 OXT	LEU 12 H	2.712	1.736					

Siguiendo con el modelo LP3-m3-2 mostrado en la Figura 2.14 se puede apreciar una mayor compactación de su estructura, en cuanto a la hidrofobicidad de su superficie se observan los mismos residuos, que el modelo anterior, conformando el sector hidrofóbico, en el frame 4805 se ve una cercanía mayor entre los residuos hidrofóbicos.

En la Tabla 2.14 muestra las interacciones encontradas en el modelo LP3-m3-2, la mayor parte de estas relaciones son en el esqueleto de carbono y algunas cadenas laterales, en este modelo se encontraron más puentes de hidrógeno que en LP3-m1-4. Una particularidad es la posible presencia de un puente salino dentro de la estructura entre lisina 9 (K9) y ácido aspártico 7 (D7), pero este vínculo no podría darse al crearse el enlace del ciclo entre G1 y D7.

Los residuos G1 y D7 aún tienen una distancia mayor al promedio (ver Tabla G.9), de 2,633 y 2,509 (Å) para el frame 1540 y 4805 respectivamente, a pesar de esto, las distancias son menores que en el modelo LP3-m1-4.

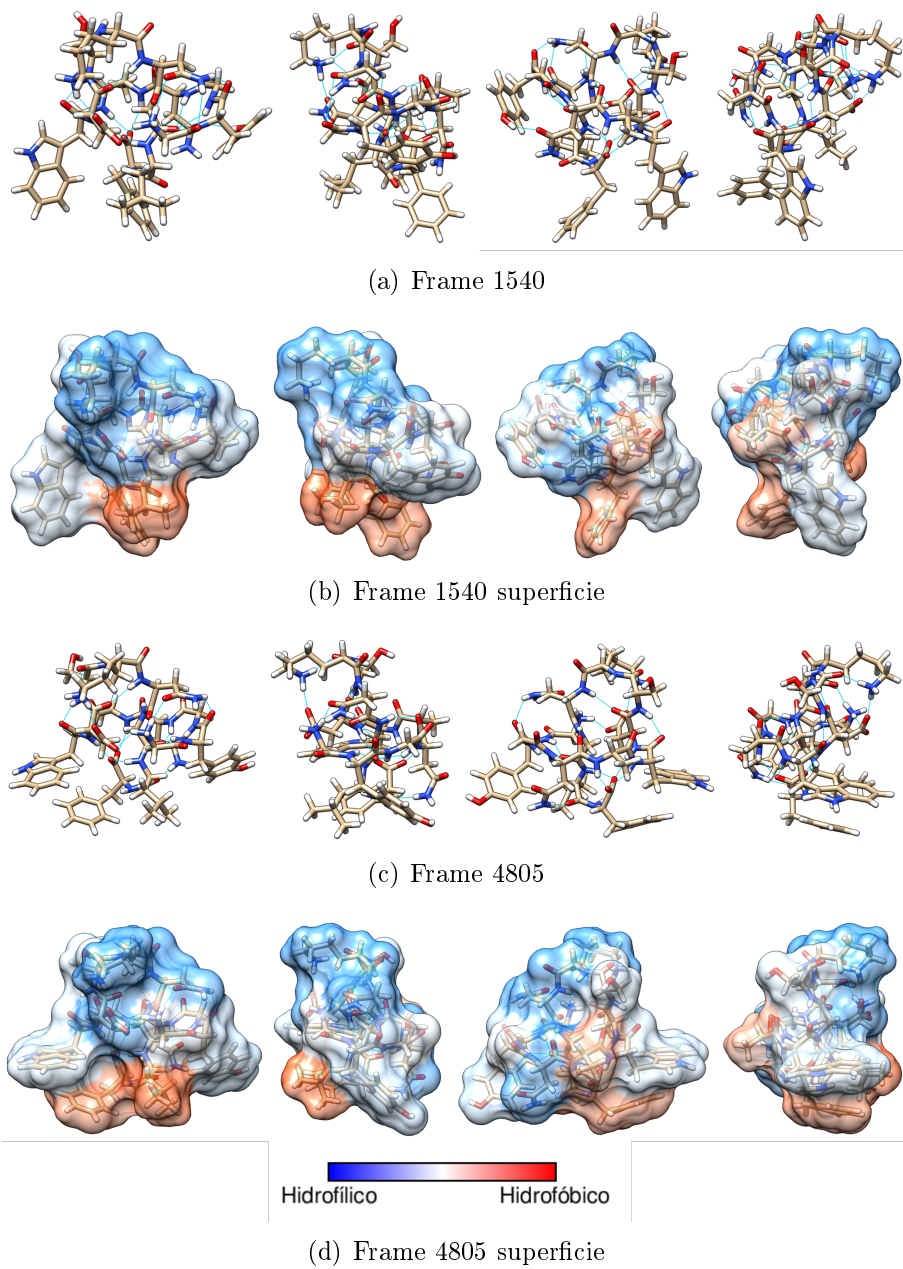


Figura 2.14: Modelo LP3-m3-2 después de dinámica molecular. **(a)** y **(b)** muestran el cuadro o frame 1540 de la dinámica molecular junto con la hidrofobicidad de la superficie. **(c)** y **(d)** muestran el cuadro o frame 4805 de la dinámica molecular junto con la hidrofobicidad de la superficie.

Tabla 2.9: Interacciones por puentes de hidrógeno encontradas en modelo LP3-m3-2. En amarillo se encuentra destacada la interacción donde se debería formar el enlace del ciclo, en celeste se destacan los átomos que forman parte del esqueleto de carbono, en blanco los que se encuentran en las cadenas laterales y en rojo los que forman posibles puentes salinos.

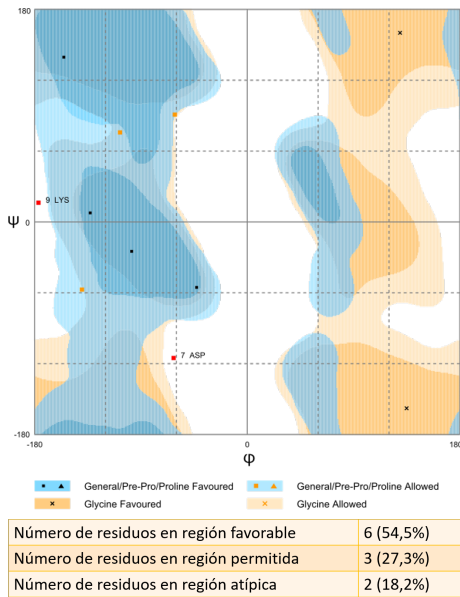
Frame 1540					Frame 4805				
Dador (D)	Aceptor (A)	Hidrógeno	Distancia D..A (Å)	Distancia D-H..A (Å)	Dador (D)	Aceptor (A)	Hidrógeno	Distancia D..A (Å)	Distancia D-H..A (Å)
GLY 1 N	ASP 7 OD1	GLY 1 H3	2.633	1.727	GLY 1 N	ASP 7 OD1	GLY 1 H2	2.509	1.763
GLY 1 N	ASN 10 OD1	GLY 1 H2	3.079	2.157	GLY 1 N	ASN 10 OD1	GLY 1 H1	2.839	1.856
TYR 2 N	GLY 11 O	TYR 2 H	2.887	1.924	TYR 2 N	GLY 11 O	TYR 2 H	2.845	1.880
TYR 2 OH	ASN 4 OD1	TYR 2 HH	2.718	1.866	GLY 3 N	GLY 11 O	GLY 3 H	2.782	1.905
GLY 3 N	GLY 11 O	GLY 3 H	3.072	2.242	ASN 4 N	GLY 11 O	ASN 4 H	2.937	2.057
ASN 4 N	GLY 11 O	ASN 4 H	3.508	2.494	ASN 4 ND2	LEU 12 O	ASN 4 HD22	2.933	1.932
ALA 5 N	PHE 13 O	ALA 5 H	2.993	2.136	ALA 5 N	PHE 13 O	ALA 5 H	2.780	2.017
TRP 6 N	PHE 13 O	TRP 6 H	2.872	1.857	TRP 6 N	PHE 13 O	TRP 6 H	2.842	1.887
ASP 7 N	PHE 13 OXT	ASP 7 H	2.886	1.877	ASP 7 N	PHE 13 OXT	ASP 7 H	2.907	1.948
SER 8 N	TRP 6 O	SER 8 H	2.739	1.894	SER 8 N	TRP 6 O	SER 8 H	2.803	1.852
LYS 9 NZ	ASP 7 O	LYS 9 HZ2	3.481	2.734	LYS 9 NZ	ASP 7 OD2	LYS 9 HZ2	2.638	1.678
LYS 9 NZ	ASP 7 OD2	LYS 9 HZ3	2.841	1.877	LYS 9 NZ	SER 8 O	LYS 9 HZ1	2.866	1.911
LYS 9 NZ	SER 8 O	LYS 9 HZ2	2.648	1.795	ASN 10 N	ASP 7 O	ASN 10 H	3.000	2.017
ASN 10 N	ASP 7 O	ASN 10 H	2.790	1.860	ASN 10 ND2	TYR 2 O	ASN 10 HD21	3.111	2.288
ASN 10 ND2	GLY 1 O	ASN 10 HD22	3.103	2.301	GLY 11 N	ASN 4 O	GLY 11 H	2.919	1.996
ASN 10 ND2	TYR 2 O	ASN 10 HD21	2.889	1.927	LEU 12 N	PHE 13 OXT	LEU 12 H	2.725	1.832
GLY 11 N	ASN 4 O	GLY 11 H	2.804	1.823					
LEU 12 N	PHE 13 OXT	LEU 12 H	2.641	1.719					

2.7.1. Análisis de los ángulos de los residuos para modelos de LP3 a través del gráfico de Ramachandran

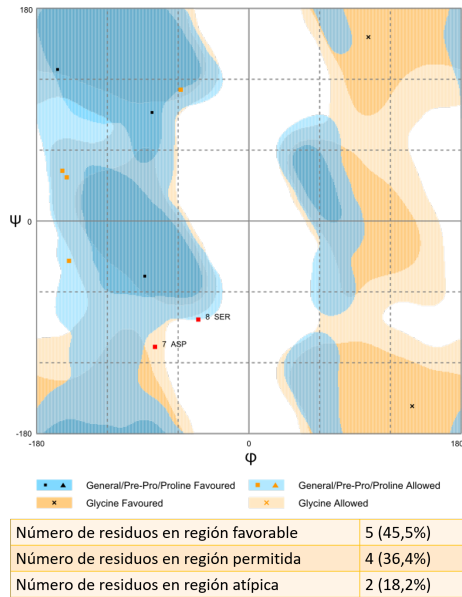
En esta sección la Figura 2.15 muestra los gráficos de Ramachandran de los modelos para LP3.

Los gráficos para LP3-m1-4 muestran la mayoría de los residuos en las regiones favorables o permitidas y solo dos en zonas atípicas, esto para cada cuadro analizado. El frame 2670 tiene la lisina 9 (K9) y al ácido aspártico 7 (D7) en zonas atípicas, K9 puede estar formando interacciones hidrofóbicas no favorables y por eso presenta esta configuración, D7 al estar forzado a formar el lazo también puede tener dificultades para estar en zonas favorables del gráfico, estas dos obstáculos pueden ser reparados realizando dinámicas moleculares cortas sobre este modelo específico y minimizando su energía.

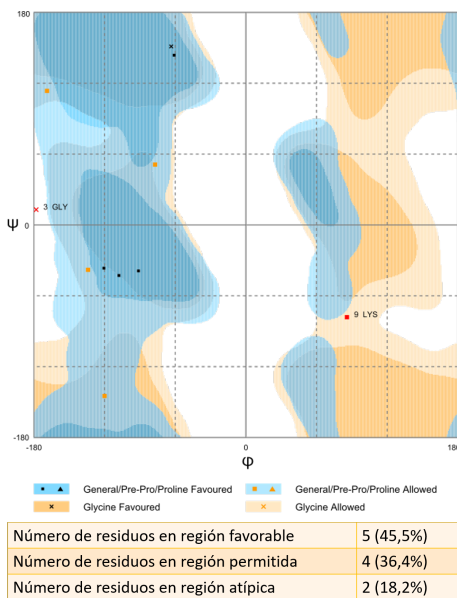
En el modelo LP3-m3-2 los gráficos muestran que la mayoría de sus residuos están dentro de las zonas favorables y permitidas. Para ambos frames se encontraron dos aminoácidos en zonas atípicas, lisina 9 (K9) y glicina 3 (G3), K9 también se encontró en región atípica para el modelo anterior y G3 tiene permitido estar en una zona atípica por no presentar impedimento estérico (Fiser et al., 2000). El cuadro 4805 es particular porque el porcentaje de residuos en regiones permitidas es mayor al porcentaje en zonas favorables, 63,6 % con respecto a un 18,2 %, esto implica que los aminoácidos no están en su mejor ángulo.



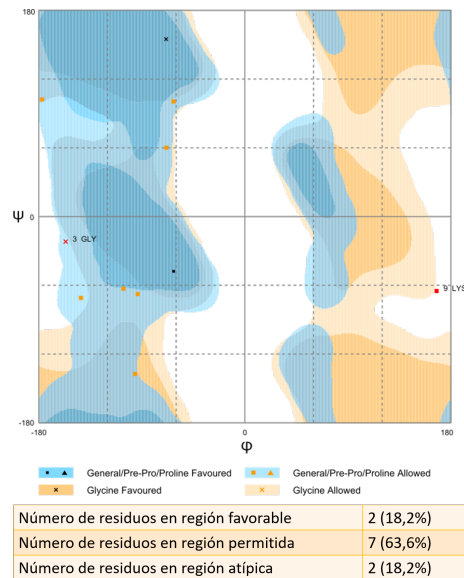
(a) Modelo LP3-m1-4 frame 2670



(b) Modelo LP3-m1-4 frame 3977



(c) Modelo LP3-m3-2 frame 1540



(d) Modelo LP3-m3-2 frame 4805

Figura 2.15: Gráfico de Ramachandran para modelos de LP3 (Lovell et al., 2002). Los puntos marcados en rojo son aquellos residuos que se encuentran en las zonas atípicas del gráfico.

2.8. Diseño y análisis de modelo *in silico* LP4

La estructura 2D presente en la Figura 2.16 señala el enlace del anillo entre G1 y D9 de LP4, el largo de esta molécula, a diferencia del lazo péptido anterior, es mucho mayor pero dentro de los largos ya encontrados en esta familia.

En el caso de los lazo péptidos largos (19 o más residuos) la cantidad de aminoácidos presentes en el asa está entre 5 y 11, siendo 5 o 6 residuos el tamaño más frecuente. Esto evidenció que los residuos antes y después del ciclo deberían ser W14, P15, W16 o Y17.

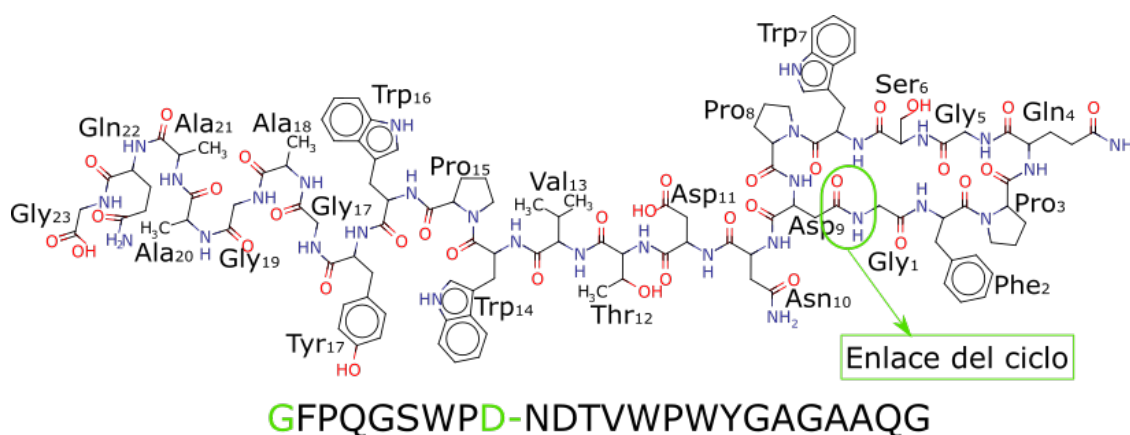


Figura 2.16: Predicción 2D de LP4 realizada por PRISM. Se muestra destacado en verde el enlace que forma el ciclo entre G1 y D9.

Así los plantados elegidos en este caso son los mostrados en la Tabla 2.10, todos fueron seleccionados por tener residuos aromáticos atravesando el ciclo, 5gvo (Sphaericin) es el que presenta mayor porcentaje de identidad con LP4, 2m8f (Astexin3) y 2n6v (Atexin3) son el mismo lazo péptido pero con organización estructural diferente por esto se probó con ambos para ver cual ayudaba a ajustar mejor la estructura del modelo.

Con el uso de los plantados se generaron 20 modelos de LP4. Observando cada uno se advierte la presencia de tres configuraciones diferentes para los aminoácidos que están justo antes y después del ciclo, la Figura 2.17.i expone el modelo LP4-m4-1, los residuos que atraviesan el ciclo en este caso son triptófano 14 (W14), prolina 15 (P15) que está justo en el medio del ciclo y triptófano 16 (W16) después, la segunda configuración se encuentra en la Figura 2.17.ii mostrada por el modelo LP4-m6-5 donde W14 está antes del ciclo y P15 después, la última distribución se puede ver en la Figura 2.17.iii modelo LP4-m7-3 en la cual P15 está sobre el anillo y W16 bajo este.

La siguiente etapa es refinar estos modelos a través de dinámicas moleculares, con esto se podrá verificar si las configuraciones antes encontradas se mantienen o alguna muta por la disminución de energía y el encaje de los residuos.

Tabla 2.10: Tabla comparativa de planteados seleccionados para modelar LP4

PDB: Nombre	5gvo: Sphaericin	2m8f: Astexin3
Organismo	Planomonospora sphaerica	Asticcacaulis excentricus
Referencia	(Kodani et al., 2017)	(Maksimov and Link, 2013)
Secuencia	GLPIGWIE-RPSGW-YFPI	GPTPMVGLD-SVSGQY-WDQHAPLAD
Clase	II	II
Largo	18	24
N° aa ciclo	9	9
N° aa asa	5	6
aa antes del ciclo	W14 (pdeH L2)	Y15 (pdeH G1, M5)
aa después del ciclo	Y15 (pdeH W7, W6)	W16 (pdeH G1)
Método	NMR	NMR
Características estructura	W14 residuo grande aromático el ciclo tiene una bajada para que este entre bien en la estructura, compacto con puentes de hidrógeno	Y15, W16 residuos aromáticos grandes, estructura adecuada a los residuos pero con ondas suaves en el ciclo, estructura compacta con enlace del ciclo escondido por el asa
Actividad	Actividad antibacteriana específica contra <i>Micricoccus luteus</i>	Sin actividad conocida
PDB: Nombre	5jqf: Sphingopyxin I (SpI)	2n6v: Astexin3
Organismo	Sphingopyxis alaskensis	Asticcacaulis excentricus
Referencia	(Fage et al., 2016)	(Allen et al., 2016; Maksimov et al., 2015)
Secuencia	GIEPLGPVD-EDQGEH-YLFAGG	GPTPMVGLD-SVSGQY-WDQHAPLAD
Clase	II	II
Largo	21	24
N° aa ciclo	9	9
N° aa asa	6	6
aa antes del ciclo	H15 (pdeH G6, E3)	Y15 (pdeH G1)
aa después del ciclo	Y16 (pdeH P7)	W16 (pdeH T3, G1, M5)
Método	Difracción de rayos X	NMR
Características estructura	Ciclo ajusta H15 (aromático grande) con una bajada amplia, asa cubre enlace del ciclo, ciclo y asa compactos	Estructura adecuada a los residuos que Y15 y W16 (aromáticos, grandes), asa y ciclo compactos con puentes de hidrógeno, cola sin compactar
Actividad	Sin actividad conocida	Sin actividad conocida

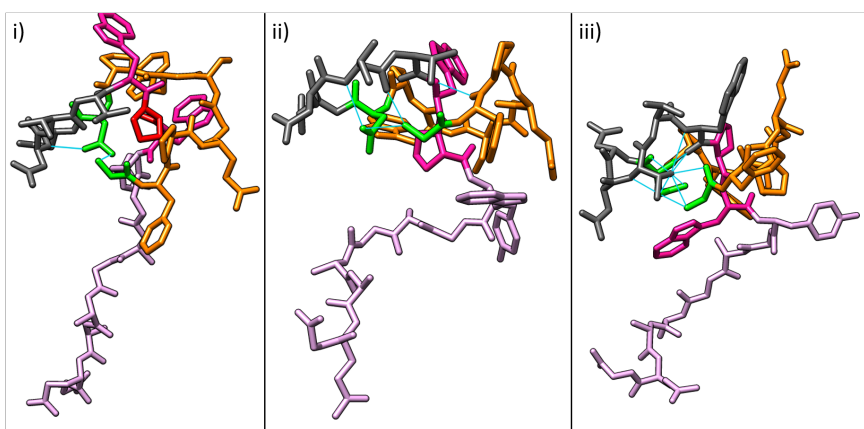


Figura 2.17: Modelo preliminar de LP4. i) Modelo LP4-m4-1 ii) Modelo LP4-m6-5 iii) Modelo LP4-m7-3, construidos con los templados 5gvo, 2n6v, 2m8f y 5jqf. Se encuentra coloreados en **verde** los residuos que forman el enlace (G1 y D9), en **naranja** los residuos del ciclo, en **rosado** los residuos que se encuentran antes y después del ciclo (son i) W14, P15 que queda justo en el medio y W16, ii) W14 y P15, iii) P15 y W16), en **gris** los residuos del asa y en **morado claro** los residuos de la cola. Asimismo en **celeste** se pueden ver líneas que representan posibles puentes de hidrógeno que estabilizan la estructura.

Representantes de la dinámica molecular de LP4-m4-1 se encuentran en la Figura 2.18. En ambos cuadros mostrados la configuración de los aminoácidos que atraviesan el ciclo se ajustó a P15 antes y W16 después.

En el frame 3831 del modelo LP4-m4-1 se logró una compactación visible de la estructura, en la zona más hidrofóbica (color rojo intenso) se encuentra la valina 13 (V13) aislada del resto de los sectores hidrofóbicos donde se localizan las alaninas 19, 21 y 22 (A19, A21 y A22) todas juntas, fenilalanina 2 (F2) mas alejada pero en el mismo sector. Las zonas más hidrofílicas se constituyen por glutamina 4 y 23 (Q4 y Q23), ácido aspártico 11 (D11) y tirosina 17 (Y17), pero los demás residuos se acercan más a la zona hidrofílica, por esto la molécula destaca por tener un anillo hidrofílico y dos zonas hidrofóbicas. Comparando el frame 4412 se pueden apreciar zonas similares de hidrofobicidad con los mismos residuos en estas y pero su compactación es un poco menor (visualmente).

Las interacciones entre residuos encontradas para los cuadros de LP4-m4-1 se muestran en la Tabla 2.11, estas relaciones son principalmente puentes de hidrógeno, no es posibles realizar un puente salino en esta molécula porque dentro de su secuencia yo existen aminoácidos cargados positivamente (como argininas, histidinas o lisinas). Los puentes de hidrógeno se forman en su mayoría por átomos presentes en el esqueleto de carbono para ambos frames.

Fueron encontradas dos posibles interacciones por puentes de hidrógeno entre los átomos que deberían formar el ciclo (G1 y D9), mostradas en la tabla en amarillo, lo que demuestra la cercanía que tienen entre ellos, estando mas cerca en el cuadro 4421.

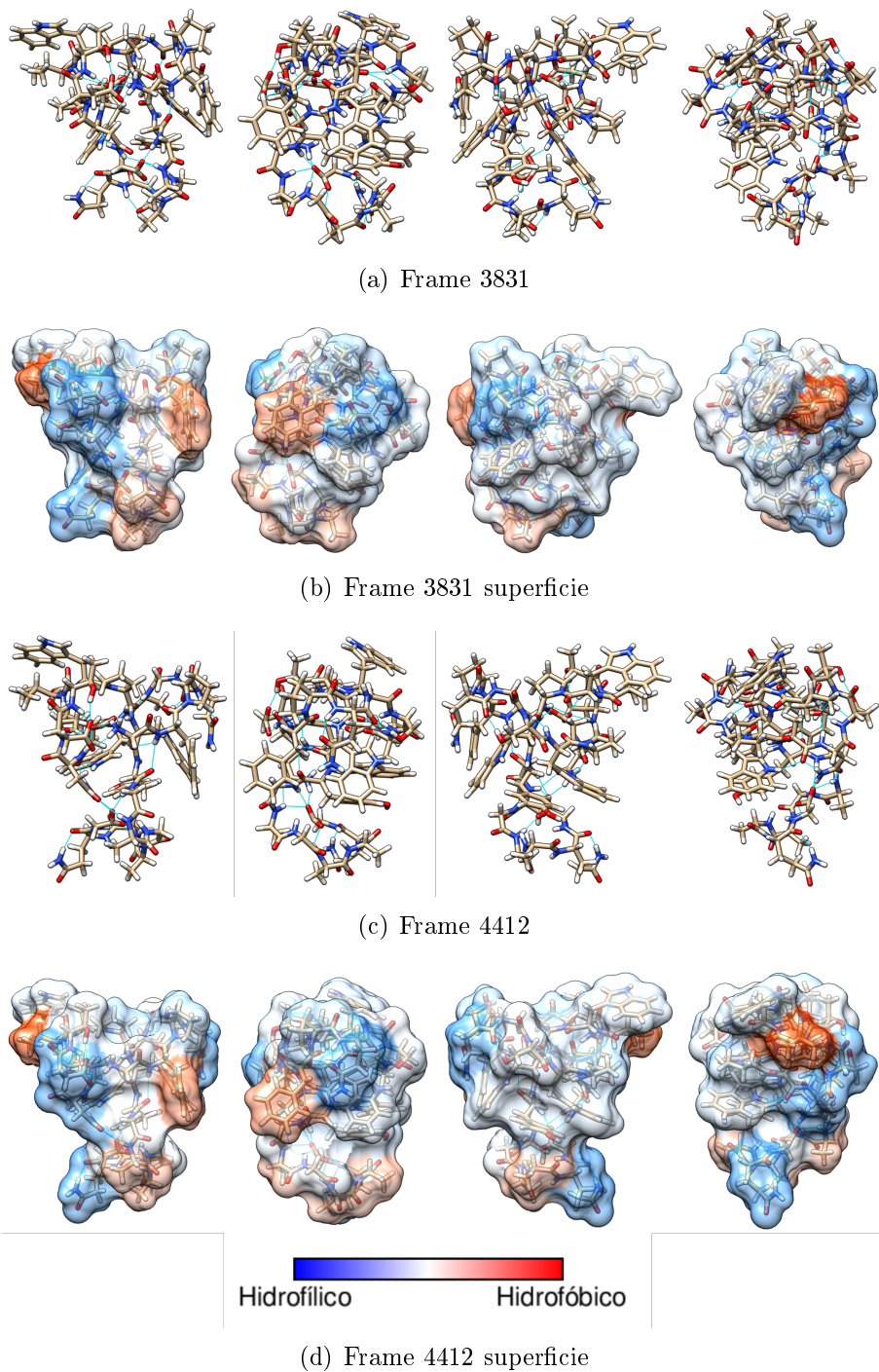


Figura 2.18: Modelo LP4-m4-1 después de dinámica molecular. **(a)** y **(b)** muestran el cuadro o frame 3831 de la dinámica molecular junto con la hidrofobicidad de la superficie. **(c)** y **(d)** muestran el cuadro o frame 4412 de la dinámica molecular junto con la hidrofobicidad de la superficie.

Tabla 2.11: Interacciones por puentes de hidrógeno encontradas en modelo LP4-m4-1. En amarillo se encuentra destacada la interacción donde se debería formar el enlace del ciclo, en celeste se destacan los átomos que forman parte del esqueleto de carbono y en blanco los que se encuentran en las cadenas laterales.

Frame 3831					Frame 4412				
Dador (D)	Aceptor (A)	Hidrógeno	Distancia D..A (Å)	Distancia D-H..A (Å)	Dador (D)	Aceptor (A)	Hidrógeno	Distancia D..A (Å)	Distancia D-H..A (Å)
GLY 1 N	ASP 9 OD1	GLY 1 H1	2.715	1.833	GLY 1 N	ASP 9 OD1	GLY 1 H1	2.708	1.847
GLY 1 N	ASP 9 OD2	GLY 1 H1	2.753	2.035	GLY 1 N	ASP 9 OD2	GLY 1 H1	2.622	1.888
GLY 1 N	ASP 11 OD2	GLY 1 H3	2.769	1.875	GLY 1 N	ASP 11 OD2	GLY 1 H3	2.815	1.828
PHE 2 N	TYR 17 O	PHE 2 H	2.824	1.835	PHE 2 N	TRP 16 O	PHE 2 H	3.168	2.371
SER 6 N	PRO 15 O	SER 6 H	2.843	1.892	PHE 2 N	TYR 17 O	PHE 2 H	3.398	2.473
SER 6 OG	GLN 4 O	SER 6 HG	3.058	2.145	GLN 4 N	GLN 4 OE1	GLN 4 H	2.862	1.908
TRP 7 N	PRO 15 O	TRP 7 H	3.087	2.126	SER 6 N	PRO 15 O	SER 6 H	2.741	1.756
ASP 9 N	TRP 7 O	ASP 9 H	2.663	1.739	SER 6 OG	GLN 4 O	SER 6 HG	2.929	1.954
ASN 10 ND2	ASP 9 O	ASN 10 HD21	2.777	1.844	TRP 7 N	PRO 15 O	TRP 7 H	2.884	1.961
ASN 10 ND2	GLY 24 O	ASN 10 HD22	2.802	1.913	TRP 7 NE1	ASP 9 O	TRP 7 HE1	3.252	2.370
ASP 11 N	ASP 9 OD2	ASP 11 H	2.890	1.980	ASN 10 N	ASP 9 OD2	ASN 10 H	2.719	1.779
THR 12 N	ASP 9 OD2	THR 12 H	2.864	1.921	ASN 10 ND2	ASP 9 O	ASN 10 HD21	2.810	1.802
THR 12 OG1	ASP 11 OD1	THR 12 HG1	2.522	1.540	ASN 10 ND2	GLY 24 O	ASN 10 HD22	2.840	1.870
VAL 13 N	ASP 9 OD2	VAL 13 H	3.253	2.390	ASP 11 N	ASP 9 OD2	ASP 11 H	2.741	1.760
TRP 16 N	ASP 9 OD1	TRP 16 H	2.969	1.959	THR 12 N	ASP 9 OD2	THR 12 H	2.875	1.904
GLY 18 N	GLY 24 O	GLY 18 H	2.806	1.781	THR 12 OG1	ASP 11 OD1	THR 12 HG1	2.735	1.808
ALA 19 N	GLY 24 O	ALA 19 H	2.916	1.929	TRP 16 N	ASP 9 OD1	TRP 16 H	2.848	1.864
GLY 20 N	GLY 24 O	GLY 20 H	3.173	2.194	GLY 18 N	GLY 24 O	GLY 18 H	3.038	2.077
ALA 21 N	GLY 24 OXT	ALA 21 H	2.778	1.971	ALA 19 N	ASN 10 OD1	ALA 19 H	3.100	2.305
GLN 23 N	ALA 21 O	GLN 23 H	2.718	1.816	ALA 19 N	GLY 24 O	ALA 19 H	3.094	2.211
GLN 23 NE2	GLN 23 O	GLN 23 HE21	2.854	1.854	ALA 21 N	GLY 24 OXT	ALA 21 H	2.722	1.983
					GLN 23 NE2	GLN 23 O	GLN 23 HE21	2.809	1.833

Los ejemplos de la dinámica molecular del segundo modelo LP4-m6-5 se encuentran en la Figura 2.19 ambos frames seleccionados mantuvieron la configuración de los residuos antes y después del anillo (W14 antes y P15 después). En ambos casos se observa una compactación menor en la estructura, estando el frame 3669 mas compactado que 2311.

Las áreas hidrofóbicas de LP4-m6-5 (ambos frames) están conformadas por los mismos aminoácidos que LP4-m4-1, pero se ve una lejanía mayor entre ellas. Las alaninas en 2311 no están formando interacciones hidrofóbicas y la fenilalanina 2 (F2) está muy alejada de ellas, en cambio en 3669 las alaninas si forman interacción pero F2 sigue estando separada.

La mayor compactación de 3669 se reafirma con la presencia de mas interacciones entre sus residuos (mostradas en la Tabla 2.12), se encuentran relaciones con átomos del esqueleto de carbono predominantemente para ambos cuadros.

Los átomos de glicina 1 (G1) y ácido aspártico 9 (D9) que deberían formar el enlace del anillo, se encuentran destacados en amarillo en la Tabla 2.12, en el frame 2311 se encontró un posible puente de hidrógeno y la distancia entre los átomos es de 2,570 Å, en cambio en el frame 3669 se distinguieron dos posibles interacciones por puentes de hidrógeno, pero la distancia entre los átomos es mayor, 2,704 y 2,605 Å, y diferente en el mismo modelo por el ángulo que se considera para medirla.

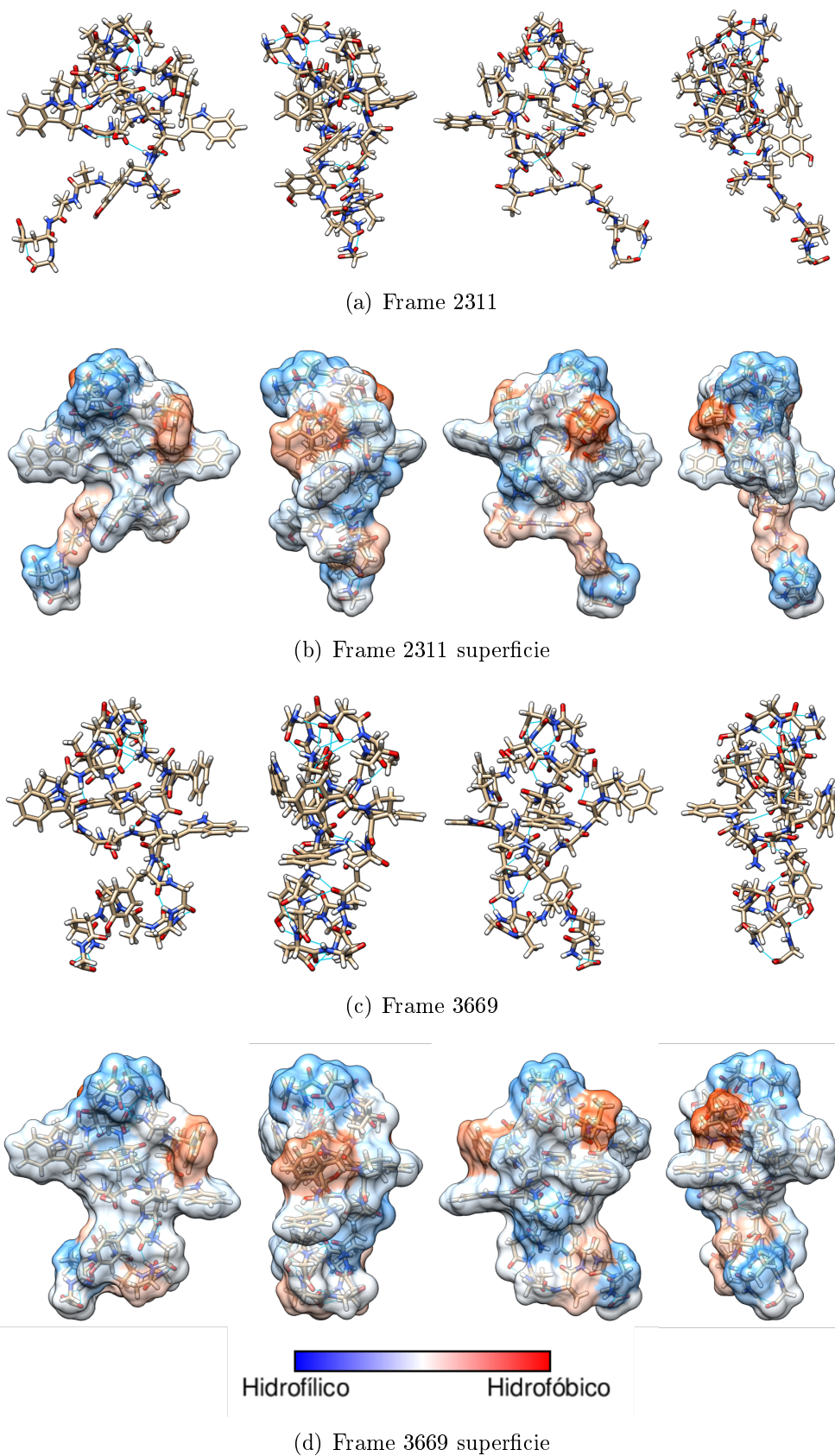


Figura 2.19: Modelo LP4-m6-5 después de dinámica molecular. **(a)** y **(b)** muestran el cuadro o frame 2311 de la dinámica molecular junto con la hidrofobicidad de la superficie. **(c)** y **(d)** muestran el cuadro o frame 3669 de la dinámica molecular junto con la hidrofobicidad de la superficie.

Tabla 2.12: Interacciones por puentes de hidrógeno encontradas en modelo LP4-m6-5. En amarillo se encuentra destacada la interacción donde se debería formar el enlace del ciclo, en celeste se destacan los átomos que forman parte del esqueleto de carbono y en blanco los que se encuentran en las cadenas laterales.

Frame 2311					Frame 3669				
Dador (D)	Aceptor (A)	Hidrógeno	Distancia D..A (Å)	Distancia D-H..A (Å)	Dador (D)	Aceptor (A)	Hidrógeno	Distancia D..A (Å)	Distancia D-H..A (Å)
GLY 1 N	ASP 9 OD1	GLY 1 H1	2.570	1.766	GLY 1 N	ASP 9 OD1	GLY 1 H2	2.704	1.906
GLY 1 N	ASN 10 OD1	GLY 1 H2	3.128	2.128	GLY 1 N	ASP 9 OD2	GLY 1 H2	2.605	1.774
GLY 1 N	ASP 11 OD2	GLY 1 H3	2.636	1.652	GLY 1 N	ASN 10 OD1	GLY 1 H3	3.107	2.200
GLN 4 N	TRP 14 O	GLN 4 H	2.943	2.101	GLY 1 N	ASP 11 OD1	GLY 1 H1	2.925	2.028
GLN 4 NE2	GLY 5 O	GLN 4 HE21	2.847	2.154	GLY 1 N	ASP 11 OD2	GLY 1 H1	2.957	2.137
GLN 4 NE2	TYR 17 O	GLN 4 HE22	3.096	2.121	GLY 5 N	PRO 15 O	GLY 5 H	3.579	2.577
TRP 7 N	SER 6 OG	TRP 7 H	2.819	1.971	ASP 9 N	TRP 7 O	ASP 9 H	2.691	1.858
ASP 9 N	TRP 7 O	ASP 9 H	2.760	1.998	ASN 10 ND2	ASP 11 OD1	ASN 10 HD22	2.845	1.900
ASN 10 N	ASP 9 OD2	ASN 10 H	2.687	1.770	ASP 11 N	ASP 9 OD1	ASP 11 H	2.938	2.207
ASN 10 ND2	ASP 11 OD1	ASN 10 HD22	2.795	1.807	THR 12 N	ASP 9 OD1	THR 12 H	3.350	2.597
THR 12 N	ASP 11 OD2	THR 12 H	2.740	1.765	THR 12 N	ASP 11 OD2	THR 12 H	2.839	1.907
TRP 14 N	THR 12 O	TRP 14 H	2.780	1.859	TRP 14 N	THR 12 O	TRP 14 H	2.881	1.988
TYR 17 N	GLN 4 OE1	TYR 17 H	2.764	1.755	TYR 17 N	GLN 4 OE1	TYR 17 H	2.801	1.825
GLN 23 NE2	GLY 24 O	GLN 23 HE21	2.736	1.759	TYR 17 OH	GLN 23 O	TYR 17 HH	2.726	1.884
					GLY 18 N	GLN 4 OE1	GLY 18 H	2.765	1.782
					ALA 19 N	TYR 17 O	ALA 19 H	2.832	1.922
					GLY 20 N	GLY 18 O	GLY 20 H	2.764	1.874
					ALA 21 N	ALA 19 O	ALA 21 H	2.841	1.915
					GLN 23 NE2	GLY 24 O	GLN 23 HE21	2.845	2.100
					GLN 23 NE2	GLY 24 OXT	GLN 23 HE21	3.120	2.098

Las muestras de la dinámica del último modelo LP4-m7-3 se encuentran en la Figura 2.20. Los cuadros analizados mantuvieron la configuración del modelo inicial donde prolina 15 (P15) está sobre el anillo y triptofano 16 (W16) bajo este.

Los aminoácidos de las zonas hidrofóbicas se mantienen, pero alanina 19 (A19) no se encuentra interaccionando con las otras alaninas (A21 y A22), la zona hidrofóbica de estas últimas es menor ya que A21 está cubierta por otros residuos de la estructura haciendo que tenga menos interacción con el medio, por otra parte, fenilalanina 2 y valina 13 están mas cercanas en ambas estructuras. En el cuadro 3218 se puede ver una interacción entre estos dos residuos y el carbono de la treonina 12 (T12) que hace como unión para esta zona hidrofóbica.

Por último las interacciones por puentes de hidrógeno de LP4-m7-3 están en la Tabla 2.13, se observa la predominancia de relaciones con los átomos del esqueleto de carbono.

Los átomos que deberían formar el enlace del anillo están destacados en amarillo, en ambos frames es posible encontrar dos puentes de hidrógeno entre estos átomos indicando una cercanía, a pesar de esto las distancias entre ellos sigue estando fuera del rango para formar el enlace (ver Tabla G.9 con las distancias de otros lazo péptidos).

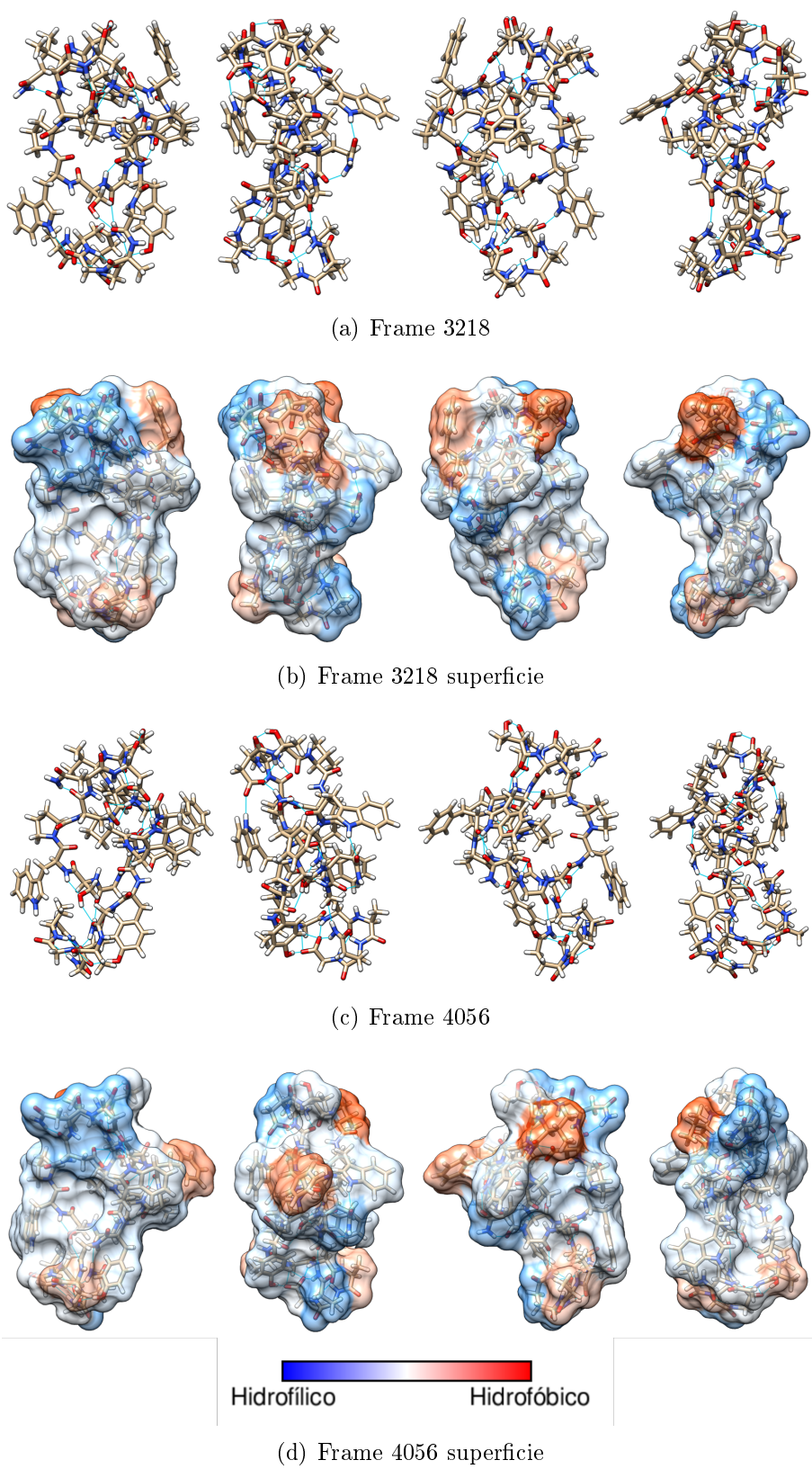


Figura 2.20: Modelo LP4-m7-3 después de dinámica molecular. **(a)** y **(b)** muestran el cuadro o frame 3218 de la dinámica molecular junto con la hidrofobicidad de la superficie. **(c)** y **(d)** muestran el cuadro o frame 4056 de la dinámica molecular junto con la hidrofobicidad de la superficie.

Tabla 2.13: Interacciones por puentes de hidrógeno encontradas en modelo LP4-m7-3. En amarillo se encuentra destacada la interacción donde se debería formar el enlace del ciclo, en celeste se destacan los átomos que forman parte del esqueleto de carbono y en blanco los que se encuentran en las cadenas laterales.

Frame 3218					Frame 4056				
Dador (D)	Aceptor (A)	Hidrógeno	Distancia D..A (Å)	Distancia D-H..A (Å)	Dador (D)	Aceptor (A)	Hidrógeno	Distancia D..A (Å)	Distancia D-H..A (Å)
GLY 1 N	ASP 9 OD1	GLY 1 H3	2.796	1.988	GLY 1 N	ASP 9 OD1	GLY 1 H3	2.805	1.940
GLY 1 N	ASP 9 OD2	GLY 1 H3	2.795	1.852	GLY 1 N	ASP 9 OD2	GLY 1 H3	2.779	1.914
GLY 1 N	ASP 11 OD2	GLY 1 H1	2.642	1.836	GLY 1 N	ASP 11 OD1	GLY 1 H1	2.755	1.995
GLY 1 N	TRP 14 O	GLY 1 H2	2.720	1.844	GLY 1 N	TRP 14 O	GLY 1 H2	2.753	1.959
GLN 4 NE2	GLN 4 O	GLN 4 HE21	2.805	1.909	PHE 2 N	PRO 15 O	PHE 2 H	2.898	2.031
GLY 5 N	TRP 16 O	GLY 5 H	2.973	2.098	GLN 4 N	PHE 2 O	GLN 4 H	2.949	2.069
SER 6 N	TRP 16 O	SER 6 H	2.918	2.101	GLN 4 NE2	GLN 4 O	GLN 4 HE21	2.672	1.791
SER 6 OG	GLY 18 O	SER 6 HG	2.853	1.902	GLY 5 N	TRP 16 O	GLY 5 H	3.088	2.054
TRP 7 NE1	GLY 20 O	TRP 7 HE1	2.863	1.858	SER 6 OG	GLY 18 O	SER 6 HG	3.039	2.125
ASN 10 ND2	ASP 9 O	ASN 10 HD21	2.851	1.874	TRP 7 N	SER 6 OG	TRP 7 H	2.713	1.915
ASP 11 N	ASP 9 OD2	ASP 11 H	2.801	1.822	ASN 10 ND2	ASP 9 O	ASN 10 HD21	2.885	1.899
THR 12 OG1	ASP 11 O	THR 12 HG1	2.691	1.741	THR 12 N	ASP 11 OD1	THR 12 H	2.962	2.156
TRP 14 N	THR 12 O	TRP 14 H	2.852	1.996	THR 12 OG1	ASP 11 O	THR 12 HG1	2.721	1.820
TRP 14 NE1	GLN 4 OE1	TRP 14 HE1	2.807	1.863	TRP 14 NE1	GLN 4 OE1	TRP 14 HE1	2.909	2.147
TRP 16 NE1	ASP 11 OD1	TRP 16 HE1	2.802	1.798	TRP 16 NE1	ASP 11 OD2	TRP 16 HE1	3.027	1.987
TYR 17 OH	GLY 24 OXT	TYR 17 HH	2.690	1.707	TYR 17 OH	GLY 24 O	TYR 17 HH	2.686	1.716
GLY 20 N	GLY 24 O	GLY 20 H	2.782	1.802	GLY 20 N	GLY 24 O	GLY 20 H	3.046	2.116
ALA 21 N	GLY 24 O	ALA 21 H	2.865	1.871	GLY 20 N	GLY 24 OXT	GLY 20 H	3.016	2.137
GLN 23 NE2	GLY 5 O	GLN 23 HE22	3.035	2.058	ALA 21 N	GLY 24 OXT	ALA 21 H	2.705	1.805
GLN 23 NE2	GLY 24 OXT	GLN 23 HE21	2.898	1.971	GLN 23 NE2	GLY 5 O	GLN 23 HE22	2.991	2.018
GLY 24 N	ALA 21 O	GLY 24 H	3.206	2.260	GLN 23 NE2	GLY 24 OXT	GLN 23 HE21	2.949	2.014
					GLY 24 N	ALA 21 O	GLY 24 H	3.046	2.031

2.8.1. Análisis de los ángulos de los residuos para modelos de LP4 a través del gráfico de Ramachandran

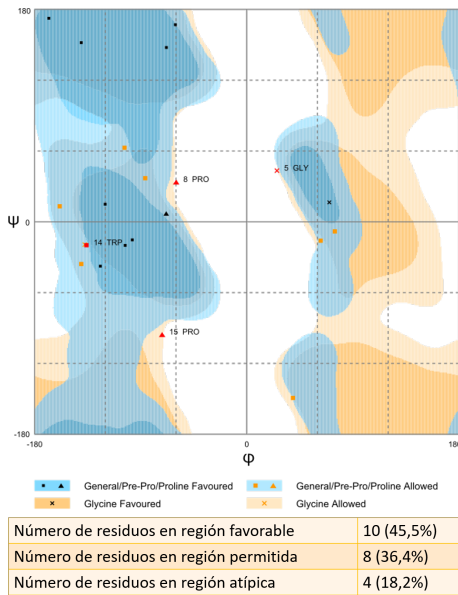
Se generaron los gráficos de Ramachandran para los tres modelos estudiados de LP4.

LP4-m4-1 está representado en la Figura 2.21. La mayor parte de los residuos de este modelo se encuentran en las zonas favorables y permitidas, el frame 3831 tiene 4 aminoácidos en regiones atípicas, glicina 5 (G5) que al no presentar impedimento estérico podría tener una configuración diferente, prolina 8 (P8), prolina 16 (P16) y triptófano 14 (W14). El cuadro 4412 presentó tres residuos en regiones atípicas, P8, P16 y W14.

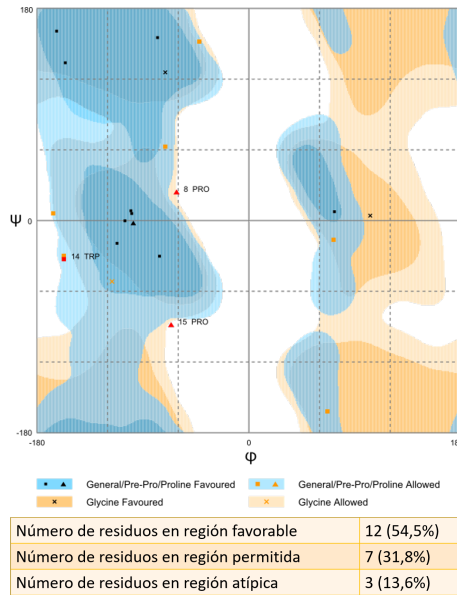
Los gráficos del modelo LP4-m6-5 están en la Figura 2.22. Ambos frames presentaron 3 residuos en zonas atípicas del gráfico, en el frame 2311 son glicina 5 (G5), prolina 8 (P8) y valina 13 (V13), en el frame 3669 son P8, V13 y glicina 20 (G20).

Por último los gráficos de la Figura 2.23 representan al modelo LP4-m7-3. Los cuadros de este modelo solo presentaron dos aminoácidos en regiones atípicas pero cercanas a regiones permitidas, lo que es tolerable para el modelo, siendo para 3218 fenilalanina 2 (F2) y glicina 5 (G5), y para 4056 fenilalanina 2 (F2) y treonina 12 (T12).

Con estos resultados el mejor modelo obtenido fue LP4-m7-3-3218, porque tiene solo 2 aminoácidos con ángulos atípicos y uno de ellos es una glicina que puede ser reestructurada fácilmente.

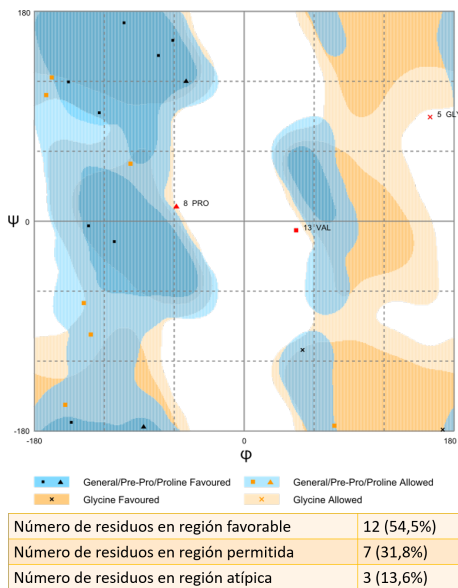


(a) Frame 3831

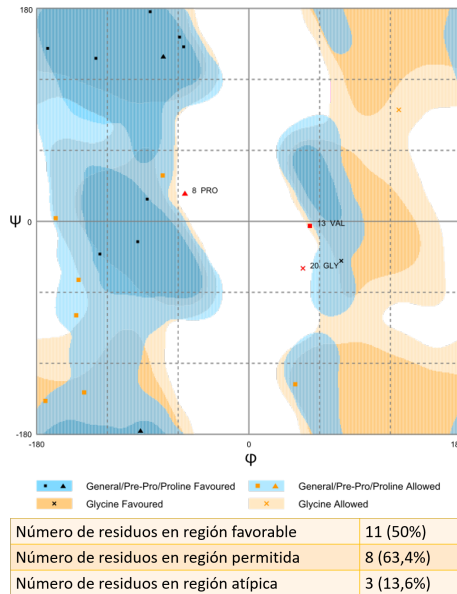


(b) Frame 4412

Figura 2.21: Gráfico de Ramachandran para modelo LP4-m4-1 (Lovell et al., 2002). Los puntos marcados en rojo son aquellos residuos que se encuentran en las zonas atípicas del gráfico.

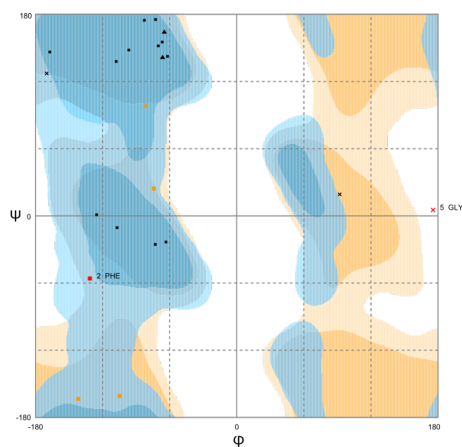


(a) Frame 2311



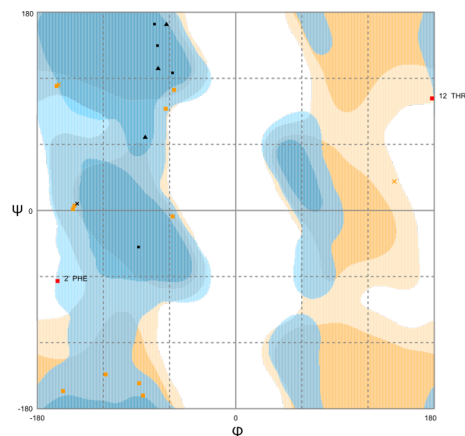
(b) Frame 3669

Figura 2.22: Gráfico de Ramachandran para modelo LP4-m6-5 (Lovell et al., 2002). Los puntos marcados en rojo son aquellos residuos que se encuentran en las zonas atípicas del gráfico.



Número de residuos en región favorable	16 (72,7%)
Número de residuos en región permitida	4 (18,2%)
Número de residuos en región atípica	2 (9,1%)

(a) Frame 3218



Número de residuos en región favorable	8 (36,4%)
Número de residuos en región permitida	12 (54,5%)
Número de residuos en región atípica	2 (9,1%)

(b) Frame 4056

Figura 2.23: Gráfico de Ramachandran para modelo LP4-m7-3 (Lovell et al., 2002). Los puntos marcados en rojo son aquellos residuos que se encuentran en las zonas atípicas del gráfico.

2.9. Potencial electrostático como clave en el estudio de interacciones de péptidos y proteínas con otras moléculas

El potencial electrostático de las moléculas es una herramienta útil cuando se están buscando las interacciones proteína-proteína o proteína y ligando específico. Generalmente se buscaron homologías de funcionalidad a partir solo de la estructura aminoacídica de la proteína pero muchas veces sus relaciones con el entorno están mayormente definidas por los campos que forman, ocasionando que proteínas aminoacídicamente diferentes tengan acciones similares (Cheeseright and Mackey, 2015; Rocchia and Spagnuolo, 2015).

Por lo anterior se generó el campo electrostático de los modelos obtenidos para los cuatro lazo péptidos, escogiendo un representante de cada péptido para realizar un estudio comparativo preliminar de estos con algunos de los templados utilizados para generarlos.

Las estructuras fueron preparadas para el cálculo a través del comando PDB2PQR de Chimera, el cual reconstruye átomos faltantes (si fuera necesario), adiciona los hidrógenos que no estén presentes en el archivo PDB pero que si pertenezcan a la estructura, asigna las cargas y los radios atómicos desde campos de fuerza específicos (Dolinsky et al., 2007, 2004). Las opciones utilizadas para PDB2PQR fueron: campo de fuerza calculado por PARSE (PARAMeters for Solvation Energy) (Sitkoff et al., 1994; Tang et al., 2007) y se predijeron los estados de protonación utilizando PROPKA (Li et al., 2005; Sondergaard et al., 2011) en pH 7. El cálculo del potencial electrostático se realizó utilizando APBS (Adaptive Poisson-Boltzmann Solver), herramienta que resuelve la ecuación de Poisson-Boltzmann a través de métodos numéricos y entrega el potencial electrostático de las moléculas (Baker et al., 2001). La representación de este potencial en cada punto de la superficie se hace asignando un código de color a los valores en la molécula.

2.9.1. Campo electrostático del modelo representante de LP1

A continuación se muestran los resultados del cálculo del campo electrostático para el modelo LP1-m6-2039. Este modelo fue escogido por su buena conclusión en el gráfico de Ramachandran (Figura 2.5.c).

La Figura 2.24 presenta un resumen del modelo LP1-m6-2039. Se muestran dos imágenes del campo electrostático de la molécula, el primero (Figura 2.24.c) es para destacar los valores mínimos y máximos (-4,415 a 0,522) encontrados en la superficies. El segundo (Figura 2.24.d) está normado o estandarizado, de -3 a 3, para poderlo comparar con campos de otras estructuras. El campo del modelo es principalmente negativo, siendo las áreas hidrofílicas las zonas más negativas.

Comparando las superficies obtenidas en el modelo con las del templado 5jpl (LP2006) (Warren et al., 2017) observadas en la Figura 2.25, no se encuentran similitudes en su disposición espacial ni sus superficies ya que 5jpl dos sectores en el campo electrostático bastante

marcados, uno muy negativo (azul) y otro muy positivo (rojo). La configuración globular del modelo se asemeja más al templado 2n5c (Chaxapeptin) (Elsayed et al., 2015), mostrado en Figura 2.27 a pesar de no ser uno de los templados utilizados para su creación, pero el campo no es similar. Por lo tanto la estructura analizada no se asemeja a ninguno de los templados en cuando a hidrofobicidad o campo electrostático, entonces su función o comportamiento no sería similar.

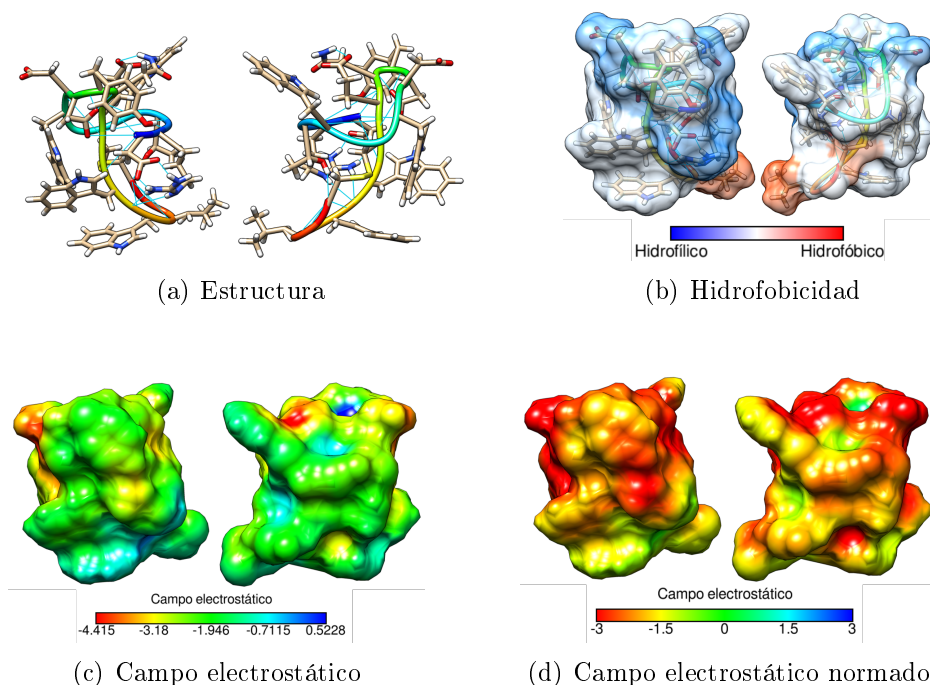


Figura 2.24: Estructura, hidrofobicidad y campo electrostático del modelo LP1-m6-2039. (a) Muestra la orientación de la estructura del péptido (b) Presenta la hidrofobicidad de la estructura (c) Campo electrostático que muestra los valores máximos y mínimos de la estructura ($Kcal/mol * e$) (d) Campo electrostático normado entre -3 y 3 $Kcal/mol * e$.

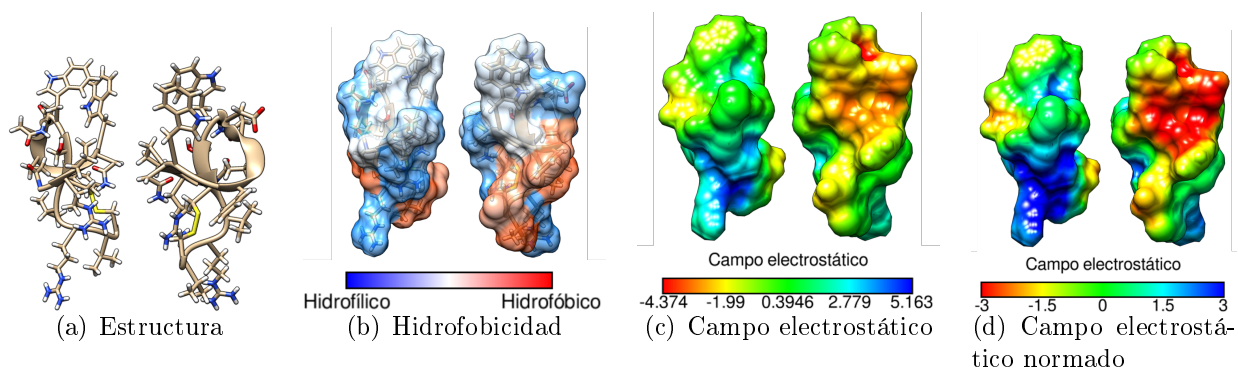


Figura 2.25: Estructura, hidrofobicidad y campo electrostático del templado 5jpl (LP2006) (Warren et al., 2017). (a) Muestra la orientación de la estructura del péptido. (b) Presenta la hidrofobicidad de la estructura (c) Campo electrostático que muestra los valores máximos y mínimos de la estructura ($Kcal/mol * e$) (d) Campo electrostático normado entre -3 y 3 $Kcal/mol * e$.

2.9.2. Campo electrostático del modelo representante de LP2

Los resultados del campo electrostático del modelo LP2-m5-3-4534 están en la Figura 2.26, este modelo fue escogido por tener solo un residuo en región atípica del gráfico del Ramachandran (Figura 2.10.d) y tener una buena compactación de sus residuos hidrofóbicos.

El campo electrostático del modelo está en el rango entre -0,44 y 3,498 (Figura 2.26.c), teniendo un campo mayoritariamente positivo, como se ve en la Figura 2.26.d. Destaca por sus sectores hidrofóbicos e hidrofílicos marcados.

Este modelo será comparado con el templado 2n5c (Chaxapeptin) (Elsayed et al., 2015). Ambas moléculas tienen una forma similar a un triángulo (desde las vistas que se ilustraron), la zona hidrofóbica de 2n5c es mayor que la del modelo, si el modelo tuviera una distribución mayor en el rango del campo podría ser similar a 2n5c ya que, la zona más positiva se asemeja a la del templado en cuanto a superficie.

De las observaciones anteriores se desprende que no se puede llegar a una conclusión certera sobre la función o interacción del péptido, pero se tiene una idea de la distribución de la molécula y su relación que debería privilegiar el acercamiento a estructuras con campos negativos que podrían ser atraídas por su carga positiva.

Preliminarmente este lazo péptido no tendría alguna actividad similar a ninguno de los templados utilizados para el análisis.

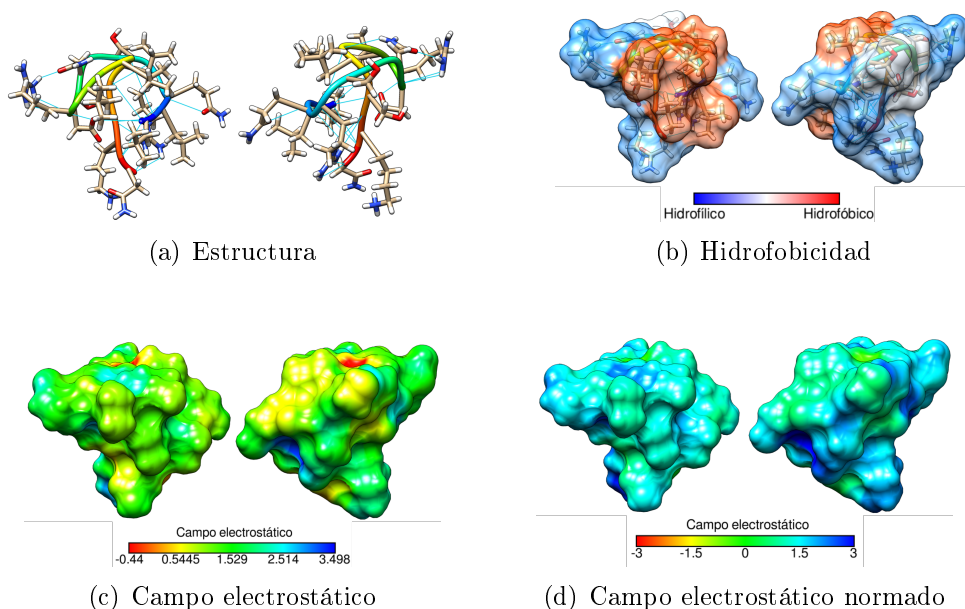


Figura 2.26: Estructura, hidrofobicidad y campo electrostático del modelo LP2-m5-3-4534. (a) Muestra la orientación de la estructura del péptido, (b) Presenta la hidrofobicidad de la estructura (c) Campo electrostático que muestra los valores máximos y mínimos de la estructura ($Kcal/mol * e$) (d) Campo electrostático normado entre -3 y 3 $Kcal/mol * e$.

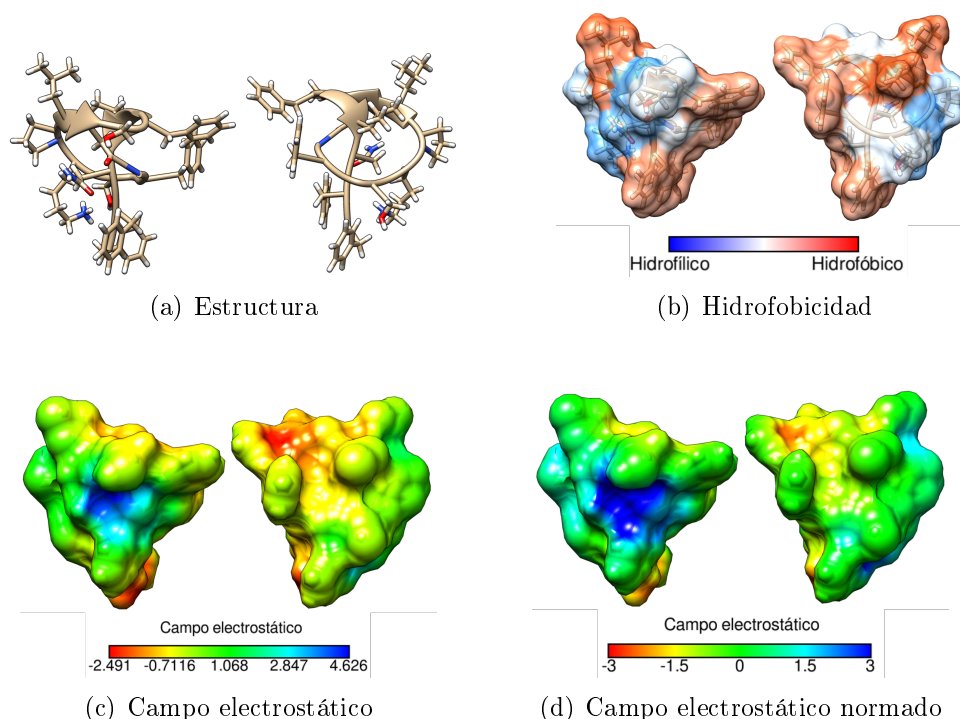


Figura 2.27: Estructura, hidrofobicidad y campo electrostático del templado 2n5c (Chaxapeptin) (Elsayed et al., 2015). (a) Muestra la orientación de la estructura del péptido. (b) Presenta la hidrofobicidad de la estructura (c) Campo electrostático que muestra los valores máximos y mínimos de la estructura ($Kcal/mol * e$) (d) Campo electrostático normado entre -3 y 3 $Kcal/mol * e$.

2.9.3. Campo electrostático del modelo representante de LP3

LP3-m3-2-1540 fue el modelo escogido para el análisis del campo electrostático en el lazo péptido LP3, esto se muestra en la Figura 2.28.

El rango del campo electrostático para el modelo es de -1,619 a 2,301 (Figura 2.28.c), la estructura es mayormente neutra con zonas negativas cercanas al hidrofóbico y zonas positivas principalmente en sectores hidrofílicos (ver Figura 2.28).

El templado elegido para comparar este péptido fue 2mfv (Xanthomonin II) (Hegemann et al., 2014b), pero como se ve en la Figura 2.29 este no tiene ninguna similitud espacial con el modelo, su elección como templado se basó en encontrar la mejor ubicación de los residuos antes y después del anillo del lazo péptidos. Si la elección del templado solo se hubiera basado en homología de secuencias, 2n5c (Chaxapeptin) (Elsayed et al., 2015) hubiera sido el ideal ya que es el mayor porcentaje de identidad nucleotídica tiene con LP3.

Por lo anterior se analizaron las similitudes espaciales del modelo con 2n5c logrando las siguientes anotaciones: la configuración espacial es muy similar entre ellos, el modelo tiene una zona hidrofóbica menor, el rango del campo electrostático del modelo es menor pero su distribución es similar porque se pueden encontrar zonas marcadas positivas y zonas nega-

tivas, teniendo ambas estructuras una gran zona neutra. Con las especificaciones anteriores se podría concluir inicialmente que LP3 con la configuración del modelo LP3-m3-2-1540 podría tener una actividad similar a Chaxapeptin pero con un rango menor de acción debido a campo.

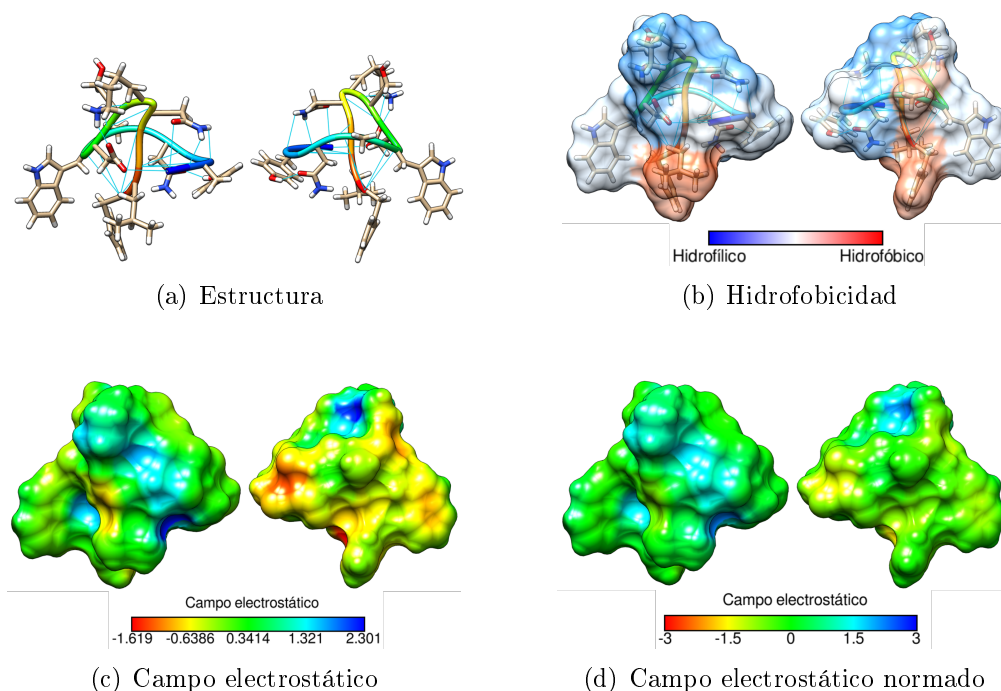


Figura 2.28: Estructura, hidrofobicidad y campo electrostático del modelo LP3-m3-2-1540. (a) Muestra la orientación de la estructura del péptido (b) Presenta la hidrofobicidad de la estructura (c) Campo electrostático que muestra los valores máximos y mínimos de la estructura ($Kcal/mol * e$) (d) Campo electrostático normado entre -3 y 3 $Kcal/mol * e$.

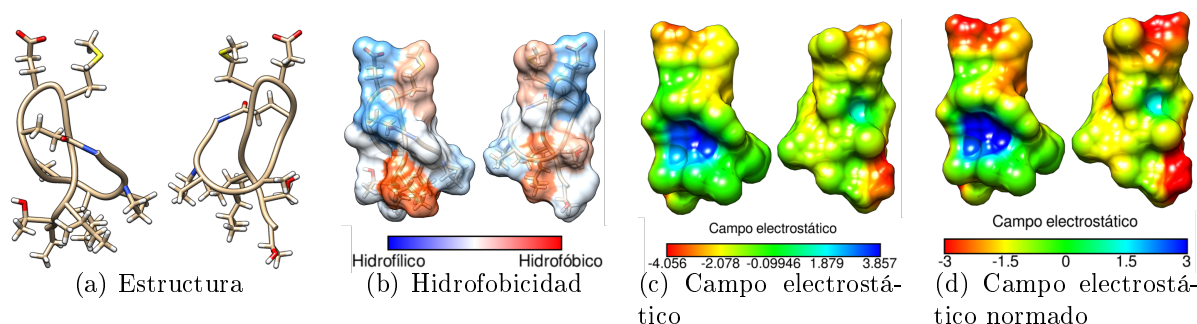


Figura 2.29: Estructura, hidrofobicidad y campo electrostático del templado 2mfv (Xanthomonin II) (Hegemann et al., 2014b). (a) Muestra la orientación de la estructura del péptido. (b) Presenta la hidrofobicidad de la estructura (c) Campo electrostático que muestra los valores máximos y mínimos de la estructura ($Kcal/mol * e$) (d) Campo electrostático normado entre -3 y 3 $Kcal/mol * e$.

2.9.4. Campo electrostático del modelo representante de LP4

Para el análisis de LP4 se apartaron 2 modelos, LP4-m4-1-4412 cuya configuración es P15 sobre el anillo y W16 bajo este, y LP4-m6-5-3669 donde W14 está sobre el anillo y P15 por debajo.

Para la comparación de los modelos de LP4 se escogieron dos de los templados utilizados para el modelamiento: 5gov (Sphaericin) (Kodani et al., 2017) (Figura 2.32) seleccionado por presentar el mejor alineamiento con la secuencia de LP4 y 2n6v (Astexin3) (Allen et al., 2016; Maksimov et al., 2015) (Figura 2.33) por tener el mismo largo de secuencia.

LP4-m4-1-4412 se muestra en la Figura 2.30, la molécula presentó un campo mayoritariamente negativo a neutro (Figura 2.30.d) y su rango de -3,343 a 0,1314 (Figura 2.30.c). Se observa una similitud espacial con 5gvo pero el rango del campo y distribución de cargas no tienen ninguna semejanza ya que 5gvo tiene un rango mayor y un sector positivo muy marcado en su superficie. 2n6v es diferente a los demás templados utilizados porque su configuración espacial es alargada mas que globular y no tiene parecido con el modelo LP4-m4-1-4412 pero si hubiera sido comparado con el modelo LP4-m6-5-2311 (ver Figura 2.19) si tendría similitud espacial, en cuanto al campo 2n6v presenta un sector negativo considerable igual que LP4-m4-1-4412.

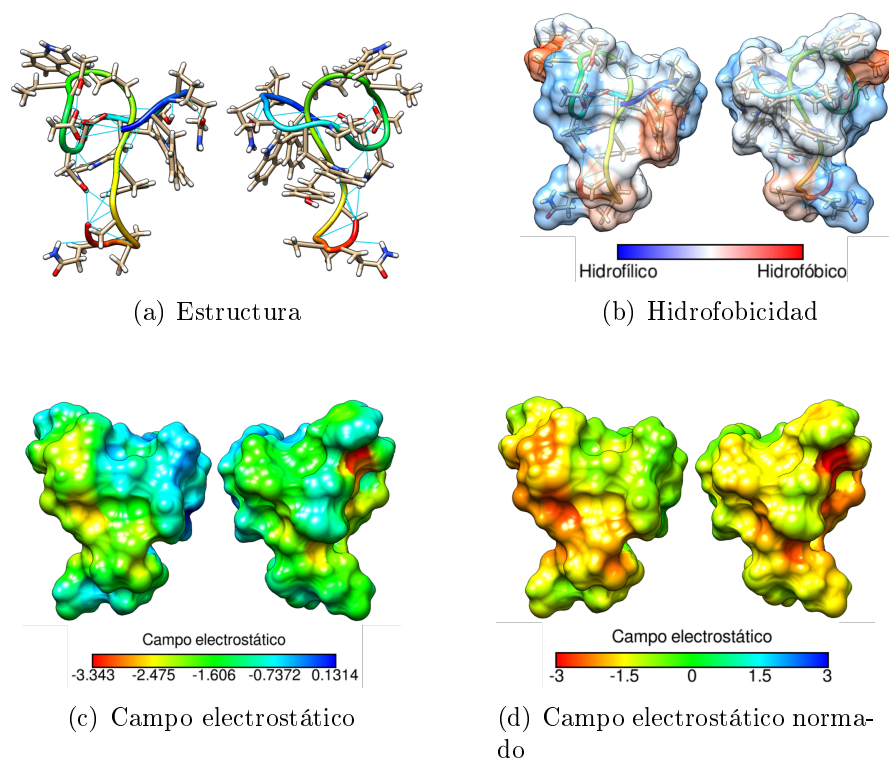


Figura 2.30: Estructura, hidrofobicidad y campo electrostático del modelo LP4-m4-1-4412. (a) Muestra la orientación de la estructura del péptido (b) Presenta la hidrofobicidad de la estructura (c) Campo electrostático que muestra los valores máximos y mínimos de la estructura ($Kcal/mol * e$) (d) Campo electrostático normado entre -3 y 3 $Kcal/mol * e$.

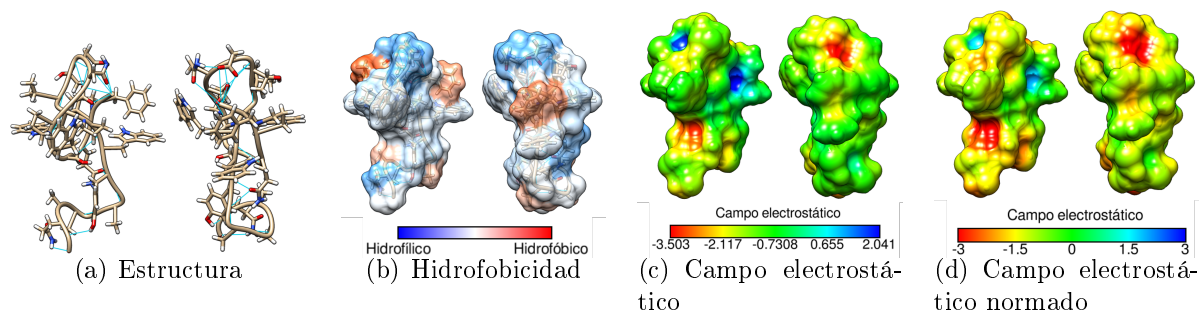


Figura 2.31: Estructura, hidrofobicidad y campo electrostático del modelo LP4-m6-5-3669. **(a)** Muestra la orientación de la estructura del péptido **(b)** Presenta la hidrofobicidad de la estructura **(c)** Campo electrostático que muestra los valores máximos y mínimos de la estructura ($Kcal/mol * e$) **(d)** Campo electrostático normado entre -3 y 3 $Kcal/mol * e$.

El segundo modelo LP4-m6-5-3669 presenta una distribución espacial diferente (ver Figura 2.31), mas alargada y con un campo electrostático de rango mayor, de -3,504 a 2,041 (Figura 2.31.c), estos límites de campo son semejantes a los encontrados en los templados visto en la sección, no así la distribución de cargas en la superficie (Figura 2.31.d), se identifica por tener una concavidad negativa y la mayoría de los templados presentan concavidades positivas mayores.

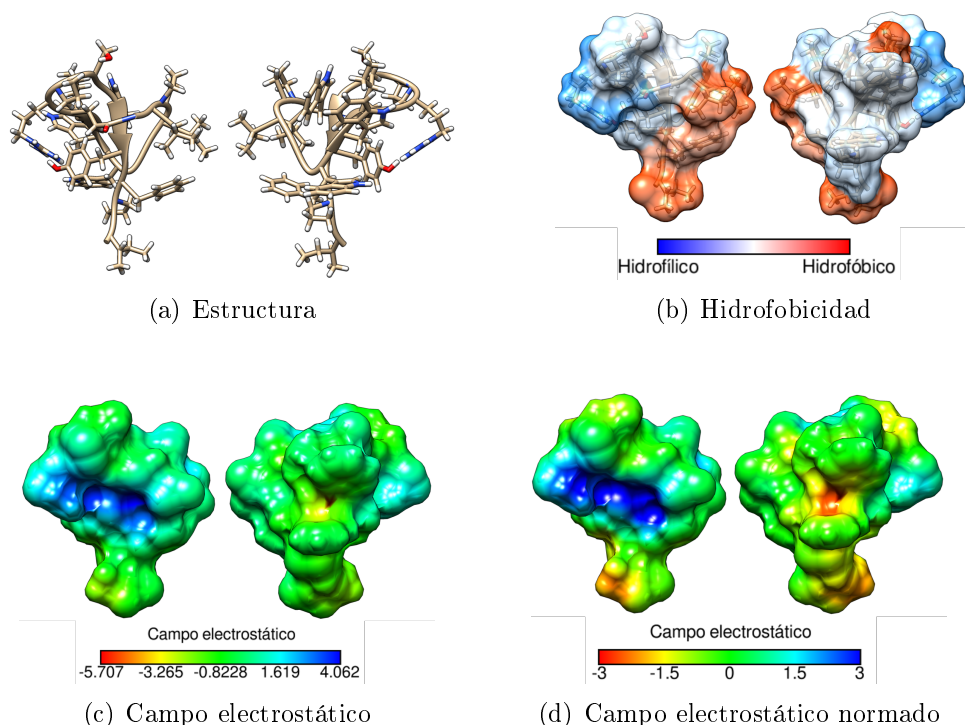


Figura 2.32: Estructura, hidrofobicidad y campo electrostático del templado 5gov (Sphaericin) (Kodani et al., 2017). **(a)** Muestra la orientación de la estructura del péptido. **(b)** Presenta la hidrofobicidad de la estructura **(c)** Campo electrostático que muestra los valores máximos y mínimos de la estructura ($Kcal/mol * e$) **(d)** Campo electrostático normado entre -3 y 3 $Kcal/mol * e$.

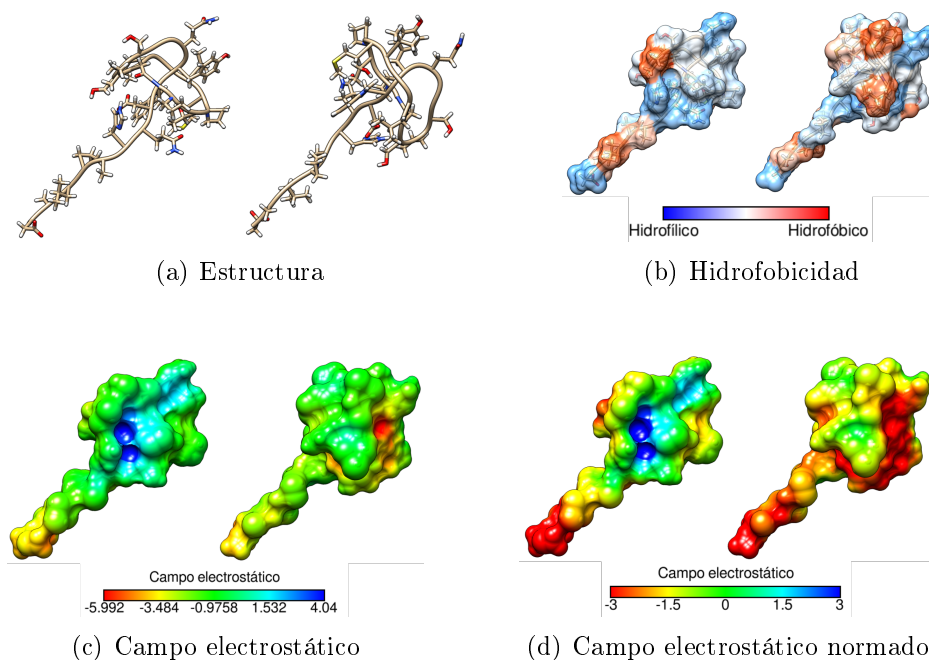


Figura 2.33: Estructura, hidrofobicidad y campo electrostático del templado 2n6v (Astexin3) (Allen et al., 2016; Maksimov et al., 2015). **(a)** Muestra la orientación de la estructura del péptido. **(b)** Presenta la hidrofobicidad de la estructura **(c)** Campo electrostático que muestra los valores máximos y mínimos de la estructura ($Kcal/mol * e$) **(d)** Campo electrostático normado entre -3 y 3 $Kcal/mol * e$.

A partir de los registros anteriores no se puede llegar a una conclusión sobre la actividad de la molécula comparándola con los templados, pero si se destaca que LP4 puede tener una mayor interacción con moléculas de cargas positivas atraídas por su campo mayormente negativo.

2.10. Conclusiones

1. Se crearon modelos por homología de secuencia y estructura de los lazo péptidos encontrados en *Streptomyces* sp HST28.
2. Se estudiaron las estructuras de los modelos creados.
3. Se realizó una validación parcial de los modelos, concluyendo que los residuos de cada modelo están dentro de las configuraciones teóricas permitidas, faltando ajustar algunos sectores de las estructuras en ciertos casos.
4. Se estudio el campo electrostático de algunos de los modelos y templados, encontrándose que existen relaciones y diferencias que pueden ayudar a elucidar actividad de los péptidos.
5. Los modelos obtenidos se podrían comparar con todas las estructuras reportadas de lazo péptidos y así obtener una mejor conclusión en cuanto a actividad e interacciones.

Capítulo 3

Expresión heteróloga de los clusters, bioensayos y detección de los lazo péptidos

3.1. Resumen

La expresión heteróloga de metabolitos es una metodología experimental ampliamente utilizada en el estudio de nuevas proteínas y péptidos. En este capítulo se detalla el estudio experimental realizado a los nuevos lazo péptidos encontrados en *Streptomyces* sp. HST28.

Los cuatro lazo péptidos teóricos encontrados en el genoma de *Streptomyces* sp. HST28 fueron clonados en *Streptomyces coelicolor* M1152 y M1154 para luego ser probados en ensayos de actividad. Solo dos de estos lazo péptidos fueron clonados exitosamente (LP1 y LP3), corroborando esto a través de PCR y posterior secuenciación de los clones. Las condiciones de bioensayo probadas no arrojaron resultados favorables para ninguna de las cepas, lo que quiere decir, que pueden no estar produciendo los péptidos o estos últimos no presentan actividad bajo las condiciones tratadas.

Los resultados negativos de los bioensayos indican que puede haber una nula o poca expresión de los lazo péptidos, también podrían presentar un problema en su biosíntesis o simplemente no tener actividad bajo estas condiciones evaluadas.

La comprobación final de la expresión de los péptidos fue realizada a través de espectrometría de masa, el lazo péptido analizado fue LP1. Como resultado no se pudo encontrar la presencia de una masa/carga (m/z) correspondiente a la predicha para la molécula en el medio de cultivo ni en el extracto celular, este análisis se realizó también a la cepa nativa (*Streptomyces* sp. HST28) donde tampoco se encontró, por esto se supone que el clúster de LP1 puede ser silente y bajo las condiciones probadas no se expresa, tanto en esta como en las cepas de *S. coelicolor* transformadas, se propone modificar las condiciones de cultivo o formada de clonamiento con la finalidad de corroborar esta hipótesis.

3.2. Metodología capítulo

3.2.1. Metodología general de expresión heteróloga y bioensayos

A continuación se detalla la metodología general que se utilizó para la expresión heteróloga de los clusters, los protocolos específicos se pueden encontrar en Anexo F.

1. Aislar DNA genómico desde *Streptomyces sp.* HST28.
2. Realizar PCR gradiente del DNA genómico para obtener la temperatura óptima de los cebadores antes diseñados. Teniendo la temperatura óptima se procede a ejecutar el PCR para la purificación de los clusters.
3. Luego se procede a la doble digestión con enzimas de restricción seleccionadas para el inserto y el vector. Purificar el vector desde el gel de agarosa y el inserto directamente desde la digestión.
4. Teniendo el vector y el inserto digeridos se procede a su ligación de acuerdo a lo recomendado por el protocolo de enzima T4 ligasa.
5. Esta ligación se transforma en *E. coli* DH5 α o en *E. coli* TOP10 y se plaquea para selección en LB con antibiótico, para el caso de pIJ10257 se utiliza higromicina B concentración 80 μ g/ml.
6. Para comprobar la correcta ligación y transformación se realiza un PCR utilizando cebadores diseñados para amplificar por fuera del sitio de multiclonamiento del vector (GBA001 y GBA002, Anexo C), este se visualiza en un gel. Paralelo a esto se requiere crear una placa de respaldo de las colonias seleccionadas para continuar con las siguientes etapas en el caso de que estas sean positivas.
7. Desde la placa de respaldo se realiza una miniprep para extraer el vector. Si se estima necesario se realiza una comprobación de la miniprep haciendo una digestión de los vectores con las enzimas de restricción que se utilizaron inicialmente.
8. El producto de miniprep se transforma en *E. coli* ET12567/pUZ8002 (ETZ) y esta se plaquea en LB con cloranfenicol, kanamicina y el antibiótico de selección del vector utilizado, que en este caso es higromicina B (concentración 80 μ l/ml).
9. Realizar conjugación con *Streptomyces coelicolor* (M1152 o M1154), plaquear en SFM 10mM MgCl₂.
10. Ya teniendo las colonias seleccionadas en el medio anterior, se plaquean nuevamente en placas de SFM con ácido nalidíxico y el antibiótico de selección del vector (higromicina B, para pIJ10257), luego de estas placas se replaquea en placas con SFM y ácido nalidíxico. Por último se plaquea en placas de SFM solo, para realizar desde este un stock de esporas con el cual se trabaja en las siguientes etapas.

La producción de metabolitos secundarios para las pruebas de actividad se realizó de la siguiente forma:

1. Se cultivaron los clones de *S. coelicolor* en 3 medios diferentes (TSB-YEME (50-50), ISP2 e ISP2 modificado) en un matraz de 125 ml con 25 ml de medio, a 30°C por 7 días.

2. Pasado el tiempo de incubación se hacen cultivos de 50 ml de medio con 1 ml del cultivo anterior, a 30°C, 250 rpm por 7 días.
3. Desde este último cultivo se puede realizar una producción mas grande en volúmenes de medio mayores. En este trabajo se hicieron cultivos con volúmenes totales de 100 ml.
4. El último cultivo es utilizado para los bioensayos. El extracto es preparado centrifugando el cultivo a 600 rpm por 10 minutos y separando el sobrenadante del pellet.
5. Los bioensayos se realizaron contra *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* y cepas de hongos patógenos de plantas. La preparación de los organismos, medios y condiciones de prueba esta descrita en el Anexo F.4. Se utilizaron 50 μ l de sobrenadante para los bioensayos (en cada pocillo de las placas utilizadas).

3.2.2. Metodología de detección de los lazo péptidos por espectrometría de masa

Los análisis que se muestran en esta sección se realizaron en colaboración. La metodología utilizada para estos es la siguiente:

1. Se cultivaron los clones producidos heterológamente (ver Capítulo 3) en matraces con baffes de 150 ml, en 50 ml de medio GYM4 por 7 días a 130 rpm. Los cultivos se puede observar en la Figura 3.1.

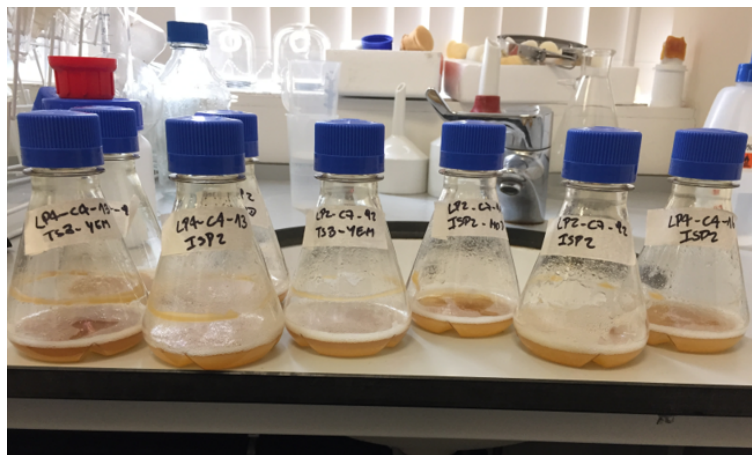


Figura 3.1:

2. Terminado el tiempo, los cultivos se centrifugan a 4600 rpm para separar el sobrenadante.
3. Al sobrenadante se le agregan 3g de beads de resina HP20 hidrofóbica por cada 50 ml de cultivo, para luego ser incubados overnight con agitación a 130 rpm.
4. Para la extracción de metabolitos, la resina fue filtrada y lavada con agua MiliQ dos veces. Posteriormente ésta fue suspendida en MeOH overnight.
5. Transcurrido este periodo, el extracto MeOH fue concentrado en vacío. Su análisis posterior fue en una dilución 50 % extracto en 50 % de agua MiliQ, en LC-MS-QTOF.

6. La biomasa obtenida en el paso 2, después de la centrifugación, fue homogeneizada y suspendida en MeOH overnight.
7. La muestra para analizar la biomasa se obtuvo filtrando la mezcla de biomasa con MeOH y luego concentrándola en vacío, para ser analizada en una dilución 50 % en LC-MS-QTOF.
8. Los resultados arrojados por el LC-MS-QTOF fueron procesados en el programa Data Analysis 4.3.

3.3. Resultados del aislamiento de los genes de lazo péptidos por expresión heteróloga

El clúster de cada lazo péptido fue aislado a través de la técnica de PCR utilizando cebadores con extremos cohesivos que luego pueden ser ligados a un vector de clonación.

Se seleccionó el vector pIJ10257 (ver Anexo B) por tener la maquinaria para poder realizar conjugación desde una cepa de *E. coli* a una de *Streptomyces* y por ser un vector integrativo en el genoma. Analizando el sitio de multiclonamiento dentro del vector (ver Anexo D) se utilizaron los sitios de restricción NdeI y HindIII como base para crear los cebadores, la elección de NdeI fue para que el gen incorporado coincida con el marco de lectura del promotor *ermE** (promotor constitutivo) y pueda regular la síntesis de los péptidos. Los cebadores utilizados se pueden ver en el Anexo C y su creación en la Sección 1

En una primera etapa se probó la metodología clonando el primer lazo péptido, cuya secuencia nucleotídica se muestra en el Anexo G.1

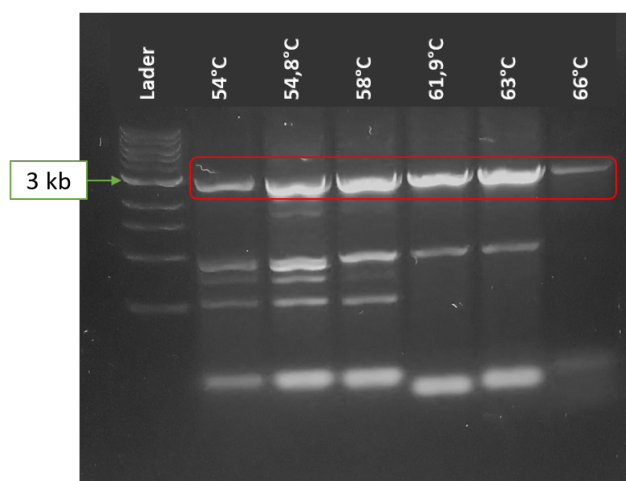


Figura 3.2: PCR en gradiente del gen de LP1 con sus cebadores específicos. Se puede observar que este PCR tiene un buen rendimiento en la mayoría de las temperaturas utilizadas y se encuentra el tamaño del cluster que corresponde a 2800 pb (banda marcada en rojo), justo bajo de la marca de los 3 kb destacada en la figura.

A partir del PCR realizado (Figura 3.2) se seleccionó 61,9°C como temperatura óptima

para el siguiente PCR y posterior purificación del fragmento. El mismo procedimiento se realizó en los otros posibles lazo péptidos, cuya PCR gradientes se muestran en la Figura 3.3.

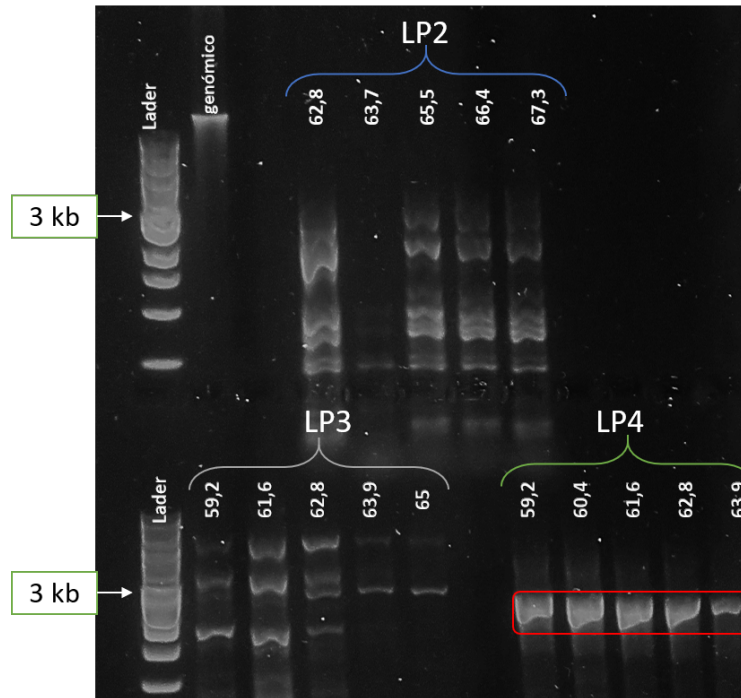


Figura 3.3: PCR en gradiente de los genes de LP2, LP3 y LP4 con sus cebadores específicos. La baja resolución del gel de agarosa se debió a la alta concentración de ADN cargado. En rojo se destaca la banda esperada de LP4.

A pesar de la resolución del gel de la Figura 3.3, se observa claramente que LP4 tiene un rendimiento bueno en todas las temperaturas probadas, por esta razón se seleccionó 61,6°C como temperatura óptima para amplificar el gen de LP4. En el caso de los lazo péptidos 2 y 3, el gel no permite visualizar claramente su corte, por esto se generó un nuevo gel, el cual se puede ver en la Figura 3.4.

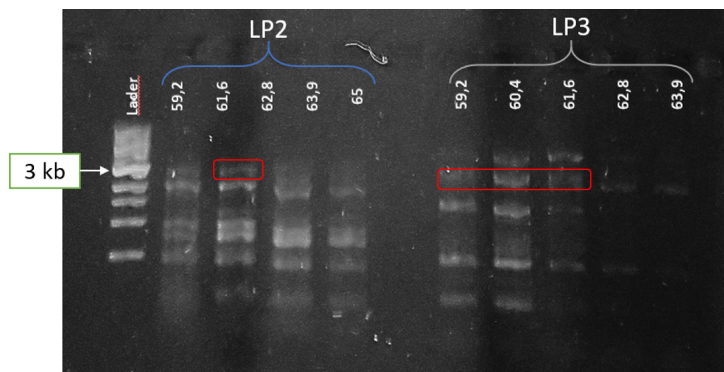


Figura 3.4: PCR gradiente LP2 y LP3 con mejor resolución del gel de agarosa. Se observa claramente la banda buscada para LP3 en este gel, pero la banda de LP2 es tenue. Ambas bandas buscadas se destacan en rojo.

Desde este nuevo gel se ve que el LP2 a 61,6°C y el LP3 a 60,4°C se puede obtener el corte

deseado, utilizando estas condiciones se obtiene el gel para purificar estos péptidos (Figura 3.5).

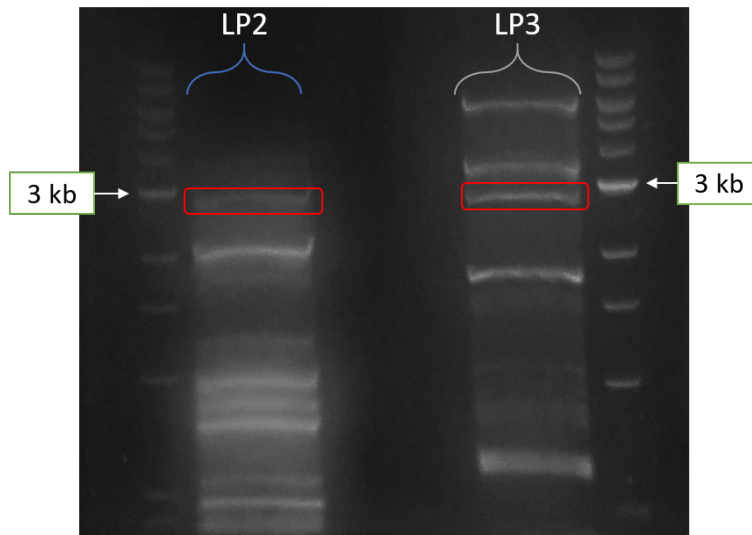


Figura 3.5: Gel para purificación de lazo péptidos 2 y 3. Se realizó un PCR con las condiciones óptimas y varias alícuotas para obtener mayor concentración de ADN final y así poder purificar eficientemente. Las bandas buscadas se encuentran destacadas en rojo.

Teniendo todos los fragmentos purificados se procedió con los pasos siguientes de digestión utilizando las enzimas de restricción seleccionadas y luego la ligación con el vector pIJ10257. Una vez ligados los vectores con el inserto se realizó una clonación de estos en *E. coli* (la representación del vector con inserto integrado se pueden encontrar en Anexo D), para el caso del lazo péptido 1 se utilizó *E. coli* DH5 α y para los lazo péptidos 2, 3 y 4 *E. coli* TOP10. Los resultados del PCR colonia utilizado para la comprobación del clonamiento de los lazo péptidos 2, 3 y 4 se ven en la Figura 3.6.

A partir de esto se seleccionaron las colonias a las cuales se les realiza miniprep y una nueva comprobación con enzimas de restricción. Las colonias finales en esta etapa son:

- LP1: colonias 9 y 14
- LP2: colonias 3 y 7
- LP3: colonias 3 y 4
- LP4: colonias 4 y 5

A los vectores purificados a través de miniprep de todas estas colonias se les realizó una secuenciación del inserto utilizando los primers GBA001 y GBA002 (ver secuencia en Anexo C), esta secuenciación se demoró más de lo previsto, por esta razón se continuó con el resto de las etapas con todos los clones a pesar de no tener certeza de la secuencia nucleotídica de estos.

Al tener aislados los genes se procedió al traspaso de éstos a un super hospedero de *Streptomyces* en este caso se utilizó *S. coelicolor* M1152 y M1154 (ver Anexo A) cuya principal característica es tener deletados los principales genes de producción de metabolitos secundarios propios (Gomez-Escribano and Bibb, 2011).

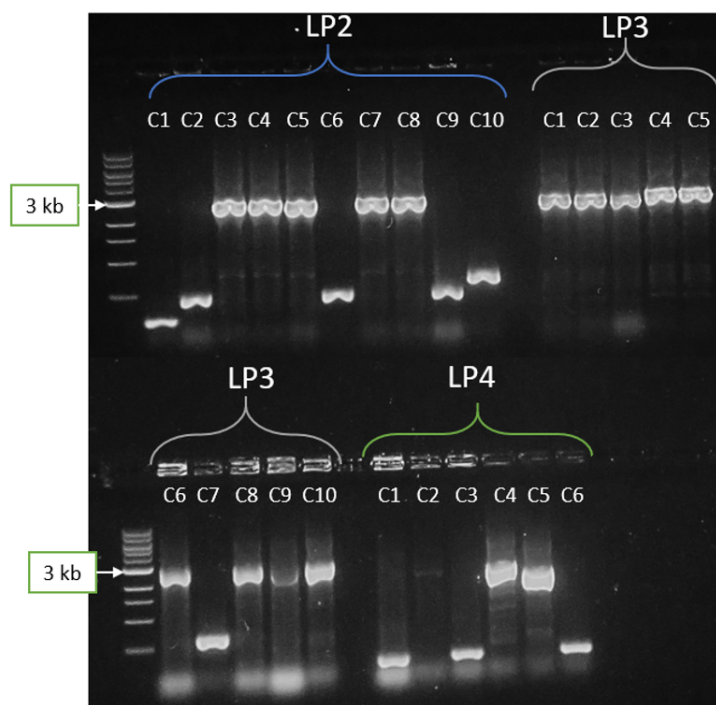


Figura 3.6: Comprobación de ligación y transformación en clones de *E. coli* TOP10. Para esta comprobación se utilizaron los cebadores GBA001 y GBA002. Se obtuvieron varios clones de LP2 y LP3, no así de LP4 en que solo se obtuvieron dos posibles clones.

Antes de realizar la conjugación, primero se debe incorporar el vector con el inserto dentro de las células *E. coli* ETZ, las cuales tienen la maquinaria necesaria para la conjugación entre *E. coli* y *Streptomyces*.

Igual que para la primera clonación se comprueba a través de PCR de colonia con los mismos primers utilizados anteriormente (GBA001 y GBA002). Los resultados para los lazo péptidos 2.3 y 4 se pueden ver en la Figura 3.7.

Por último se ejecuta la conjugación, este procedimiento está optimizado y es eficiente, esto se realiza para que el clúster quede integrado en el genoma del microorganismo huésped, así se asegura que el huésped no elimine el ADN externo y al momento de la producción del metabolito se pueda utilizar la maquinaria propia del organismo huésped que en este caso es de la misma especie que el organismo original, asumiendo con esto que su maquinaria de producción de proteínas es muy similar (Baltz, 2010; Bekiesch et al., 2016).

Al terminar esta etapa y evaluar la producción heteróloga de los péptidos se recibieron los resultados de secuenciación, arrojando que los clones de LP1 y LP3 tienen la secuencia nucleotídica consistente con la que se está buscando, no así los clones analizados de LP2 y LP4. Por esta razón se tomaron los clones de LP1 y LP3 para extraer su ADN genómico y desde éste comprobar si el clúster se insertó en el genoma de la bacteria (Figura 3.8).

Claramente en la Figura 3.8 se comprueba que las secuencias de los lazo péptidos 1 y 3 están en el ADN genómico de huésped.

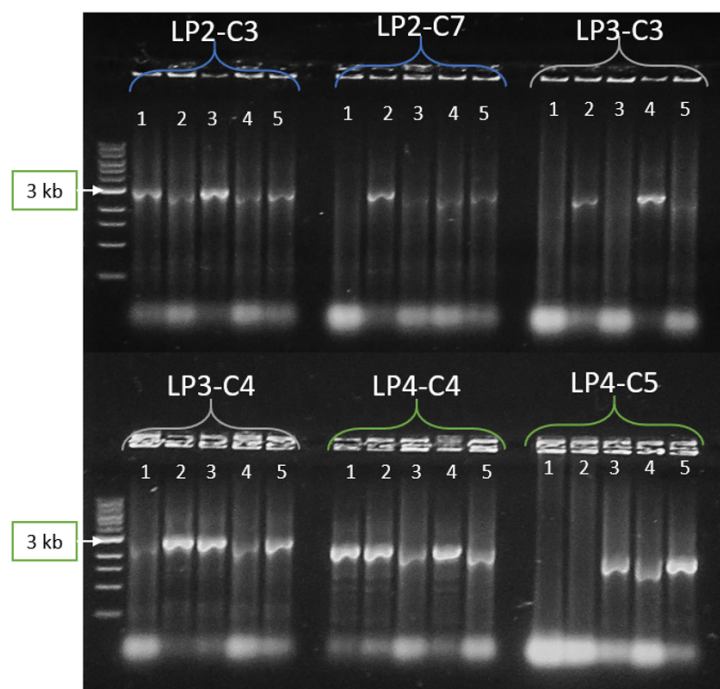


Figura 3.7: Comprobación de clonamiento del vector en células *E. coli* EZT. Fueron utilizados los cebadores GBA001 y GBA002

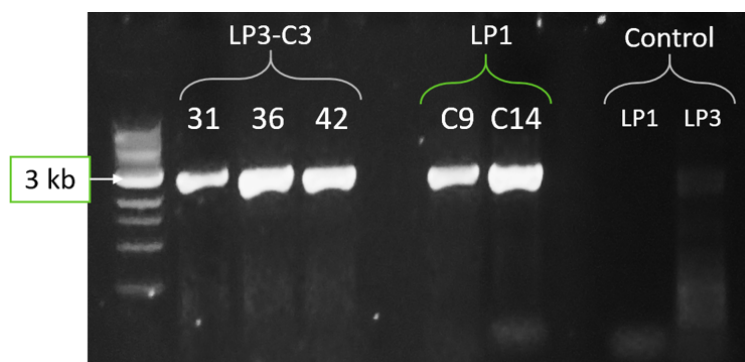


Figura 3.8: Comprobación de conjugación en *Streptomyces coelicolor*. PCR realizado sobre ADN genómico de los clones, el control utilizado es el PCR sobre ADN genómico de *S. coelicolor* M1152, Los cebadores utilizados fueron AN01-f1 y AN01-r1 para LP1; AN03-f y AN03-r1 para LP3.

3.4. Bioensayos de los clones heterólogos de lazo péptidos obtenidos

Los bioensayos fueron realizados antes de la comprobación con espectrometría de masa de la presencia del péptido y antes de la secuenciación, por esta razón se utilizaron todos los clones obtenidos.

El primer ensayo fue contra *B. subtilis* (figura 3.9), donde fueron probados solo los ex-

tractos de LP1 incluyendo clones de *S. coelicolor* M1152 y M1154, como control negativo se utilizan las cepas de *S. coelicolor* no mutadas y como control positivo el antibiótico higromicina B, al cual los clones son resistentes.

La Figura 3.9 arroja que LP1 no produce ningún halo de inhibición, siendo la prueba realizada tanto con cultivo homogeneizado y sobrenadante del cultivo.

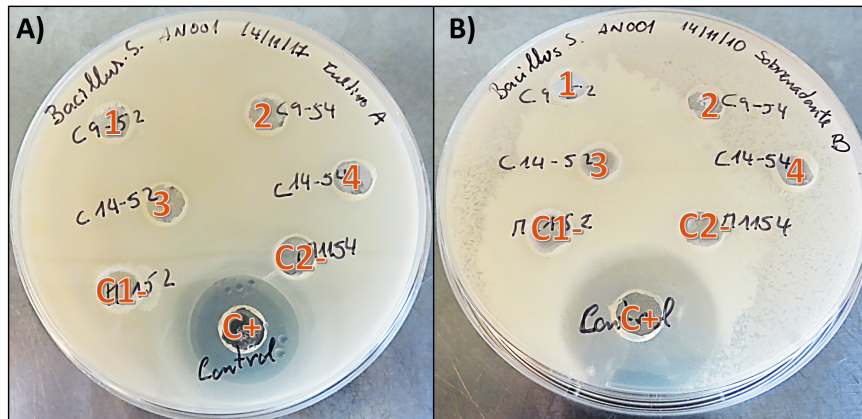


Figura 3.9: Bioensayos de los clones de lazo péptido contra *Bacillus subtilis*. Cultivo de estos clones fue realizado en medio TBS-YEME (50/50) **A)** bioensayos con pellet de cultivo homogeneizado, **B)** bioensayos con sobrenadante del cultivo, los pocillos marcados contienen muestras de: **1.** clon 9 de LP1 en *S. coelicolor* M1152, **2.** clon 9 de LP1 en *S. coelicolor* M1154, **3.** clon 14 de LP1 en *S. coelicolor* M1152, **4.** clon 14 de LP1 en *S. coelicolor* M1154, **C1-** *S. coelicolor* M1152 como control negativo, **C2-** *S. coelicolor* M1154 como control negativo y **C+** control positivo con antibiótico higromicina B.

El segundo bioensayo probado fue contra *M. luteus*, en esta ocasión se utilizaron clones de los cuatro lazo péptidos en super hospedero *S. coelicolor* M1152, como control negativo se usó el hospedero sin transformar y como control positivo se utilizó el extracto crudo de *S. leeuwenhoekii* C34. Los resultados de este experimento se pueden ver en la Figura 3.10. Se observó que las posiciones 3 y 8 que contienen muestras de los clones LP2 y LP4 respectivamente, presentan halos de inhibición. Este resultado es incongruente con la secuenciación posterior realizada a las cepas, ya que estos clones no contenían los insertos deseados, por esta razón se realizó un cultivo control de los sobrenadantes utilizados y estos arrojaron una contaminación similar morfológicamente a *Serratia marcescens* contaminante común de cultivos (Hejazi and Falkiner, 1997; Wilfert et al., 1970). Los demás sobrenadantes no presentaron contaminación. Se puede concluir que los organismos probados no tienen actividad contra *M. luteus*.

Por último se ejecutaron ensayos de actividad contra 10 cepas de hongos patógenos para plantas (cuya lista se puede ver en Anexo A). La Figura 3.11 es un ejemplo de la primera corrida de ensayos elaborada solo con clones de LP1, esta imagen muestra particularmente los resultados sobre *Aspergillus niger*. En estos experimentos el control negativo fueron los hospederos sin transformar y el control positivo el antifúngico nistatina. Como se puede advertir esta prueba no arrojó actividad antifúngica del LP1, este resultado fue igual para todas las cepas de hongos testeadas.

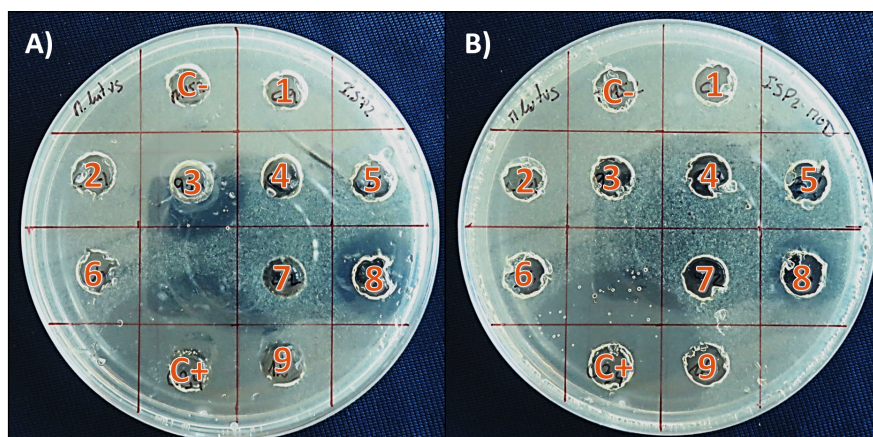


Figura 3.10: Bioensayos de los clones de lazo péptido contra *Micrococcus luteus*. Los clones probados en este experimento son solo de *S. coelicolor* M1152. **A)** bioensayos de clones cultivados en medio ISP2, **B)** bioensayos de clones cultivados en medio ISP2 modificado, los pocillos marcados contienen muestras de: **1.** clon 9 de LP1, **2.** clon 14 de LP1, **3.** clon 7-91 de LP2, **4.** clon 7-92 de LP2, **5.** clon 3-31 de LP3, **6.** clon 3-36 de LP3, **7.** clon 3-42 LP3, **8.** clon 4-13 LP4, **9.** clon 4-16 LP4, **C-** *S. coelicolor* M1152 como control negativo y **C+** control positivo con *S. leeuwenhoekii* C34.

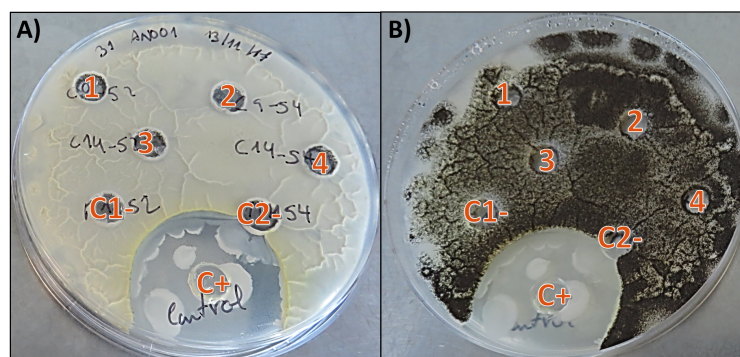


Figura 3.11: Bioensayos de los clones de lazo péptido contra *Aspergillus niger*. Cultivo de estos clones fue realizado en medio TBS-YEME (50/50), de donde se utilizó el sobrenadante **A)** vista inferior placa, **B)** vista superior placa, los pocillos marcados contienen muestras de: **1.** clon 9 de LP1 en *S. coelicolor* M1152, **2.** clon 9 de LP1 en *S. coelicolor* M1154, **3.** clon 14 de LP1 en *S. coelicolor* M1152, **4.** clon 14 de LP1 en *S. coelicolor* M1154, **C1-** *S. coelicolor* M1152 como control negativo, **C2-** *S. coelicolor* M1154 como control negativo y **C+** control positivo con antifúngico nistatina.

En la Figura 3.12 se muestra uno de los casos examinados para la actividad sobre el hongo *Alternaria alternata*. Los sobrenadantes utilizados aquí fueron los mismos que para *M. luteus* (Figura 3.10), por esta razón se observan inhibiciones en las posiciones 3 y 8 nuevamente, sabiendo que esto es debido a la contaminación presentada en los cultivos y descrita anteriormente. El resultado para este ensayo y los demás ensayos ejecutados contra hongos es negativo, ninguno de los lazo péptidos presenta actividad antifúngica.

Los resultados anteriores arrojan que los extractos no tiene actividad antibiótica ni an-

tifúngica bajo las condiciones evaluadas. Puede que no se este produciendo el péptido por falta de alguna molécula en la vía sintética o porque las enzimas que modifican el péptido no se producen o su producción es deficiente (Bekiesch et al., 2016; Wenzel and Müller, 2005). Como método de comprobación de estas hipótesis se propone probar los clones de LP1 y LP3 bajo condiciones diferentes, es decir, utilizando otro medio de cultivo, o alguna modificación a los medios utilizados (lo que será discutido en la sección siguiente).

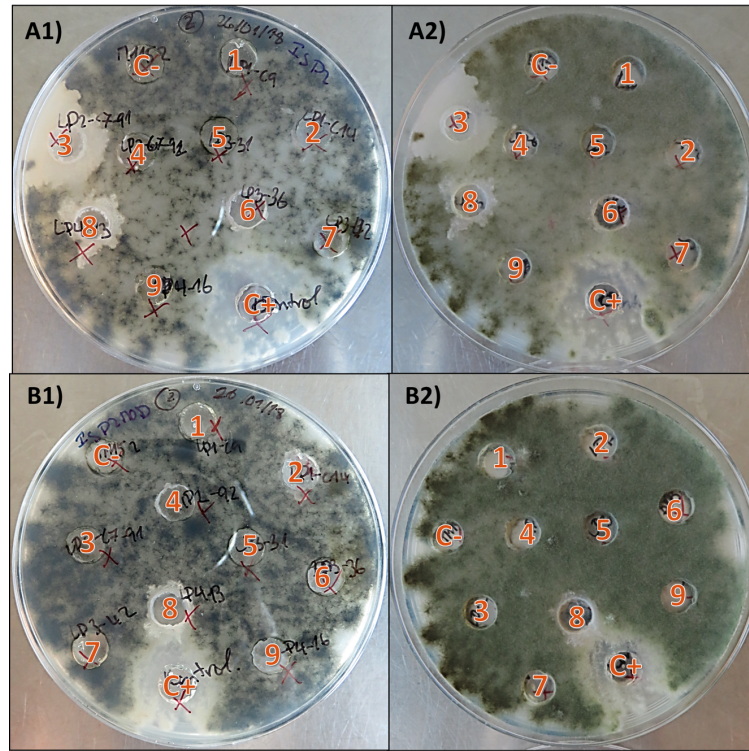


Figura 3.12: Bioensayos de los clones de lazo péptido contra el hongo *Alternaria alternata*. Los clones probados en este experimento son solo de *S. coelicolor* M1152, donde fueron probados solo los sobrenadantes. **A1)** bioensayos de clones cultivados en medio ISP2 vista inferior placa, **A2)** bioensayos de clones cultivados en medio ISP2 vista superior placa, **B1)** bioensayos de clones cultivados en medio ISP2 vista inferior placa, **B2)** bioensayos de clones cultivados en medio ISP2 vista superior placa, los pocillos marcados contienen muestras de: **1.** clon 9 de LP1, **2.** clon 14 de LP1, **3.** clon 7-91 de LP2, **4.** clon 7-92 de LP2, **5.** clon 3-31 de LP3, **6.** clon 3-36 de LP3, **7.** clon 3-42 LP3, **8.** clon 4-13 LP4, **9.** clon 4-16 LP4, **C-** *S. coelicolor* M1152 como control negativo y **C+** control positivo con antifúngico nistatina.

3.5. Experimentos de detección de lazo péptidos por espectrometría de masa

Para el procesamiento de los resultados arrojados por el LC-MS-QTOF se utiliza la búsqueda específica de los estados de ionización teóricos de cada lazo péptido. Estas ionizaciones se presentan en la Tabla 3.1 donde para los péptidos LP1, LP2 y LP3 se busca el estado completo de ionización y para el LP4 se busca uno trucado debido al largo de este.

Tabla 3.1: Estados de ionización esperados para cada lazo péptido.

	Secuencia	Estado	M (-H ₂ O)	M+H	M+2H
LP1	DRGTWGWDDYNECWVWLG	Completa	2242,87	2243,87	1132,21
LP2	LLQRSGNDRLLILSKN	Completa	1707	1708	855
LP3	GYGNAWDSKNGLF	Completa	1409,65	1410,65	705,83
LP4	GFPQGSWPDNDTVWPWYGAGAAQG	Truncada	2545,12	2546,13	1273,57

Los espectros obtenidos para LP1 fueron contrastados con espectros de la cepa *Streptomyces* sp. HST28 (cepa nativa del lazo péptido) con el objetivo de comprobar una sobre expresión del péptido.

Los resultados para ambos análisis no fueron favorables, no se encontraron los estados de ionización deseados en ninguno de los espectros. Al no encontrar la molécula en la cepa nativa se puede suponer que este clúster en particular puede no expresarse dentro de la célula, por esto se procedió a realizar su clonamiento heterólogo.

Examinando ahora los extractos obtenidos a partir de los clones de LP1 (clones 9 y 14), en ellos tampoco se encontraron las moléculas deseadas, comparando con la cepa nativa se pueden suponer que por ser un clúster que no se expresa este necesita algún metabolito activador que no se encontraba presente en el medio de cultivo. Con la finalidad de comprobar esta hipótesis se propone modificar las condiciones de cultivo, principalmente cambiar o alterar el medio de cultivo (Bekiesch et al., 2016; Bilyk and Luzhetskyy, 2016; Ren et al., 2017).

Algunas de las modificaciones posibles para la no expresión del péptido heterólogo probadas en otras investigaciones son (Bekiesch et al., 2016; Terpe, 2006):

- Disminuir o modificar la temperatura de cultivo para provocar un estrés en la célula y promover la producción de metabolitos secundarios, esto también podría aplicarse en la cepa nativa.
- Utilizar un promotor regulado en vez de constitutivo, así se tendría el control de la expresión del clúster. Esta estrategia en particular no asegura la producción del péptido ya que el problema puede estar dentro del metabolismo del organismo.
- Si el problema está dentro del metabolismo, puede ser necesario la incorporación de un agente activador de las enzimas que modifican el péptido.

Si estas modificaciones al clonamiento heterólogo no dan resultado, se propone tomar como estrategia la activación del clúster directamente en la cepa nativa (*Streptomyces* sp. HST28),

para esto se pueden utilizar técnicas como CRISPR-Cas9 *knock-in* que fuerza la expresión de genes (Zhang et al., 2017) o sobre-expresando genes activadores atípicos siendo necesario el estudio mas a fondo del flujo metabólico de la célula (Li et al., 2017; Ren et al., 2017), siendo algunos ejemplos.

3.6. Conclusiones

1. El clonamiento heterólogo fue realizado en *Streptomyces coelicolor* M1152 y M1154 para los cuatro lazo péptidos, siendo exitoso solo en dos de ellos, LP1 y LP3. LP2 y LP4 no fueron clonados.
2. Las pruebas de actividad en que se probaron los sobrenadantes de cultivos líquidos de *S. coelicolor* M1152 y M1154 portando vectores con los clúster de lazo péptidos fueron negativas contra todos los organismos testeados.
3. No fue posible la detección de LP1 por espectrometría de masa. Un trabajo a futuro sería comprobar si LP3 puede ser detectado con este método.

Conclusiones generales y proyecciones

Esta tesis tuvo por objetivo encontrar, expresar y caracterizar estructural y funcionalmente los lazo péptidos presentes en el genoma de *Streptomyces* sp. HST28.

Considerando los antecedentes presentados anteriormente, el estudio de lazo péptidos se ve como una alternativa prometedora para el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos en diferentes áreas.

Para lograr el objetivo principal, primero se detectaron y reconstruyeron bioinformáticamente los clústers de genes de lazo péptidos del genoma de *Streptomyces* sp. HST28. Particularmente se localizaron cuatro nuevos lazo péptidos (LP1, LP2, LP3 y LP4), uno de clase III (LP1) y tres de clase II (LP2, LP3 y LP4). Luego se estudió la organización de sus clústers. LP4 presentó una anomalía en la configuración del clúster, con respecto a los encontrados en bibliografía, esto podría indicar que este clúster no corresponde a un lazo péptido, por esta razón si su clonamiento heterólogo fuera exitoso, sería interesante realizar un estudio a futuro sobre las enzimas de biosíntesis del péptido. La organización de los clústers en los lazo péptidos restantes, coincidían con las de otros lazo péptidos de *Streptomyces*, tomando como ejemplo el clúster de Chaxapeptina (Elsayed et al., 2015).

Una vez establecida la secuencia aminoacídica de los péptidos se crearon modelos *in silico* de sus estructuras tridimensionales, las cuales fueron analizadas exitosamente. La creación de los modelos fue posible gracias a la implementación de criterios de alineamiento de secuencias y similitudes estructurales de lazo péptidos reportados en la plataforma Protein Data Bank (Berman et al., 2000; Rose et al., 2017). La validación de los modelos fue realizada a través del análisis de sus residuos en el gráfico de Ramachandran de donde se encontraron pequeños problemas estructurales en los ángulos de algunos residuos, a pesar de esto los modelos se encuentran dentro del rango aceptable. El avance obtenido en este punto abre la posibilidad del estudio *in silico* de este tipo de péptidos.

El cálculo del potencial electrostático de los modelos permitió su comparación con determinados templados estableciendo diferencias y semejanzas. Se determinó que LP3 fue el péptido con mas similitudes, el cual podría tener mayor probabilidad de presentar algún tipo de actividad antimicrobiana o antibiótica comparado con los demás modelos y lazo péptidos estudiados en esta investigación. Este tipo de análisis basado en interacciones electrostáticas con otras moléculas, abre la posibilidad de crear una clasificación para los lazo péptidos que facilitaría la determinación teórica de la actividad de nuevos péptidos. Como trabajo futuro se propone el análisis del campo electrostático de todas las estructuras de lazo péptidos reportadas, para tener una base de datos espacial y así poder utilizarla como parámetro de

comparación en la implementación de nuevos modelos.

Como segundo objetivo se buscó clonar heterológamente los clústers encontrados, solo dos de los cuatro clústers de lazo péptidos fueron clonados exitosamente, LP1 y LP3. Los clones de LP1 fueron cultivados para determinar la expresión del péptido por espectrometría de masa, los resultados de este fueron negativos, no encontrándose el péptido en el cultivo. Teniendo en cuenta los resultados experimentales negativos se determinaron alternativas para el clonamiento y producción de los péptidos como por ejemplo considerar otras formas de clonamiento utilizando técnicas más efectivas como el gibson assembly que posee la capacidad de clonar fragmentos más grandes de ADN (Gibson et al., 2009; Li et al., 2011; Thomas et al., 2015). Por otra parte para LP1 es necesario implementar diferentes condiciones de cultivo con la finalidad de promover su expresión. Se ha estudiado que algunos metabolitos del huésped pueden estar interfiriendo en la producción del péptido o por otra parte el promotor no es compatible con el clúster (Bekiesch et al., 2016; Ren et al., 2017). En el caso de LP3 primero se deben examinar los cultivos de sus clones por espectrometría de masa, así se confirmará o descartará su producción, en el caso de no encontrarse el péptido se pueden implementar las mismas medidas que para LP1.

A través de esta tesis se realizó un importante aporte para la investigación de lazo péptidos y un avance en la implementación de metodologías computacionales para su estudio, esto a pesar de no cumplir satisfactoriamente con todos los objetivos planteados. Por esto se deja abierta la posibilidad de desarrollar a fondo estos temas y promover la implementación de investigaciones *in silico* futuras.

Bibliografía

- Allen, C. D., Chen, M. Y., Trick, A. Y., Le, D. T., Ferguson, A. L., and Link, A. J. (2016). Thermal unthreading of the lasso peptides astexin-2 and astexin-3. *ACS Chemical Biology*, 11(11):3043–3051.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3):403–410.
- Avignone-Rossa, C., Kierzek, A. M., and Bushell, M. E. (2013). Secondary Metabolite Production in *Streptomyces*. In *Encyclopedia of Systems Biology*, pages 1903–1913. Springer New York, New York, NY.
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E. M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G. J., Olson, R., Osterman, A. L., Overbeek, R. A., McNeil, L. K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G. D., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A., and Zagnitko, O. (2008). The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics*, 9(1):75.
- Bachmann, B. O., Van Lanen, S. G., and Baltz, R. H. (2014). Microbial genome mining for accelerated natural products discovery: Is a renaissance in the making? *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(2):175–184.
- Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J., and McCammon, J. A. (2001). Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(18):10037–10041.
- Baltz, R. H. (2010). *Streptomyces* and *Saccharopolyspora* hosts for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37(8):759–772.
- Bekiesch, P., Basitta, P., and Apel, A. K. (2016). Challenges in the Heterologous Production of Antibiotics in *Streptomyces*. *Archiv der Pharmazie*, pages 594–601.
- Benchling (2018). Software biológico.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., and Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1):235–242.

- Bibb, M. J. (2005). Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Current Opinion in Microbiology*, 8(2):208–215.
- Bilyk, O. and Luzhetskyy, A. (2016). Metabolic engineering of natural product biosynthesis in actinobacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 42:98–107.
- Blin, K., Medema, M. H., Kazempour, D., Fischbach, M. A., Breitling, R., Takano, E., and Weber, T. (2013). antiSMASH 2.0—a versatile platform for genome mining of secondary metabolite producers. *Nucleic Acids Research*, 41(W1):W204–W212.
- Brettin, T., Davis, J. J., Disz, T., Edwards, R. A., Gerdes, S., Olsen, G. J., Olson, R., Overbeek, R., Parrello, B., Pusch, G. D., Shukla, M., Thomason, J. A., Stevens, R., Vonstein, V., Wattam, A. R., and Xia, F. (2015). RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Scientific Reports*, 5(1):8365.
- Castro Figueroa, J. F. (2015). *Identification of the chaxamycin an chaxalacyin biosynthesis genes through genome mining of Streptomyces leeuwenhoekii C34 and heterologous production of chaxamycins in Streptomyces coelicolor M1152*. Tesis para optar al grado de doctor en ciencias de la ingeniería, mención ingeniería química y biotecnología, Universidad de Chile.
- Cheeseright, T. and Mackey, M. D. (2015). Improving new molecule design using electrostatics. page 7448.
- Chen, B.-H., Chuang, C.-H., Chang, S. C., Tsau, F.-H., Jeng, M.-s., and Chen, C.-K. (2009). *Molecular Dynamics Simulation*, volume 8.
- Corre, C. and Challis, G. L. (2009). New natural product biosynthetic chemistry discovered by genome mining. *Natural Product Reports*, 26(8):977.
- Cortés, C. (2014). *Aislamiento de Streptomyces desde Salares del Desierto de Atacama productores de sustancias bioactivas*. Informe de memoria para optar al título de biotecnólogo, Universidad de Antofagasta.
- Cortés, C. and Dorador, C. (2017). Diversity and bioactive potential of Streptomyces strains from the Salar de Huasco, a polyextreme high altitude ecosystem in northern Chile. *Frontiers*, page in press.
- Cuff, J. A. and Barton, G. J. (2000). Application of multiple sequence alignment profiles to improve protein secondary structure prediction. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 40(March):502–511.
- Demain, A. L. and Fang, A. (2000). The Natural Functions of Secondary Metabolites. In Scheper, T., editor, *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, pages 1–39. Springer, Berlin, Heidelberg, Cambridge, USA.
- Devos, D. and Valencia, a. (2000). Practical limits of functional prediction. *Proteins*, 41(February):98–107.

- Dolinsky, T. J., Czodrowski, P., Li, H., Nielsen, J. E., Jensen, J. H., Klebe, G., and Baker, N. A. (2007). PDB2PQR: Expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations. *Nucleic Acids Research*, 35(SUPPL.2):522–525.
- Dolinsky, T. J., Nielsen, J. E., McCammon, J. A., and Baker, N. A. (2004). PDB2PQR: An automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Research*, 32(WEB SERVER ISS.):665–667.
- Elsayed, S. S., Trusch, F., Deng, H., Raab, A., Prokes, I., Busarakam, K., Asenjo, J. A., Andrews, B. A., Van West, P., Bull, A. T., Goodfellow, M., Yi, Y., Ebel, R., Jaspars, M., Rateb, M. E., West, P. V., Bull, A. T., Goodfellow, M., Yi, Y., Ebel, R., Jaspars, M., and Rateb, M. E. (2015). Chaxapeptin, a Lasso Peptide from Extremotolerant *Streptomyces leeuwenhoekii* Strain C58 from the Hyperarid Atacama Desert. *Journal of Organic Chemistry*, 80(20):10252–10260.
- Fage, C. D., Hegemann, J. D., Nebel, A. J., Steinbach, R. M., Zhu, S., Linne, U., Harms, K., Bange, G., and Marahiel, M. A. (2016). Structure and Mechanism of the Sphingopyxin I Lasso Peptide Isopeptidase. *Angewandte Chemie - International Edition*, 55(41):12717–12721.
- Finkelstein, A. V. and Ptitsyn, O. B. (2016). *Protein Physics: A Course of Lectures*. Elsevier, second, up edition.
- Fiser, A. (2017). Comparative Protein Structure Modelling. In *From Protein Structure to Function with Bioinformatics*, pages 91–134. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Fiser, A., Do, R. K., and Sali, A. (2000). Modeling of loops in protein structures. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 9(9):1753–73.
- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., and Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 6(5):343–345.
- Gomez-Escribano, J. P. and Bibb, M. J. (2011). Engineering *Streptomyces coelicolor* for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *Microbial Biotechnology*, 4(2):207–215.
- Gomez-Escribano, J. P. and Bibb, M. J. (2013). Heterologous expression of natural product biosynthetic gene clusters in *Streptomyces coelicolor*: From genome mining to manipulation of biosynthetic pathways. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(2):425–431.
- Grant, S. G., Jessee, J., Bloom, F. R., and Hanahan, D. (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12):4645–4649.
- Hegemann, J. D., De Simone, M., Zimmermann, M., Knappe, T. A., Xie, X., Di Leva, F. S., Marinelli, L., Novellino, E., Zahler, S., Kessler, H., and Marahiel, M. A. (2014a). Rational Improvement of the Affinity and Selectivity of Integrin Binding of Grafted Lasso Peptides.

Journal of Medicinal Chemistry, 57(13):5829–5834.

- Hegemann, J. D., Fage, C. D., Zhu, S., Harms, K., Di Leva, F. S., Novellino, E., Marinelli, L., Marahiel, M. A., Zahler, S., Kessler, H., Marahiel, M. A., Akopian, T., Mueller, A., Epstein, S., Goldberg, A., Clardy, J., and Lewis, K. (2016). The ring residue proline 8 is crucial for the thermal stability of the lasso peptide caulosegnin II. *Mol. BioSyst.*, 12(4):1106–1109.
- Hegemann, J. D., Zimmermann, M., Xie, X., and Marahiel, M. A. (2013). Caulosegnins I–III: A Highly Diverse Group of Lasso Peptides Derived from a Single Biosynthetic Gene Cluster. *Journal of the American Chemical Society*, 135(1):210–222.
- Hegemann, J. D., Zimmermann, M., Xie, X., and Marahiel, M. A. (2015). Lasso Peptides: An Intriguing Class of Bacterial Natural Products. *Accounts of Chemical Research*, 48(7):1909–1919.
- Hegemann, J. D., Zimmermann, M., Zhu, S., Steuber, H., Harms, K., Xie, X., and Marahiel, M. A. (2014b). Xanthomonins I–III: A New Class of Lasso Peptides with a Seven-Residue Macrolactam Ring. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(8):2230–2234.
- Hein, E. O. (2017). El reto de la resistencia a los antibióticos en México y el mundo. *Boletín del Centro Colaborador en Calidad y Seguridad del Paciente CONAMED - OMS/OPS*, 2(11).
- Hejazi, A. and Falkiner, F. (1997). *Serratia marcescens*. *Microbes*, 46:903–912.
- Helynck, G., Dubertret, C., Mayaux, J. F., and Le Boul, J. (1993). Isolation of RP 71955, a new anti-HIV-1 peptide secondary metabolite. *The Journal of antibiotics*, 46(11):1756–7.
- Hobbs, G., Frazer, C. M., Gardner, D. C., Cullum, J. A., and Oliver, S. G. (1989). Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31(3):272–277.
- Hodgson, D. A. (2000). Primary metabolism and its control in streptomycetes: A most unusual group of bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 42:47–238.
- Jeanne Dit Fouque, K., Lavanant, H., Zirah, S., Hegemann, J. D., Fage, C. D., Marahiel, M. A., Rebuffat, S., and Afonso, C. (2018). General rules of fragmentation evidencing lasso structures in CID and ETD. *The Analyst*, 6:1157–1170.
- Karplus, M. and McCammon, J. A. (2002). Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nature Structural Biology*, 9(9):646–652.
- Kaweewan, I., Ohnishi-Kameyama, M., and Kodani, S. (2017). Isolation of a new antibacterial peptide achromosin from *Streptomyces achromogenes* subsp. *achromogenes* based on genome mining. *Journal of Antibiotics*, 70(2):208–211.
- Kersten, R. R. D. R., Yang, Y.-L. Y., Xu, Y., Cimermancic, P., Nam, S.-J., Fenical, W., Fischbach, M. A., Moore, B. S., and Dorrestein, P. C. (2011). A mass spectrometry-guided genome mining approach for natural product peptidogenomics. *Nature chemical . . .*, 7(11):794–

- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., and Hopwood, D. A. (2000). *Practical Streptomyces Genetics*. John Innes Foundation, Norwich, UK.
- Knappe, T. A., Linne, U., Xie, X., and Marahiel, M. A. (2010). The glucagon receptor antagonist BI-32169 constitutes a new class of lasso peptides. *FEBS Letters*, 584(4):785–789.
- Knappe, T. A., Manzenrieder, F., Mas-Moruno, C., Linne, U., Sasse, F., Kessler, H., Xie, X., and Marahiel, M. A. (2011). Introducing Lasso Peptides as Molecular Scaffolds for Drug Design: Engineering of an Integrin Antagonist. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(37):8714–8717.
- Kodani, S., Inoue, Y., Suzuki, M., Dohra, H., Suzuki, T., Hemmi, H., and Ohnishi-Kameyama, M. (2017). Sphaericin, a Lasso Peptide from the Rare Actinomycete *Planomonospora sphaerica*. *European Journal of Organic Chemistry*, 2017(8):1177–1183.
- Kuroha, M., Hemmi, H., Ohnishi-Kameyama, M., and Kodani, S. (2017). Isolation and structure determination of a new lasso peptide subterisin from *Sphingomonas subterranea*. *Tetrahedron Letters*, 58(35):3429–3432.
- Li, H., Robertson, A. D., and Jensen, J. H. (2005). Very fast empirical prediction and rationalization of protein pK_a values. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 61(4):704–721.
- Li, L., Jiang, W., and Lu, Y. (2011). A Modified Gibson Assembly Method for Cloning Large DNA Fragments with High GC Contents. 1671(1):257–300.
- Li, L., Jiang, W., and Lu, Y. (2017). New strategies and approaches for engineering biosynthetic gene clusters of microbial natural products. *Biotechnology Advances*, 35(8):936–949.
- Li, Y., Ducasse, R., Zirah, S., Blond, A., Goulard, C., Lescop, E., Giraud, C., Hartke, A., Guittet, E., Pernodet, J.-l. L., Rebuffat, S., Kersten, R. D. R., Yang, Y.-L. Y., Xu, Y., Cimermanic, P., Nam, S.-J., Fenical, W., Fischbach, M. A., Moore, B. S., and Dorrestein, P. C. (2015a). Characterization of Svceucin from *Streptomyces* Provides Insight into Enzyme Exchangeability and Disulfide Bond Formation in Lasso Peptides. *ACS Chemical Biology*, 10(11):2641–2649.
- Li, Y., Zirah, S., and Rebuffat, S. (2015b). *Lasso Peptides Bacterial Strategies to Make and Maintain Bioactive Entangled Scaffolds*. Springer, London.
- Lovell, S., Davis, I., Arendall III, W., de Bakker, P., Word, J., Prisant, M., Richardson, J., and Richardson, D. (2002). Structure validation by C α geometry: phi,psi and C β deviation. *Proteins: Structure, Function & Genetics*, 50:437–450.
- MacNeil, D. J., Gewain, K. M., Ruby, C. L., Dezeny, G., Gibbons, P. H., and MacNeil, T. (1992). Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene*, 111(1):61–68.

- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., and Stahl, D. A. (2015). *Brock Biology of Microorganisms*. Number 1. Pearson, Illinois, 14th editi edition.
- Maksimov, M. O., Koos, J. D., Zong, C., Lisko, B., and James Link, A. (2015). Elucidating the specificity determinants of the AtxE2 lasso peptide isopeptidase. *Journal of Biological Chemistry*, 290(52):30806–30812.
- Maksimov, M. O. and Link, A. J. (2013). Discovery and characterization of an isopeptidase that linearizes lasso peptides. *Journal of the American Chemical Society*, 135(32):12038–12047.
- Maksimov, M. O., Pan, J., and Link, A. J. (2012a). Lasso peptides: structure, function, biosynthesis, and engineering. *The Royal Society of Chemistry*.
- Maksimov, M. O., Pelczer, I., and Link, A. J. (2012b). Precursor-centric genome-mining approach for lasso peptide discovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(38):15223–15228.
- Martí-Renom, M. A., Stuart, A. C., Fiser, A., Sánchez, R., Melo, F., and Šali, A. (2000). Comparative Protein Structure Modeling of Genes and Genomes. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 29(1):291–325.
- Matthews, B. W. and Acids, N. A. (2001). Hydrophobic Interactions in Proteins. *Life Sciences*.
- Medema, M. H., Blin, K., Cimermanic, P., de Jager, V., Zakrzewski, P., Fischbach, M. A., Weber, T., Takano, E., and Breitling, R. (2011). antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Research*, 39(suppl_2):W339–W346.
- Metlev, M., Arseniev, A., Bushin, L. B., Kuznedelov, K., Artamonova, T. O., Kondratenko, R., Khodorkovskii, M., Seyedsayamdost, M. R., and Severinov, K. (2017). Acinetodin and Klebsidin, RNA Polymerase Targeting Lasso Peptides Produced by Human Isolates of *Acinetobacter gyllenbergii* and *Klebsiella pneumoniae*. *ACS Chemical Biology*, 12(3):814–824.
- Metlev, M., Tietz, J. I., Melby, J. O., Blair, P. M., Zhu, L., Livnat, I., Severinov, K., and Mitchell, D. A. (2015). Structure, Bioactivity, and Resistance Mechanism of Streptomycin, an Unusual Lasso Peptide from an Understudied Halophilic Actinomycete. *Chemistry & Biology*, 22(2):241–250.
- Mo Bio Laboratories, I. (2010). UltraClean ® Microbial DNA Isolation Kit.
- Morishita, Y., Chiba, S., Tsukuda, E., Tanaka, T., Ogawa, T., Yamasaki, M., Yoshida, M., Kawamoto, I., and Matsuda, Y. (1994). RES-701-1, a novel and selective endothelin type B receptor antagonist produced by *Streptomyces* sp. RE-701. I. Characterization of producing strain, fermentation, isolation, physico-chemical and biological properties. *The Journal of antibiotics*, 47(3):269–275.

- Nar, H., Schmid, A., Puder, C., and Potterat, O. (2010). High-Resolution Crystal Structure of a Lasso Peptide. *ChemMedChem*, 5(10):1689–1692.
- Nett, M., Ikeda, H., and Moore, B. S. (2009). Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Natural Product Reports*, 26(11):1362.
- Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G. D., Olsen, G. J., Davis, J. J., Disz, T., Edwards, R. A., Gerdes, S., Parrello, B., Shukla, M., Vonstein, V., Wattam, A. R., Xia, F., and Stevens, R. (2014). The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic acids research*, 42(Database issue):D206–14.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., and Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13):1605–1612.
- Plattner, N., Doerr, S., De Fabritiis, G., and Noé, F. (2017). Complete protein-protein association kinetics in atomic detail revealed by molecular dynamics simulations and Markov modelling. *Nature Chemistry*, 9(10):1005–1011.
- Potterat, O., Stephan, H., Metzger, J. W., Gnau, V., Zähler, H., and Jung, G. (1994). Aborycin – A Tricyclic 21-Peptide Antibiotic Isolated from *Streptomyces griseoflavus*. *Liebigs Annalen der Chemie*, 1994(7):741–743.
- Potterat, O., Wagner, K., Gemmecker, G., Mack, J., Puder, C., Vettermann, R., and Streicher, R. (2004). BI-32169, a bicyclic 19-peptide with strong glucagon receptor antagonist activity from *Streptomyces* sp. *Journal of Natural Products*, 67(9):1528–1531.
- Rateb, M. E., Houssen, W. E., Arnold, M., Abdelrahman, M. H., Deng, H., Harrison, W. T. A., Okoro, C. K., Asenjo, J. A., Andrews, B. A., Ferguson, G., Bull, A. T., Goodfellow, M., Ebel, R., and Jaspars, M. (2011). Chaxamycins A–D, Bioactive Ansamycins from a Hyper-arid Desert *Streptomyces* sp. *Journal of Natural Products*, 74(6):1491–1499.
- Ren, H., Wang, B., and Zhao, H. (2017). Breaking the silence: new strategies for discovering novel natural products. *Current Opinion in Biotechnology*, 48:21–27.
- Rocchia, W. and Spagnuolo, M. (2015). *Computational Electrostatics for Biological Applications*. Springer.
- Rose, P. W., Prlić, A., Altunkaya, A., Bi, C., Bradley, A. R., Christie, C. H., Costanzo, L. D., Duarte, J. M., Dutta, S., Feng, Z., Green, R. K., Goodsell, D. S., Hudson, B., Kalro, T., Lowe, R., Peisach, E., Randle, C., Rose, A. S., Shao, C., Tao, Y.-P., Valasatava, Y., Voigt, M., Westbrook, J. D., Woo, J., Yang, H., Young, J. Y., Zardecki, C., Berman, H. M., and Burley, S. K. (2017). The RCSB protein data bank: integrative view of protein, gene and 3D structural information. *Nucleic acids research*, 45(D1):D271–D281.
- Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M. A., and Barrell, B. (2000). Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 16(10):944–5.

- Šali, A. and Blundell, T. L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *Journal of Molecular Biology*, 234(3):779–815.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Number 0879693096. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, ed. 2 edition.
- Scheffler, R. J., Colmer, S., Tynan, H., Demain, A. L., and Gullo, V. P. (2012). Antimicrobials, drug discovery, and genome mining. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(3):969–978.
- Shirling, E. B. and Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 16(3):313–340.
- Sitkoff, D., Sharp, K. A., and Honig, B. (1994). Accurate Calculation of Hydration Free Energies Using Macroscopic Solvent Models. *The Journal of Physical Chemistry*, 98(7):1978–1988.
- Skinnider, M. A., Dejong, C. A., Rees, P. N., Johnston, C. W., Li, H., Webster, A. L. H., Wyatt, M. A., and Magarvey, N. A. (2015). Genomes to natural products PRediction Informatics for Secondary Metabolomes (PRISM). *Nucleic Acids Research*, 43(20):gkv1012.
- Skinnider, M. A., Johnston, C. W., Edgar, R. E., Dejong, C. A., Merwin, N. J., Rees, P. N., and Magarvey, N. A. (2016). Genomic charting of ribosomally synthesized natural product chemical space facilitates targeted mining. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(42):E6343–E6351.
- Sondergaard, C. R., Olsson, M. H. M., and Rostkowski Michałand Jensen, J. H. (2011). Improved Treatment of Ligands and Coupling Effects in Empirical Calculation and Rationalization of pKa Values. *J Chem Theory Comput*, 7(7):2284–2295.
- Sugai, S., Ohnishi-Kameyama, M., and Kodani, S. (2017). Isolation and identification of a new lasso peptide cattlecin from *Streptomyces cattleya* based on genome mining. *Applied Biological Chemistry*, 60(2):163–167.
- Tang, C. L., Alexov, E., Pyle, A. M., and Honig, B. (2007). Calculation of pKas in RNA: On the Structural Origins and Functional Roles of Protonated Nucleotides. *Journal of Molecular Biology*, 366(5):1475–1496.
- Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(2):211–222.
- Thermo Fisher Scientific (2017a). GeneJET Gel Extraction Kit.
- Thermo Fisher Scientific (2017b). GeneJET Plasmid Miniprep Kit.
- Thomas, S., Maynard, N. D., and Gill, J. (2015). DNA library construction using Gibson Assembly®. *Nature Methods*, 12(11):i–ii.

- Tsunakawa, M., Hu, S. L., Hoshino, Y., Detlefsen, D. J., Hill, S. E., Furumai, T., White, R. J., Nishio, M., Kawano, K., and Yamamoto, S. (1995). Siamycins I and II, new anti-HIV peptides: I. Fermentation, isolation, biological activity and initial characterization. *The Journal of antibiotics*, 48(5):433–4.
- Um, S., Kim, Y. J., Kwon, H., Wen, H., Kim, S. H., Kwon, H. C., Park, S., Shin, J., and Oh, D. C. (2013). Sungsanpin, a lasso peptide from a deep-sea streptomycete. *Journal of Natural Products*, 76(5):873–879.
- Universidad Tecnológica Metropolitana (UTEM) (2017). Laboratorio de microbiología, Facultad de Ciencias naturales, matemática y medio ambiente.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., and Rozen, S. G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research*, 40(15):e115.
- Vaishnav, P. and Demain, A. L. (2011). Unexpected applications of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 29(2):223–229.
- van Gunsteren, W. F. and Berendsen, H. J. C. (1990). Computer Simulation of Molecular Dynamics: Methodology, Applications, and Perspectives in Chemistry. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 29(9):992–1023.
- Vega, A. (2016). *Balance Hídrico de la Cuenca del Salar del Huasco Mediante el Modelo Hidrológico de Simulación TOPMODEL Usando Información del Reanálisis Atmosférico*. Memoria para optar al título de ingeniero civil, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas.
- Warren, J. J., Blanchette, D., Dawson, D. V., Teresa, A., Phipps, K. R., Starr, D., and Drake, D. R. (2017). *A new genome-mining tool redefines the lasso peptide biosynthetic landscape*, volume 44.
- Webb, B. and Sali, A. (2016). Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. In *Current Protocols in Protein Science*, volume 86, pages 2.9.1–2.9.37. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- Weber, T., Blin, K., Duddela, S., Krug, D., Kim, H. U., Bruccoleri, R., Lee, S. Y., Fischbach, M. A., Müller, R., Wohlleben, W., Breitling, R., Takano, E., and Medema, M. H. (2015). antiSMASH 3.0—a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Research*, 43(W1):W237–W243.
- Wenzel, S. C. and Müller, R. (2005). Recent developments towards the heterologous expression of complex bacterial natural product biosynthetic pathways. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(6):594–606.
- Wilfert, J. N., Barrett, F. F., Ewing, W. H., Finland, M., and Kass, E. H. (1970). *Serratia marcescens*: biochemical, serological, and epidemiological characteristics and antibiotic susceptibility of strains isolated at Boston City Hospital. *Applied microbiology*, 19(2):345–52.

- Zerikly, M. and Challis, G. L. (2009). Strategies for the discovery of new natural products by genome mining. *ChemBioChem*, 10(4):625–633.
- Zhang, M. M., Wong, F. T., Wang, Y., Luo, S., Lim, Y. H., Heng, E., Yeo, W. L., Cobb, R. E., Enghiad, B., Ang, E. L., and Zhao, H. (2017). CRISPR-Cas9 strategy for activation of silent *Streptomyces* biosynthetic gene clusters. *Nature Chemical Biology*, 13(6):607–609.
- Zhu, S., Fage, C. D., Hegemann, J. D., Mielcarek, A., Yan, D., Linne, U., and Marahiel, M. A. (2016). The B1 Protein Guides the Biosynthesis of a Lasso Peptide. *Scientific Reports*, 6.
- Zimmermann, M., Hegemann, J. D., Xie, X., and Marahiel, M. A. (2013). The Astexin-1 Lasso Peptides: Biosynthesis, Stability, and Structural Studies. *Chemistry & Biology*, 20(4):558–569.
- Zimmermann, M., Hegemann, J. D., Xie, X., and Marahiel, M. A. (2014). Characterization of caulonodin lasso peptides revealed unprecedented N-terminal residues and a precursor motif essential for peptide maturation. *Chem. Sci.*, 5(10):4032–4043.
- Zong, C., Maksimov, M. O., and Link, A. J. (2016). Construction of Lasso Peptide Fusion Proteins. 70(12):773–779.
- Zong, C., Wu, M. J., Qin, J. Z., and Link, A. J. (2017). Lasso Peptide Benenodin-1 Is a Thermally Actuated [1]Rotaxane Switch. *Journal of the American Chemical Society*, 139(30):10403–10409.

Apéndices

Apéndice A

Lista de cepas

Cepa	Descripción	Referencia del Recurso
<i>E. coli</i> DH5 α	Cepa utilizada para clonamiento de rutina. F- Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17(r_k⁻) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ⁻</i>	(Grant et al., 1990)
<i>E. coli</i> TOP10	Cepa utilizada para clonamiento de rutina. F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu7697) galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ⁻</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> ET12567 / pUZ8002	Cepa de metilación deficiente usada para conjugación con <i>Streptomyces</i> . pUZ8002 provee la maquinaria de conjugación. <i>dan13::Tn9</i> (Resistencia a cloranfenicol) <i>dcm-6 hsdM hsdR recF143 zjj-201::Tn10 galK2 galT22 ara14 lacY1 xyl-5 leuB6 thi-1 tonA31 rpsL136 hisG4 tsx-78 mtlI glnV44</i> , pUZ8002 (resistencia a kanamicina)	(MacNeil et al., 1992)
<i>S. coelicolor</i> M1152	M145, Δ <i>act</i> Δ <i>rec</i> Δ <i>cpk</i> Δ <i>cda</i> <i>rpoB</i> [<i>C1298T</i>]/([S433L])	(Gomez-Escribano and Bibb, 2011)
<i>S. coelicolor</i> M1154	M145	
2: <i>Alternaria alternata</i>	Hongo utilizado para ensayos de bioactividad antifúngica	(Universidad Tecnológica Metropolitana (UTEM), 2017)
13: <i>Penicillium rubens</i>	Hongo utilizado para ensayos de bioactividad antifúngica	(Universidad Tecnológica Metropolitana (UTEM), 2017)

14: <i>Penicillium rubens</i>	Hongo utilizado para ensayos de bioactividad antifungica	(Universidad Tecnológica Metropolitana (UTEM), 2017)
16: <i>Penicillium chrysogenum</i>	Hongo utilizado para ensayos de bioactividad antifungica	(Universidad Tecnológica Metropolitana (UTEM), 2017)
31: <i>Aspergillus niger</i>	Hongo utilizado para ensayos de bioactividad antifungica	(Universidad Tecnológica Metropolitana (UTEM), 2017)
35: <i>Penicillium griseofulvum</i>	Hongo utilizado para ensayos de bioactividad antifungica	(Universidad Tecnológica Metropolitana (UTEM), 2017)
CC17A: <i>Penicillium glabrum</i>	Hongo utilizado para ensayos de bioactividad antifungica	(Universidad Tecnológica Metropolitana (UTEM), 2017)
CC18G: <i>Aspergillus creber</i>	Hongo utilizado para ensayos de bioactividad antifungica	(Universidad Tecnológica Metropolitana (UTEM), 2017)
BOT: <i>Botrytis cinerea</i>	Hongo utilizado para ensayos de bioactividad antifungica	(Universidad Tecnológica Metropolitana (UTEM), 2017)
FUS: <i>Fusarium oxisporum</i>	Hongo utilizado para ensayos de bioactividad antifungica	(Universidad Tecnológica Metropolitana (UTEM), 2017)
<i>B. subtilis</i>	Organismo utilizado para ensayos de bioactividad	
<i>Micrococcus luteus</i>	Organismo utilizado para ensayos de bioactividad	

Apéndice B

Lista de plásmidos

Plásmido	Descripción	Referencia
pIJ10257	Vector de expresión para <i>Streptomyces</i> con el promotor <i>ermE*</i> , <i>hyg</i> (resistencia a higromicina B), maquinaria de conjugación (<i>oriT</i> desde RK2), maquinaria de integración (Φ BT1 <i>attP</i>)	(Castro Figueroa, 2015)
pAN001	Vector derivado de pIJ10257, contiene el clúster genómico del lazo péptido 1 descrito en este trabajo	Este trabajo
pAN002	Vector derivado de pIJ10257, contiene el clúster genómico del lazo péptido 2 descrito en este trabajo	Este trabajo
pAN003	Vector derivado de pIJ10257, contiene el clúster genómico del lazo péptido 3 descrito en este trabajo	Este trabajo
pAN004	Vector derivado de pIJ10257, contiene el clúster genómico del lazo péptido 4 descrito en este trabajo	Este trabajo

Apéndice C

Lista de cebadores

Cebador	Secuencia 5' → 3'	Nota
AN01-f1	TATCATatgaacgaggacacgatg	Amplifica clúster de lazo péptido 1 con sitio de restricción <i>NedI</i> , para inserción en pIJ10257
AN01-f2	TATCATatgtacgaaccgcccggcc	Amplifica clúster de lazo péptido 1 con sitio de restricción <i>NedI</i> , para inserción en pIJ10257
AN01-r1	TATAAGcttctcgtctgcatcatgcg	Amplifica clúster de lazo péptido 1 con sitio de restricción <i>HindIII</i> , para inserción en pIJ10257
AN01-r2	TATAAGCTtgtcgcgaggaagtgggtgctc	Amplifica clúster de lazo péptido 1 con sitio de restricción <i>HindIII</i> , para inserción en pIJ10257
AN02-f	TATCAatgtcccgcaccttgctc	Amplifica clúster de lazo péptido 2 con sitio de restricción <i>NedI</i> , para inserción en pIJ10257 o pIJ12551
AN02-r1	TATAAGCttcctcggcgcggtacac	Amplifica clúster de lazo péptido 2 con sitio de restricción <i>HindIII</i> , para inserción en pIJ10257
AN02-r2	TTTAATTAacggaggtctgcatctgct	Amplifica clúster de lazo péptido 2 con sitio de restricción <i>PacI</i> , para inserción en pIJ10257 pIJ12551
AN03-f	TATCATatgtacgagcaggagctcaag	Amplifica clúster de lazo péptido 3 con sitio de restricción <i>NedI</i> , para inserción en pIJ10257 o pIJ12551
AN03-r1	TATAAGCTTgggaggtactggaggagacc	Amplifica clúster de lazo péptido 3 con sitio de restricción <i>HindIII</i> , para inserción en pIJ10257

AN03-r2	TTTAATTA	Agggaggtactggaggagacc	Amplifica clúster de lazo péptido 3 con sitio de restricción PacI, para inserción en pIJ10257 o pIJ12551
AN04-f	TATCAT	Tatggagtgaacgaccttta	Amplifica clúster de lazo péptido 4 con sitio de restricción NdeI, para inserción en pIJ10257 o pIJ12551
AN04-r1	TATAAG	cttctaccgcttcttcg	Amplifica clúster de lazo péptido 4 con sitio de restricción HindIII, para inserción en pIJ10257
AN04-r2	TTTAATT	aacaacctccggcaccact	Amplifica clúster de lazo péptido 2 con sitio de restricción PacI, para inserción en pIJ10257 o pIJ12551
GBA001		ccggttggtaggatcgtcta	Cebador utilizado para PCR colonia y secuenciación de los insertos
GBA002		tcattctgttctccgctcat	Cebador utilizado para PCR colonia y secuenciación de los insertos

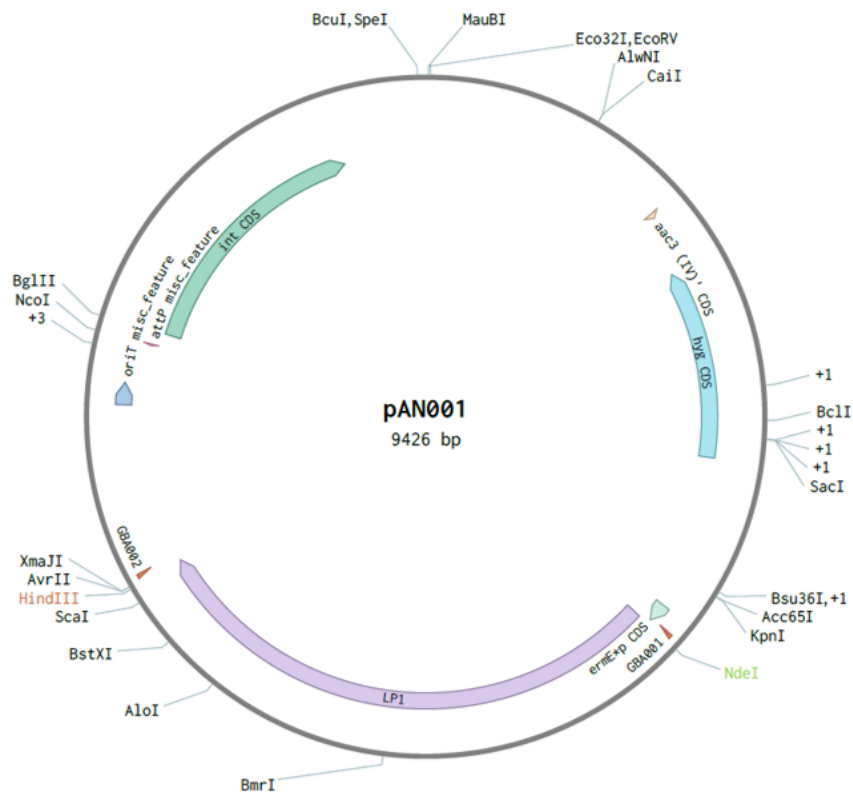


Figura D.2: pAN001 derivado de pIJ10257 que porta el gen del lazo péptido 1.

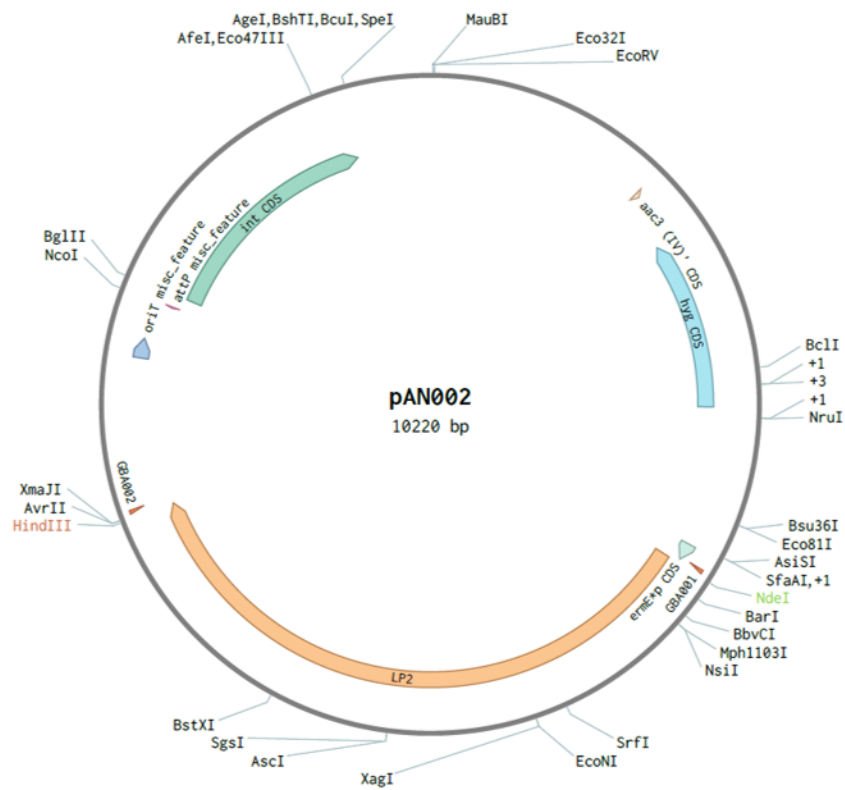


Figura D.3: pAN002 derivado de pIJ10257 que porta el gen del lazo péptido 2.

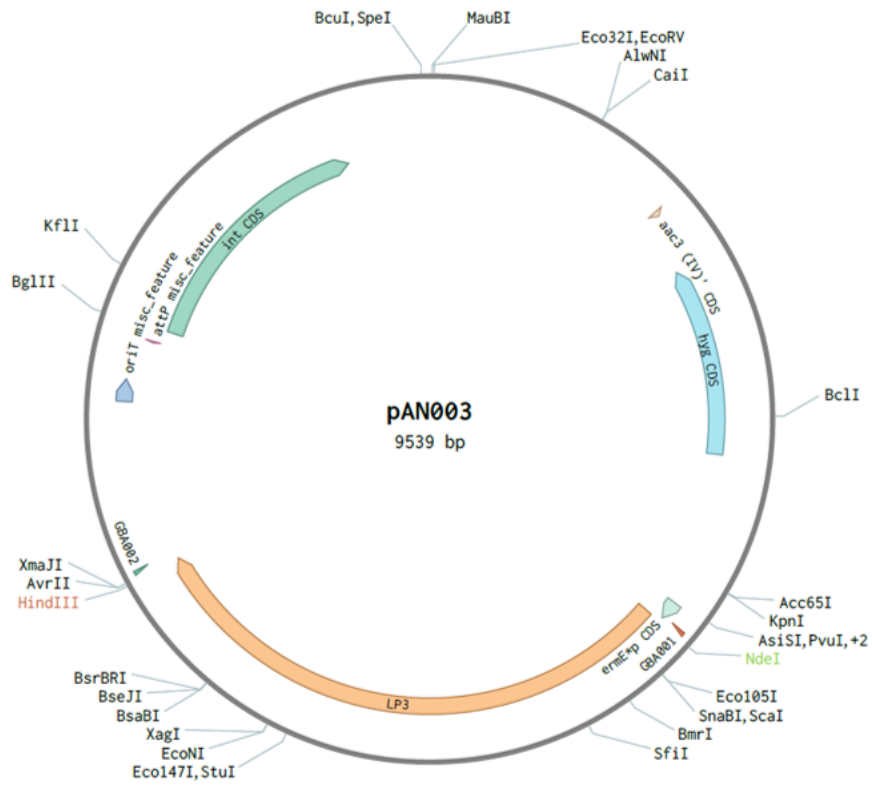


Figura D.4: pAN003 derivado de pIJ10257 que porta el gen del lazo péptido 3.

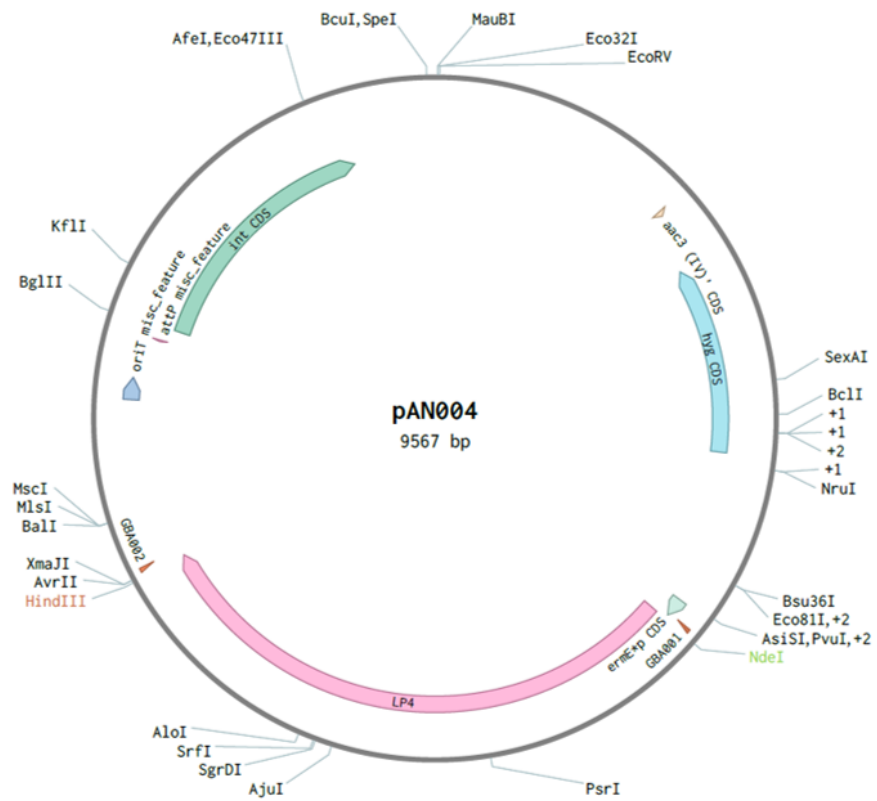


Figura D.5: pAN004 derivado de pIJ10257 que porta el gen del lazo péptido 4.

Apéndice E

Medios, soluciones, tampones, kits y reactivos

E.1. Recetas medios agar

Medio ISP2 agar contiene, por litro de agua destilada ([Shirling and Gottlieb, 1966](#))

Extracto de levadura	4 g
Extracto de malta	10 g
Glucosa	4 g
Agar	20 g

Medio SFM agar contiene, por litro de agua destilada ([Hobbs et al., 1989](#))

Triptona	10 g
Agar	20 g
Manitol	20 g
Harina de soja	20 g

La harina de soja fue comprada en un supermercado local. La marca utilizada en este trabajo fue "Mi tierra" de Nutrisa - Nutrición y Alimentos S.A., Santiago, Chile. su composición cada 100 g es la siguiente:

Proteínas	50 g
Grasas	1 g
Carbohidratos	30 g
Sodio	0,01 g
Magnesio	0,3 g
Fósforo	0,73 g
Potasio	2,47 g
Hierro	0,01 g
Cobre	0,001 g
Calcio	0,32 g
Zinc	0,005 g

Medio PDA agar contiene, por litro de agua destilada (Merck) Medio Agar patata-glucosa producido por Merck, su composición estándar en la siguiente:

Infusión de patata (infusión de 200 g de patatas)	4 g
D(+)-Glucose	20 g
Agar	15 g

Medio TGY agar contiene, por litro de agua destilada (buscar referencia)

Hidrolizado enzimático de caseína	5 g
Extracto de levadura	3 g
Glucosa	1 g
Agar	15 g

E.2. Recetas medios líquidos

Medio 2xYT contiene, por litro de agua destilada ([Kieser et al., 2000](#))

Extracto de levadura	10 g
Triptona	16 g
NaCl	5 g

Medio ISP2 contiene, por litro de agua destilada ([Shirling and Gottlieb, 1966](#))

Extracto de levadura	4 g
Extracto de malta	10 g
Glucosa	4 g

Medio LB contiene, por litro de agua destilada ([Sambrook et al., 1989](#))

Extracto de levadura	5 g
Triptona	10 g
NaCl	10 g

Medio ISP2 modificado contiene, por litro de agua destilada ([Rateb et al., 2011](#))

Extracto de levadura	4 g
Extracto de malta	10 g
Glycerol	10 g

Ajustar a pH 7.2 adicionando NaOH si es necesario.

Medio TSB contiene, por litro de agua destilada ([Kieser et al., 2000](#))

Caldo de soja triptona	30 g
------------------------	------

Medio YEME contiene, por litro de agua destilada ([Kieser et al., 2000](#))

Extracto de levadura	3 g
Peptona	5 g
Extracto de malta	3 g
Glucosa	10 g
Sucrosa	340 g

Después de autoclavar añadir 2 ml de una solución autoclavada MgCl_2 2.5 M

E.3. Recetas de soluciones para microbiología

Las soluciones utilizadas en microbiología fueron preparadas como se describe a continuación: primero se registra el peso de un tubo para centrifuga de 15 ml vacío (X_1 g), se agregar la cantidad de la sustancia química necesaria dentro del tubo y se registra su peso (X_2 g), luego se calcular el peso exacto adicionado de la sustancia química restando los valores obtenidos $X_2 - X_1$ y se agrega el volumen del solvente necesario para lograr la concentración deseada. Luego de esto, la solución es filtrada a través de filtros de $0,22 \mu\text{m}$ y es alicuotada en tubos Eppendorf de 1,5 ml. Guardar a -20°C hasta su huso.

E.3.1. Soluciones de antibióticos

Solución de Cloranfenicol. Cloranfenicol Calbiochem cat. no. 220551 fue disuelto en etanol absoluto hasta una concentración final de 50 mg/ml.

Solución de Kanamycin. Kanamycin Gibco cat. no.11815-024 fue disuelto en agua hasta una concentración final de 50 mg/ml. Su uso es recomendado en bajas concentraciones de sal, por ejemplo, con CaCl_2 a 60 mM o MgCl_2 a 60 mM puede ser usado sin compromiso de la efectividad antibiótica.

Solución de Higromicina B. Higromicina B de *Streptomyces hygroscopicus* de Sigma cat. no. 238813 en solución buffer fosfato (PBS) a una concentración de 50 mg/ml. La solución fue alicuotada en tubos Eppendorf de 1,5 ml y tapada con papel aluminio para protegerla de la luz (Higromicina B es sensible a la luz). Usada en cultivos en agar o líquidos con bajas concentraciones de sal, por ejemplo, con CaCl_2 a 10 mM o MgCl_2 a 10 mM puede ser usado sin compromiso de la efectividad antibiótica pero con CaCl_2 a 60 mM o MgCl_2 a 60 mM no puede ser usado.

Solución de Ácido nalidíxico. Ácido nalidíxico cat. no. N8878 fue disuelto en solución de NaOH a 0,3 M hasta una concentración de 25 mg/ml.

E.4. Kits

- UltraClean Microbial DNA Isolation Kit.
Kit diseñado para aislar ADN genómico de alta calidad. Fabricante Mo Bio Laboratories, Inc., código de catálogo: # 12224-50 ([Mo Bio Laboratories, 2010](#))
- GeneJET Gel Extraction Kit.
Kit diseñado para la purificación rápida y eficiente de fragmentos de ADN desde geles de agarosa estándares o de ajo punto de fusión, con tampón TAE o TBE. Fabricante ThermoFisher Scientific, código de catálogo: # K0692 ([Thermo Fisher Scientific, 2017a](#))
- GeneJET Plasmid Miniprep Kit.
Kit utilizado para el aislamiento rápido de ADN plasmidial de alta pureza para procedimientos convencionales de biología molecular. Fabricante ThermoFisher Scientific, código de catálogo: # K0502 ([Thermo Fisher Scientific, 2017b](#))

Apéndice F

Protocolos

F.1. Extracción de plasmidios y ADN genómico

Para la extracción de ADN genómico y de plásmidos se utilizaron kits de extracción descritos en sección [E.4](#).

F.2. Preparación de células competentes y transformación de *E. coli*

F.2.1. Protocolo de preparación de células *E. coli* competentes con cloruro de calcio

1. Comenzar con un cultivo overnight de *E. coli* TOP10 o DH5 α en 5 ml de LB a 37°C.
2. Inocular 50 ml de LB fresco, en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, con 1 ml (1/50) de *E. coli* desde el cultivo overnight. Incubar a 37°C y 250 rpm hasta conseguir una OD a 600 nm de entre 0,2-0,3.
3. Colocar el cultivo en hielo por 10 minutos.
4. Centrifugar el cultivo en tubos para centrifuga de 50 ml a 3.000 rpm a 4°C por 10 min.
5. Remover el sobrenadante y resuspender el pellet celular en 12,5 ml (1/4) de 0,1 M MgCl₂ y colocar el pellet resuspendido en hielo por 5 min.
6. Centrifugar a 4°C y 4.000 rpm por 10 min.
7. Remover el sobrenadante y resuspender el pellet celular en 2,5 ml (1/20) 0,1 M CaCl₂ y colocar el pellet resuspendido en hielo por 20 min.
8. Centrifugar a 4°C y 4.000 rpm por 10 min. Remover el sobrenadante y resuspender el pellet celular en 1 ml (1/50) de 85% 0,1 M CaCl₂ con un 15% de glicerol.

Nota. La solución de 85% 0,1 M CaCl₂ con 15% de glicerol, contiene para 50 ml de volumen inicial: 42,5 ml 0,1 M CaCl₂ y 7,5 ml de glicerol al 80%.

9. Alicuotar la suspensión resultante a 100 ml en tubos Eppendorf estériles de 0,6 ml y guardar a -80°C hasta su uso.

F.2.2. Protocolo de preparación de células *E. coli* electrocompetentes

1. Comenzar con un cultivo overnight de *E. coli* TOP10 o DH5 α en 5 ml de LB a 37°C.
2. Inocular 50 ml de LB fresco, en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, con 1 ml (1/50) de *E. coli* desde el cultivo overnight. Incubar a 37°C y 250 rpm hasta conseguir una OD a 600 nm de entre 0,5-0,7. Colocar la solución de glicerol en hielo para su posterior uso.
3. Colocar el cultivo en hielo por 10 minutos.
4. Centrifugar el cultivo en tubos para centrifuga de 50 ml a 4.000 rpm a 4°C por 5 min.
5. Remover el sobrenadante y resuspender el pellet celular en 20 ml (1/2,5) de glicerol al 10 % (mantener en hielo).
6. Centrifugar a 4°C y 4.000 rpm por 5 min.
7. Remover el sobrenadante y resuspender el pellet celular en 20 ml (1/2,5) de glicerol al 10 % (mantener en hielo).
8. Centrifugar a 4°C y 4.000 rpm por 5 min.
9. Remover el sobrenadante y resuspender en 1 ml de glicerol al 10 % (mantener en hielo).
10. Alicuotar la suspensión resultante a 100 ml en tubos Eppendorf estériles de 0,6 ml y guardar a -80°C hasta su uso.

F.2.3. Transformación de *E. coli* competentes con cloruro de calcio

1. Descongelar stock de *E. coli* TOP10 o DH5 α competentes con cloruro de calcio en hielo.
2. Mezclar 100 μ l de células con 10 μ l del plásmido purificado o del mix de ligación en un tubo Eppendorf de 1,5 ml y mantener en hielo por 20 min.
3. Colocar el mix en cubetas de electroporación frías (rendija de ancho 0,2 cm) y trasladar al electroporador BioRad GenePulser a 2.500 V, realizar 2 pulsos.
4. Agregar 900 μ l de medio LB (sin antibiótico) e incubar a 37°C y 250 rpm por 1 hora.
5. Centrifugar 1 min a 13.000 rpm
6. Sembrar volúmenes de 200 μ l de sobrenadante y 100 μ l de pellet resuspendido en placas de LB agar suplementado con antibiótico relevante.
7. Incubar a 37°C overnight.
8. Seleccionar las colonias aisladas y ponerlas a crecer en LB con antibiótico relevante a 37°C overnight.
9. Guardar cada clon en glicerol al 20 % como stock a -80°C.

F.2.4. Transformación de *E. coli* electrocompetentes

1. Descongelar stock de *E. coli* TOP10 o DH5 α competentes con cloruro de calcio en hielo.

2. Mezclar 100 μl de células con 10 μl del plásmido purificado o del mix de ligación en un tubo Eppendorf de 1,5 ml y mantener en hielo por 20 min.
3. Incubar a 42°C por 1 min en termomixer o termociclador y traspasar a hielo por 1 min.
4. Agregar 900 μl de medio LB (sin antibiótico) e incubar a 37°C y 250 rpm por 1 hora.
5. Centrifugar 1 min a 13.000 rpm
6. Sembrar volúmenes de 200 μl de sobrenadante y 100 μl de pellet resuspendido en placas de LB agar suplementado con antibiótico relevante.
7. Incubar a 37°C overnight.
8. Seleccionar las colonias aisladas y ponerlas a crecer en LB con antibiótico relevante a 37°C overnight.
9. Guardar cada clon en glicerol al 20 % como stock a -80°C.

F.3. Procedimientos generales para el cultivo y la manipulación genética de cepas de *Streptomyces*

F.3.1. Preparación stock de esporas

Protocolo original se encuentra en ([Castro Figueroa, 2015](#)).

1. Cultivar una colonia de la cepa de *Streptomyces* a utilizar en una placa fresca de SFM agar, usando un cotonito estéril. Incubar a 30°C hasta su completa esporulación.
2. Preparar el sistema de filtración, tomar una jeringa de 10 ml y colocar algodón en su interior, como muestra la figura F.1A. Introducir el émbolo en el barril de la jeringa, dejando sellada la parte superior. Cubrir el sistema de filtración con papel de aluminio y autoclavar. No tocar el adaptador durante el proceso.
3. Después de que las células estén esporulando, inundar las placas con 2 ml de glicerol al 20 % y gentilmente raspar la superficie de la placa con rastrillo hecho con una pipeta Pasteur.
4. Transferir la solución (glicerol al 20 % mezclado con esporas y debris celular) con una punta cortada dentro de un tubo Eppendorf de 1,5 ml y aplicar vortex brevemente.

Opcional. Colocar el tubo Eppendorf en un baño de ultrasonido a 40.000 Hz por 3 min.

5. Verter el contenido del tubo Eppendorf dentro del sistema de filtración (sugerencia: colocar la jeringa con su adaptador dentro de un tubo Eppendorf de 1,5 ml limpio mientras el émbolo este separado del barril de la jeringa).
6. Expulsar la solución desde el sistema de filtrado hacia un tubo Eppendorf estéril.
7. Guardar el stock de esporas a -20°.

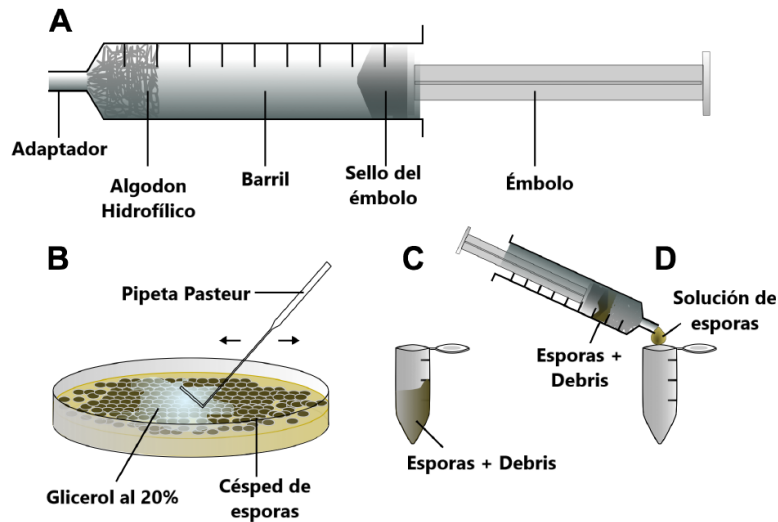


Figura F.1: Representación esquemática del proceso de preparación de stocks de esporas para cepas de *Streptomyces*. (A) Sistema de filtración. (B) Separación de las esporas de la superficie de la placa. (C) Almacenamiento temporal de la solución de esporas más debris. (D) Filtración de la solución de esporas.

F.3.2. Conjugación entre cepa de *E. coli* ET12567 y *Streptomyces coelicolor*

1. Comenzar con una cultivo overnight de *E. coli* ET12567, que transporta los vectores pUZ8002 (vector ayudante) y el vector a transferir, en 5 ml de LB suplementado con los antibióticos relevantes. Dejar el cultivo a 37°C y 250 rpm.
2. Temprano durante la mañana, realizar un sub-cultivo en 10 ml de LB suplementado con los antibióticos relevantes a 37°C y 250 rpm hasta conseguir una OD a 600nm entre 0,3-0,4.
3. Centrifugar el cultivo a temperatura ambiente y 4.000 rpm por 5 min, descartar el sobrenadante y lavar el pellet celular con 5 ml de LB, repetir este lavado dos veces.
4. Resuspender el pellet celular resultante en 0,3 ml de LB.
5. Mezclar 40 μ l del stock de esporas de *S. coelicolor* con 0,5 ml de medio 2xYT (receta en apéndice...) y dar un shock térmico a 50°C por 10 min. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
6. Centrifugar a temperatura ambiente y 14.000 rpm por 1 min y descartar el sobrenadante.
7. Resuspender gentilmente el pellet con la suspensión de *E. coli* obtenida anteriormente.
8. Plaquear 0,1 ml de la solución de conjugación en una placa de SFM suplementada con MgCl₂ a 10 mM. Dejar la placa secando a temperatura ambiente.
9. Incubar de 20 a 24 horas a 30°C.
10. Inundar con 1 ml de ácido nalidíxico suplementado con solución de antibiótico relevante (ver tabla a continuación...). (Por ejemplo, una inundación con higromicina B la solución debería ser: VER BIEN COMO ES ESTO)

11. Dejar al superficie de la placa secar e incubar a 30°C.

Control. Sembrar 0,1 ml de la conjugación en una placa de SFM agar y inundar al día siguiente solo con ácido nalidíxico.

Antibiótico (concentración del stock (mg/ml))	(concentración del stock (mg/ml))	Concentración final de antibiótico en una placa con 25 ml de agar ($\mu\text{g/ml}$) antes de la inundación	Cantidad de solución stock μl
Apramicina (50)		50	25
Higromicina (50)		40	20
Kanamicina (50)		50	25
Ácido nalidíxico (25)		20	20

F.4. Bioensayos sobre *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* y cepas de hongos patógenos de plantas

F.4.1. Protocolo para bioensayos sobre *Bacillus subtilis* y *Micrococcus luteus*

Estos bioensayos se realizaron en forma similar sobre *B. subtilis* y *M. luteus*, la única diferencia es el tiempo de incubación del preinoculo.

1. Primero se realiza un cultivo en 10 ml de LB, a 37°C y 250 rpm overnight (ON) en el caso de *B. subtilis* y de dos día para *M. luteus*. Este se utiliza luego como preinoculo.
2. Posteriormente se inocula un matraz de 250 ml con 50 ml de LB y 1 ml del preinoculo, se deja a 37°C con 250 rpm de agitación hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,6.
3. Previamente se debe tener autoclavado LB agar suficiente para realizar placas con 25 ml de agar, calculando la cantidad de placas a utilizar.
4. Cuando se llega a la OD₆₀₀ se calcula la cantidad de inoculo a utilizar en una placa para que su OD₆₀₀ sea de 0,0125. Este inoculo se mezcla directamente con el LB agar tibio antes de ser agregado a cada placa.
5. La mezcla anterior se agrega a cada placa y se deja secar.
6. Una vez secas las placas se procede a realizar pocillos utilizando la parte trasera de una punta de pipeta.
7. En los pocillos creados se agrega el extracto que quiera ser probado y se inocula toda la noche a 37°C.

F.4.2. Protocolo para bioensayos sobre cepas de hongos patógenos de plantas

Los bioensayos sobre hongos se realizaron de manera diferente debido a que algunos de los hongos probados forman estructuras en medio líquido y al realizar un preinoculo era difícil

medir la absorbancia de estos. Por esto el protocolo creado es el siguiente:

1. Se realiza un cultivo del hongo en medio PDA a 30°C (o 25°C si se cultiva *B. cinera*), hasta que se produzca esporulación.
2. Una vez esporulado el hongo, se raspa un poco con un asa y se resuspende en tubos ependorff de 1,5 ml con 100 o 200 μ l de agua destilada.
3. Vortexear los tubos hasta homogeneizar lo mas posible.
4. Se siembra el contenido del tubo sobre placas de PDA utilizando cotonitos estériles, se busca cubrir homogéneamente toda la superficie de la placa.
5. Teniendo sembradas las placas se procede a crear pocillos utilizando la parte trasera de una punta de pipeta.
6. En los pocillos creados se agrega el extracto que quiera ser probado y se inocula a 30°C (o 25°C si se cultiva *B. cinera*) hasta que se produzca la esporulación del hongo.

Apéndice G

Material suplementario

G.1. Secuencia nuclueotídicas de los cluters de los lazo péptidos

A continuación se entrega la secuencia nuclueotídica (formato fasta) de la sección del clúster que fue utilizada en la expresión heteróloga, es decir, no incluyendo proteínas transportadoras si este las tuviera.

```
>LP1
atgaacgaggacacgatgtacgaaccgccgcctggtagaggtcggggacttcgcgga
gatacagctggaccgtggcacctggggttgggacgactacaacgagtgctggtggctggg
ctgtgatctcgtggtgaagggtccctcccgcgctcgtgacggccgctggaggaggag
ccgtgtgtgtggggcgacgtccgcgcgccccgcacacaggatttccttgaggagtccc
gtcgttccggccagtggggggcaagtggagtctcgtcgttcttccgacaaccaggacggt
gcggcggtggccgcgcgctgcttccggaccccgagccggcgaagggtggtcaccacgct
tccggcgctccgtggatcatggggacgtggagtgccgaagacatactgacggtctcgtc
ggccgcaagaacctgatactgctcggctgcttaccacgacctcggcgcaactcctgcgc
tcctctcggccagcggcgacgtctccgcgctggatgtcttctcgggtccgccccgga
agccaccacgcgatcgctccttcgacggggagatacgtgtgcagggttcctgtccggt
gtacgggaggtcttctacgccacgatccacggtgtcacgtgcgcggccgaccgccggac
accctcgcgcgggggacggcggtggcgtcgcagagcgggtcctcgcgggacacctcctg
tcgtaccggccctggccgctgtccgggcgcccgggtgtggcggggcgtcgagtacctgcc
ccaggccactacctcggatacgccecaacggcagccaccggggcggctgcgtggtgggcc
cctccccccgccgagctgtcgtcgcggaggggcgacgccgggtgcggggcgcgctggag
ggcgcggccgcccgcgctcccggaacagcccggcccttggtgcgacctctccggcgc
atggactccacgagcctcgccttctcacctaccgtcaggagggtcggggcggttggtg
acggtgcgcagagaggccctggacgcccccacgacgacgccgggtgggctcagcgcgcc
gccgctcgtcgggacgccgagtcctcgtactggccccaaggagcttctctgtcg
ttaccggccaactgcctacgacgacacctggaggcaccgtaccctggagccgggtg
aaggcggtcggccccagctgcacggcagctggccgacctgcgtgtccctcagctc
accggccacgggggtgacgaactctcagcccggcgccgtcgttctaccacgcgctggcc
```

cgcagtgaggggctccgctccgtgcccgcacatctgcccgtagcccgaagcatgtaccgctgg
ccgctcggcgcgatggtgcgcaacctgctccgtgccccgtcctacccccagtggctcgg
acggcgtccacatctctgacgctgcccggcggcgggcccaccgagccctcaccggctgg
ggagcccatccgaggetgcccgtctgggagacccccgagggcggctgagctgaccgctggt
ctcctgcccggaggctgcccgtcagaagacctcggctacgctccggaggcctgacgac
gaactcttgaggggcgtgcccgtctgcccggcgaagatccgctcaccgaccggctcacc
tcccggctcccgggtggcgtaccacgccccctcctggacgatcaggtggtggacgcccgt
ctgtccgtgctctcgggaccgctcagggctgagcgcgcccaccggctcctcggccc
gcgatgcccgggtgtgtgcccagcgcgtctctgggcccggaccaccaaggggcagggccagc
ggcaggtgtacgcagggctcccggcgcacaaggccgaactgctcgcactgaccgaggac
atgcccgtgcccggctcggcctggtggacggcaccgcccgtgcccggcgcgtgctgacg
ccgcacgcatgtcccgcacgttcaattcccgtggtcccaccctcgcctgcgaatcatgg
ctgcccgtcggcgaagcggcggcggacacgtgtgcccgcagcaaggagccgcgatgagct
actcactgccccgcacgtgacggcggctgacaccgatgacggcatgggtgctgctccacg
agaccaccggccggactggtgctcaacgccaccggagccgcccgtgctcggctcctgc
gggaggggcaaggacatcggcggaggctcgtgacgaactcggcgtcccgtctcgcaggaca
ccacacgctgaccgcccacgtcaacagggtgctcgaacacctcctcaaggcaggggtgg
tgaccgcatagcttctcggctcgtcccggagcagcggacacgtgtcccgtcaccacaca
tctgctcggccgagcccgtgaccgcccgtggttctcctcaggtctcgcggccag
gctcccgtctaccctcggcaccgcccgcacgcccggcaccgtcccgccaccaggtggaggc
ggtgcccgtctgccaggccgtggtgctcgtgagcagcaagtgtcccggcagggctgct
gcagcgtcccgtggccaccgctgatgtcccgtgcccagggcactggcccggactggtg
cacaggtgtgctacgcagcccgtcccgtgcccacgcccgggtcaggtggcccggcccgc
cccgtgggcccaggggtgaggacatccagtaactccggacactgatgcccgggtcccgcacca
gcccggaccggggggacgcatgatggacgagccgagaag

>LP2

atgtcccgcaccttctcgtgcccgcgtaccgccccgctagctggtgacaacgcccgg
ccacacggaaggccgacggcaccgctcacatcgaggtgatgacatgaaagacgtacga
ggctccgacgctcgtccgactgggcacgttccgtgagaagaccggcctgctgcagcgcag
cggcaacgaccgtctcatcctcagcaagaactgacggcggccgacacgtaacgcgactcc
atgtcagatgatgagagcgggaaccgggcccggcggcagcctgctcgcagctctc
accgactcgcagggaggcggcctcgcggcccgttctcgcaccaccggtaaccgctc
ctgacgcatgctcgggcccctggctgatcggcccgggtggtcggcggcggagatcacc
gtggccaggggccggcagcaccgactggcctcgtcggatggtgtcccggccaccggcag
cgactcgaacgcccggcggcccgcacatcaccgaactcgcgcctggcccgg
accctgcccggcagctccacctggtggcccggcaccgacggcagctcccgggtgcagggc
agcgcctcccggctgcccgtggtctccacgcgcggatcggcggcgtccacgtggcccgc
accagcgcggatctgctcggcaccgcccggcagcaggccggacaccggcccggctcgc
accgcccctctgtggcccgtaccatccgctgtacgagacctcggcttgggagggagtc
gaggcgggtgccccggaggacgcctgatcgtctcccggcagggacaccgctcgcacc
tcccgtggtggcggccccggagccgaccgcccctcgcgcccggcggcccggcctc
cgcgaggcgtggccgaagcctggccatccggaccgcccggcggcgtggtcagctgc
gacctgtcccggcggcctggactccacctccgtctgcttctggcccggcctccaccgccc
tccgtggtggcggcagcctggcccggacgggaccgcccggacaccgacctcgcctggggc
cggcagggcggcggagcactgcccgaaggtcgaccacgctcgtctgggacgcccggcgcgtcgc

gccctggtctactcggacctgctcggcatcgacgacctgctcgacgagccgacgatcggg
gtgatggaccgctcacgcgtcctgcaaacacctgccgtggctggcgaacgcggcagccgg
gtgcacctaccggcatcggcggcgaccacgtcgctggtgctcggaggcgtactaccac
cgactgctgcgcaaccggcctgttcgcaactgcgccagctgcggggctttcgcgacctg
tggacctggcctcggcgcgacggcgcgtgccctcgccgacgcccgtacataaccggcc
tggctggccgactccgtacgccacctgcgcgcaaccgatgcggcgtcctcggtaaccggc
agcctcggctgggggatgtcgcgccctgttccctggatgaccgccgagacggagcgg
ctcgcgcgccgcacctgctggactcggcgcgctggccgaaccgctgactcggaccgc
ggcctgcacaccgacctggagctgatccgcacctgcacacgcatcatccgccagtgggag
cggatggcgaccggcgggacttccgatggcgtcgccctacctggacgacccgcgtgat
cgaggcgtgctcgcggctccggccgacgaccgctcacgccgtggcagtacaaaccgct
gctcaccgaggcgtgcgcggggtcgtccggaggagtgcctcggcgcgccaacaaggc
cgaggcgtcgtatggacgcgtcggacggactgcgccgccaccggggcgacctgatgacct
gtggaccgactcccggtggagagcctgggctggtggacggcggcgaactgcgccggt
cgcgcagcggccctccgcgccggcctgcgcgacgcgactcctctattcgaccatcgcgtg
cgagggtgtggctgcgcgccaggaccgcgacccccatccggggccacggtcagatgacg
gaggacagccgcggcggcggacagccgtgacaggaacaagcagcagccgtgaccgcacaca
gcagagaggcccgacctcatgacgctccgattcgggaccgacgtctccaccgcggagacg
cagtaaggaaaggctgctcctcgaccaacgcaccggcgactactgggagttgaacccacg
ggcgcctggtggtgagaacactcatggacgacggcgacgagggcggccgctcaccggc
ctcgtcgcacagttcgccatcgaccgcgaccgcggagcgggacgtgacggccctcgtc
agcgacctccggaacgcggggctgctcctatgaccacgccagcgcctggaccggccca
ccggagtccccctcgccggcgcctggccgccgctcgttctcgtccccgcgtggccc
tgtcttctcggccgcgcccagatccgcgcttactggagcgcgtaagccggggcgcgc
ggcccgccacccccgcgagggcggcggccgggaggcgtgtgcgcggctcagcctgc
gtgcgcggggccgcgaggctgctccccgaggtcgtcggggcggccctgctgtgcggc
tgcacggcacctggcccacctggtgcaccggggtgcgcaaggtgccgccgttctcggcc
acgctggatcgaggccgacggcctccgctcggggaaggcgtgccggacgactactcg
cgcggctggtgacggtggccccggcggcggggaaccgtcagcgacacgccgtcgcg
gacgacgcccggcgggaccggccccggacgaccgcggcacgaaacggccggggcctccc
cggaccgtacgacgggggctcctcgcctcctgctcgtctgacggccgggacaccggc
ccagcatcgccctggcgaccgggctgacctggccgcgtcggcctcgggctcggccagc
cgctcatcgcaagcagctcgtggactccagcggccgcggcaggtgctctggcgttcc
tgctgctcctgtcgggctcttcggccgagggccggcggagcgatcggccgcttcc
tgctggaccgcatgggagggcgtggtccgatggtgcggccacgggctcgtctcgcgg
ctgctgcggctggaaatgcgggagatggaccggcaccgccgggtgacctggtctcccgc
gtcaccgccgacaccacctgctcgggacgtcgtctccaggcactggtgacctgctc
accggctgctcgtctcggccgggctgctgctgatgctgtggctcgaaccgctgctg
ctgctcctggtcgtggcgagcgggtggccctcggcggcggcgtcgtcggcacgctcctcaa
gggcatcggggtggcgtcggagcagatgcagacctcgtgggcccgtcggccgcaact
ggaacgcgccctcggcgcctcggggtggtccgctgtaccgcgccgaggaa

>LP3

atgtacgagcaggagctcaaggaagagttcaccgcgaggactacgttccccgatgct
ggccgaggtcggcgaattcagcgaggacacgctgggctacggaaacgcgtgggacagcaa
gaacggcctcttctaagataggtctgaacagtattgacaccgggtacgtagtacttccg

gatcactcggcagccgaaaatgccatcgggtcgacggcagcccgaattccgctcgtggcg
tcgcacgattcgggaaggccgtggctgttggggcggcggccggcaggtcaggttgcgtg
gcgacgaaggcccggtcgggtggcgggtgatcggggcttcccggtcaccgcccag
ttgggcccgttcgctcgtacgtgcgaacctctccgatgtgggaacctggcgaggaaa
ctccccgggtcgagcatctggcggtatccgtacacggccagacgcgtgtccaagggagc
atcgctcgggttgcaccccgtcttccacgctcgtgtcggggcgtggacgtggccgcagac
aggccgatctcctggcccatggccgacgcgagcatcgacgaggagagcctcggcgtt
cgcgtcgcattgtggccgactgctgcccggcccgtgagccacagaccgctgtggggcggc
gtctcggccctctctccggaccactgcttggctgggagaaggagcgggcgcgcgagatg
cgttgggtgggcctccggctcccgaacagtccctcggcgaaggcggcgaagggtcggg
gaggtcatggcggcccatggcgcacaggccaccggaggaaaggccgactcagcactgac
ctgtcggggggcatggactccacctcttgtgttctggccgctcgaagactcccgac
atactcacgttccggaccgctgaggccgacgtcaccaacgacgacccctgttcgctct
cacagcatcagcgcactgcccggccggaaacacatggctgcccccaaggagatctccg
tcgatcttaccgatcccggctcctgggcgagcaccgaggagccgtaccggttcatccgc
acgggggcccagactcgtacgtcgcgcgactcctggcggaaacacgggttccggccac
ctcgcgggacacggaggggacgaactgttccctccctcgtggttacctgcacgaactc
ctgctccgtcggccgggacggcattcagacacgtgcgcggatacagcgtctcaagcgg
tggccctggcggagaccgcggctgccctcctgcgccgggacgggtcgggtcctggtgg
caggaccaggccacacacctcaccgccccaccgccccgctgcgcaggccgggtcctcggg
tggggtctgtggccgttcgggctctccctgggtcaccgagactccaacgatctcgca
cggacggcattcctgcggaccgctgtcagacccccggtagccgagaacctcgggcag
caccagctgttgcctccttgcgcagcagtgcttctgcaccgctcctcagggaaccg
ttcgcgcgggagtcgatccacctggacatgccgttcttcgacgaccggctggtcagggcg
gtgctcggcgtcggccggaggagcggtcggatccgtggcgtacaaacctcgtgtcc
gaagcgatgagaggggtcctgcccacatggctcctcggccggtccaaaagggggagttc
agcaggacgtccgcatcggcatgaaggcgaatgtgccgccctgctcagcgtgttcgcc
gactccccgctcggccaggggctcctcagcgcgaccggctgaggtcagcctcctg
gccccagcggaaacaccacctcctgcaagacatcagatcctcctcggctgcgaatcg
tggctgcgtcgggtggaggcctcgacaccgactcactccggggagccttgtgtccatccg
tctgcgccctgatgtgtcctcggcgaacccccagggcacggtaactcctggaccaggc
caaggggctcactggcagctgaaccacgggtgccgcatactcaggcgtctcttga
cggtcacagtccggaggagatcggccggccatcggcggggttgcggatcggcctcga
ccgcgcgtcggggacgtcgacctggctacggaaacactcgaccgcggcgtctggcgg
gtcccgatgagcgttcccgtcgcacttcccacgcccggaggagcagggctacggcgt
ccggcaccactgatcggctcgggctcggccgcttctggccaaagccccgccacgacgg
ctgcgccgctgatggagatcgacgacaccgtgccaggccggcgaccgcccagggc
ctcgcggcacgtgaggcagtggtggcggctcagcctcgggtgcggccgagaaactgctg
cagcgttccatagcgacggccttgcctcgcgcgatcggggctgctggccgacctggtgc
accggtgtccgaccgaaccttcccgtcagcctgggtcagggcggaaaggcagctg
atcggcgagccctaccgcccggctattacgtgctgtgctcctcgtgtgacgagattc
ccaggagtatccggcaggccccgtgcgcgtatcgcgagcagttcgggtgacgaggtccg
tcacgggggtgggtcaggtggcggcggcctcgtcggggggcagccaacgcaggcgcgtc
acctcggagtgggagtgaaggccccgagtgcttggcgggtccagtagcggacctcc
ttggggcggcgtcgcgtcccggtagcgcgctggtgagttccgtgccgagcgcgcac
gtcatgccggtctcctccagtacctcc

>LP4

atggagtgaacgacctttacgagcccccagttggtggaggtcggcgaattcaccga
ggagaccaagggctttccgagggcagctggccggacaacgacaccgtgtggccctggta
cggcgccgggcgccgcagggctgacgagccgtgaacggcgacgtgtggttcgggctct
gccggacggctcggccggcatcggccgggacggctgctgcgcgcttcggcgacggcggc
cgtcgaacggcttcggccggccatggctgctggcacctggccggacgggcacatgac
ggctcggccgctcggagcggcagggctggcggtgatcggcggtgccaggtcaccgccga
cggcctcgcggcccgctggccgggtcgcggacatcacggacgtggagcaggccgtgcg
cggcctggccggcagccatcacgtggtggcgtcggcggcgggcgcgtctgggtgcgcgg
cagcgcctccggcagcggctggtcttccgacccgggtggcgggcgcgaagtggcgc
cgaccgttcgacgtcctggcggcgtgaccggagcgggctcgcgagggaggccctggc
gctccacctgctgctcctcggcccgctaccgctggacaccgggtgctgtggcgcgg
tgtcagggcgtaccccggagcacggcctgctcctcgaaccggacggccggcccgta
ccgccgtggtggagccctccggaaccgggtgcggcccccggggcgggagcggccgacat
ccgtcagcgcgctgaccgcggcctcgggtcctgtacggccggggcgggacggtcagcg
cggatctctccggcggcctggactccaccagcctgtgcttctcgcggcccgggccgg
ggcgcctggtcaccctgcaactggacgggcccgcgatccggcgaacgacgacacctctggg
ccacgcggggcggccggaactcccgggcgcggaatgcgtgctgcccgcactctccgc
agcactcccgtacggcatgttcgacgcggcggtcttgtccccgatgagccgggacact
gggtgcgcgacccgggaagcgggcccggcgccgcgctgatggccgcggaaggctcac
gggtcacctcaccggggggcgggggacgaactcttcgtggcccccaccgcacacatgt
atgactacgtgcgcagccaccgctcgcggcgtcggccggtccgcagaatccgggccc
tccggcgcatecccgcggcggcgtgctgcgcggcctcgcctgcccgcactcctcggcc
agtggctggcccgtggcgggacgacctcaccggccggacacggccctgccccgatt
ccgcggggcgaactcagcgtggcctgggggagacgcggcgcgcatgccccctgggcgaca
cccgacgggtgcacacggcgggagctgctgcgggcccgcggcggcggcaggtccccg
ccctggcccgcgagcagggccagcacggcgcctcacctcgtccggacgggagggcgg
cgctgcgcgtggtgaaccagaccggcctcggccggaaactcggcccccgtacctcgc
gacggcgtcctcgcacacggcactggcctcgcgctcggcagcgaacgccccggaccgc
tacaaccggctcctcggcagccctcgcggcgcctcgtgccgcgccccctcctccggcgc
accaccaaaaggcgagttctccatggagctgtacgagggcgtggccgcggcaaggcggcc
ctcctcgcagctcttcgggactccgccctcgtccgtgcccggctcgtcgcaccccgggccc
ctgcgcacgcagctgctcggccccggccccggcggacatgctgcgccacctcgacccc
acctcggctcgaactctggctcggcggccccggcacagccccaccgtcaccggagga
cccactgaccatcggcctgcgtcccgatgtctgcgccaccgacaccacgacggcatgg
tgtgctcgcagaggccaccggcctactggcagctcaacagcaccggcgcctcgtcc
tgcgcgcccctcctcgcagggcggcaccggcagggagggcgtaccgctcggcagcggc
atccgcacctggccggcgaacaggccggcagcgtccgggcccctgctcggcgcgctgt
ccgggcccggcgtcgtggtgcccgatgagccaccatgatctacggaagcgggcccggc
ggcggtccccggcaccgctccccgctcctcctggcgtcggccaccggctgct
catcctgctcccggcccgcctcgcggcgtcctcaccgctacggcggcggcgc
accgccaccggccaggcactaccgcccggcggcagctacggcgggtgagcctgcg
ctgcggggagagggatgctccagcgttccgtgccaccgcttctgtgcccggatgcg
ggcggtgtggcccactggtgcaccggagtacggacagccggtccgcgcccacgctg
ggcgaaggtggacggcccccggcggcggagcagcagccaccgggctactaccaccg
cctcatgaccgtccccggcgtacggcgtccccaccggccatgaccgccccacctctcga
cggatcatccggccggcggcggtgaagaaggaccgcccggtagtcggccggcagacccc

ccacctgcttgaggaagtgggtgccggaggttgttcgccgtgccgaggccgctcagctcgc
 cgatccgctccaccggcaggtccgctcgactccaggaggctctgggcccgcgcgaggcgt
 ggttgaggagccactggagcggcgtcgtgccggtgccgcccgaagacggcggtagaag

G.2. Lazo péptidos de comparación

Tabla G.5: Lazo péptidos de comparación usados para modelos in silico.

PDB	Clase	Nombre	Organismo	Referencia
2ls1	I	Sviceucin	<i>Streptomyces sviceus</i>	(Li et al., 2015a)
2lti	II	Astexin1	<i>Asticcacaulis ex-centricus</i>	(Allen et al., 2016; Maksimov et al., 2012b)
2lx6	II	Caulosegnin I	<i>Caulobacter segnis</i>	(Hegemann et al., 2013)
2m37	II	Astexin-1	<i>Asticcacaulis ex-centricus</i>	(Zimmermann et al., 2013)
2m8f	II	Astexin3	<i>Asticcacaulis ex-centricus</i>	(Maksimov and Link, 2013)
2mfv	II	Xanthomonin ii	<i>Xanthomonas gardneri</i>	(Hegemann et al., 2014b)
2mlj	II	Caulonodin V	<i>Caulobacter sp. (strain K31)</i>	(Zimmermann et al., 2014)
2mmt	II	Microcin J25	<i>Escherichia coli</i>	(Hegemann et al., 2014a)
2mmw	II	Microcin J26	<i>Escherichia coli</i>	(Knappe et al., 2011)
2mw3	II	Streptomomicin	<i>Streptomonospora alba</i>	(Metelev et al., 2015)
2n5c	II	Chaxapeptin	<i>Streptomyces leeuwenhoekii</i>	(Elsayed et al., 2015)
2n68	II	Astexin1	<i>Asticcacaulis ex-centricus</i>	(Zong et al., 2016)
2n6u	II	Astexin2-dC4	<i>Asticcacaulis ex-centricus</i>	(Maksimov et al., 2015)
2n6v	II	Astexin3	<i>Asticcacaulis ex-centricus</i>	(Allen et al., 2016; Maksimov et al., 2015)
4nag	II	Xanthomonin I	<i>Xanthomonas gardneri</i>	(Hegemann et al., 2014b)
5d9e	II	Caulosegnin II	<i>Caulobacter segnis</i>	(Hegemann et al., 2016)

Tabla G.5: Lazo péptidos de comparación usados para modelos in silico.

PDB	Clase	Nombre	Organismo	Referencia
5gvo	II	Sphaericin	<i>Planomonospora sphaerica</i>	(Kodani et al., 2017)
5jqf	II	Sphingopyxin I (SpI)	<i>Sphingopyxis alaskensis</i>	(Fage et al., 2016)
5oqz	II	Rubrivinodin	<i>Rubrivivax gelatinosus</i>	(Jeanne Dit Fouque et al., 2018)
5tj1	II	Benenodin-1-dC5, state 1	<i>Asticcacaulis benevestitus</i>	(Zong et al., 2017)
5ui6	II	Acinetodin	<i>Acinetobacter gyllenbergii</i>	(Metelev et al., 2017)
5ui7	II	Klebsidin	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Metelev et al., 2017)
5xm4	II	Subterisin	<i>Novosphingobium subterraneum</i>	(Kuroha et al., 2017)
6b5w	II	Benenodin-1-dC5, state 2	<i>Asticcacaulis benevestitus</i>	(Zong et al., 2017)
3njw	III	Bicyclic peptide BI-32169	<i>Streptomyces sp.</i>	(Nar et al., 2010)
5jpl	III	LP2006	<i>Nocardiopsis alba</i>	(Warren et al., 2017)

Tabla G.6: Aminoácidos característicos observados en lazo péptidos templados para modelos in silico

PDB	aa ciclo	aa en asa	aa antes del ciclo (aa en contacto)	aa después del ciclo (aa en contacto)	Largo	Método
2ls1	9	6	T (pdeH W3, V2)	A (pdeH C7)	20	NMR
2lti	9	8	E17 (pdeH G5, Q4, D9)	S18 (pdeH G1, Q12)	23	NMR
2lx6	8	7	R15 (pdeH G14)	E16	19	NMR
2m37	9	5	Y14 (pdeH S3)	F15 (pdeH E7)	19	NMR
2m8f	9	6	Y15 (pdeH G1, M5)	W16 (pdeH G1)	24	NMR
2mfv	7	3	G10 (pdeH G1, G2)	G11	14	NMR
2mlj	9	7	Y16 (pdeH S1, g3)	W17	18	NMR
2mmt	8	11	F19 (pdeH G2)	Y20 (pdeH V6, G4)	21	NMR
2mmw	8	11	F19 (pdeH G2)	Y20 (pdeH V6)	21	NMR

Tabla G.6: Aminoácidos característicos observados en lazo péptidos templados para modelos in silico

PDB	aa ciclo	aa en asa	aa antes del ciclo (aa en contacto)	aa después del ciclo (aa en contacto)	Largo	Método
2mw3	9	5	P14	A15 (pdeH Y7)	21	NMR
2n5c	8	4	L12 (pdeH G1)	N13 (pdeH P6, L7)	15	NMR
2n68	9	5	Y14 (pdeH S3)	F16 (pdeH S3)	23	NMR
2n6u	9	6	F15 (pdeH G1)	R16 (pdeH T3)	19	NMR
2n6v	9	6	Y15 (pdeH G1)	W16 (pdeH T3, G1, M5)	24	NMR
4nag	7	3	G10 (pdeH G2, E7)	G11 (pdeH L4)	16	Difracción de rayos X
5d9e	9	6	H15 (pdeH T2)	Y16 (pdeH L7)	18	Difracción de rayos X
5gvo	9	5	W14 (pdeH L2)	Y15 (pdeH W7, W6)	18	NMR
5jqf	9	6	H15 (pdeH G6, E3)	Y16 (pdeH P7)	21	Difracción de rayos X
5oqz	9	7	Q16 (pdeH N7, E9)	R17 (pdeH A2, G1)	18	Difracción de rayos X
5tj1	8	6	E14	Q15 (pdeH R6)	19	NMR
5ui6	8	8	Y16 (pdeH G1)	Y17 (pdeH I6)	18	NMR
5ui7	8	9	H17 (pdeH S2, G1)	Y18 (pdeH I6)	19	NMR
5xm4	8	4	L12	A13 (pdeH R6)	17	NMR
6b5w	8	7	Q15 (pdeH R6)	A16	19	NMR
3njw	9	5	N14 (pdeH L2)	T15 (pdeH C6)	19	Difracción de rayos X
5jpl	8	4	S12 (pdeH E8, F7)	C13 (pdeH R2, G1)	17	NMR

Tabla G.7: Características estructurales observadas y actividad de lazo péptidos templados para modelos in silico

PDB	Secuencia aa	Características	Actividad
2ls1	CVWGGD- CTDFLGCGT- AWICV	Con forma para ajustar T, con onda suave, enlaces disulfuro compactan estructura, poco compactado con puentes de hidrógeno	Inhibitoria contra algunas bacterias gram positivas
2lti	GLSQGVEPD- IGQTYFEE- SRINQD	Con forma para ajustar E17, enlace del anillo cubierto por el asa, compactación a través de puentes de hidrógeno	Baja actividad antimicrobiana sobre <i>Caulobacter crescentus</i> , sin otra actividad conocida
2lx6	GAFVGGQPE- AVNPLGR- EIQG	Ajusta R15 con onda suave en el ciclo, poco compacto	Sin actividad conocida
2m37	GLSQGVEPD- IGQTY- FEESR	F14, F15 residuos aromáticos grandes, estructura del ciclo adecuada a los residuos con onda pronunciada, poco compacto	Antiviral contra VIH, inhibidor del receptor del glucagón, del receptor endotelial tipo B y del factor natriurético atrial, actividad antimicrobiana
2m8f	GPTPMVGLD- SVSGQY- WDQHAPLAD	Y15, W16 residuos aromáticos grandes, estructura adecuada a los residuos pero con ondas suaves en el ciclo, estructura compacta con enlace del ciclo escondido por el asa	Sin actividad conocida
2mfv	GGPLAGE- EMG-GITT	Residuos pequeños atraviesan el ciclo, ciclo uniforme, molécula pequeña, compacta pero con pocos puentes de hidrógeno	Sin actividad antimicrobiana
2mlj	SIGDSGLRE- SMSSQTY-WP	Y16, W17 residuos aromáticos grandes, estructura adecuada a los residuos con ondas suaves en el ciclo, poco compacto con puentes de hidrógeno	Sin actividad conocida
2mmt	GGAGHVPE- YFVRGDFPISF- YG	Asa larga, 2 aa de cola, ciclo ondas pequeñas, F19, Y20 residuos aromáticos grandes	Inhibidor de RNA polimerasa gram negativa, inhibidor de Poly endopeptidasa

Tabla G.7: Características estructurales observadas y actividad de lazo péptidos templados para modelos in silico

PDB	Secuencia aa	Características	Actividad
2mmw	GGAGHVPE- YFVRGDTPISF- YG	Asa larga, 2 aa de cola, ciclo ondas pequeñas, F19, Y20 residuos aromáticos grandes	Sin actividad conocida
2mw3	SLGSSPYND- ILGYF- ALIVIYP	Estructura del ciclo adecuado a P14, poco compacto, asa cubre enlace del ciclo	Actividad antimicrobiana
2n5c	GFGSKPLD- SFGL-NFF	Estructura adecuada a L12, enlace del ciclo cubierto por el asa, estructura compacta con puentes de hidrógeno	Actividad inhibidora significativa contra línea celular de cáncer de pulmón humano A549, actividad antibacteriana contra bacterias gram positivas
2n68	GLSQGVEPD- IGQTY- FEESRINQD	Estructura sin enlace del ciclo en el archivo PDB, estructura adecuada a los residuos Y14, F15 (aromáticos, grandes), asa y ciclo compactos, cola no compacta	Sin actividad conocida
2n6u	GLTQIQALD- SVSGQF- RDQLG	F15, R16 residuos grandes, ciclo adecuado con onda pronunciada, compacto por puentes de hidrógeno, estructura sin enlace del ciclo en el archivo PDB, asa cubre enlace del ciclo	Sin actividad conocida
2n6v	GPTPMVGLD- SVSGQY- WDQHAPLAD	Estructura adecuada a los residuos que Y15 y W16 (aromáticos, grandes), asa y ciclo compactos con puentes de hidrógeno, cola sin compactar	Sin actividad conocida
4nag	GGPLAGE- EIG-GFNVPG	Ciclo uniforme, estructura compacta por puentes de hidrógeno, residuos que atraviesan el ciclo pequeños	Sin actividad antimicrobiana
5d9e	GTLTPGLPE- DFLPGH-YPG	Ciclo ajustado para H15 con ondas pequeñas (aromático, grande)	Sin actividad conocida

Tabla G.7: Características estructurales observadas y actividad de lazo péptidos templados para modelos in silico

PDB	Secuencia aa	Características	Actividad
5gvo	GLPIGW ^W ^E - RPSG ^W -YFPI	W14 residuo grande aromático el ciclo tiene una bajada para que este entre bien en la estructura, compacto con puentes de hidrógeno	Actividad antibacteriana específica contra <i>Micricoccus luteus</i>
5jqf	GIEPLG ^P ^V ^D - EDQGE ^H - YLFAGG	Ciclo ajusta H15 (aromático grande) con una bajada amplia, asa cubre enlace del ciclo, ciclo y asa compactos	Sin actividad conocida
5oqz	GAPSLIN ^S ^E - DNPAFP ^Q - ^R ^V	Asa larga, 2 aa de cola, ciclo con pequeñas ondas, estructura compacta	Sin actividad conocida
5tj1	G ^V ^G ^F ^G ^R ^P ^D - SILT ^Q ^E - ^Q ^A ^K ^P ^M	Ciclo con ondas pequeñas, estructura compacta	Sin actividad conocida
5ui6	G ^G ^K ^G ^P ^I ^F ^E - TWVTEGN ^Y - ^Y ^G	2 aa de cola, ciclo con ondas suaves, estructura sin enlace del ciclo en el archivo PDB	Sin actividad conocida
5ui7	G ^S ^D ^G ^P ^I ^E - FFNPNGVM ^H - ^Y ^G	2 aa de cola, ciclo con ondas suaves, estructura sin enlace del ciclo en el archivo PDB, compacto	Sin actividad conocida
5xm4	G ^P ^P ^G ^D ^R ^I ^E - FGV ^L - ^A ^Q ^L ^P ^G	Ciclo ondas suaves, estructura compacta	Sin actividad conocida
6b5w	G ^V ^G ^F ^G ^R ^P ^D - SILT ^Q ^E ^Q - ^A ^K ^P ^M	Entrada grande en el ciclo para encajar Q15, estructura compacta a través de puentes de hidrógeno	Sin actividad conocida
3njw	GLPWGC ^P ^S ^D - IPGWN ^N - ^T ^P ^W ^A ^C	LP con enlace disulfuro entre cisteína dentro del ciclo y cisteína terminal, ciclo adecuado a los residuos con ondas pequeñas, estructura compacta	Inhibidor sobre el receptor de glucagón humano
5jpl	G ^R ^P ^N ^W ^G ^F ^E - NDWS ^S - ^C ^V ^R ^V ^C	Enlace disulfuro entre cisteína terminal y cisteína que cruza el ciclo, estructura compacta, ondas suaves en ciclo	Actividad antimicrobiana

Tabla G.8: Resumen del gráfico de Ramachandran para los lazo péptidos templados.

PDB	N° residuos en región favorable (~98.0 % esperado)	N° de residuos en región permitida (~2.0 % esperado)	N° de residuos en región atípica	Residuos en región atípica
2ls1	13 (72.2 %)	5 (27.8 %)	0 (0.0 %)	
2lti	9 (42.9 %)	6 (28.6 %)	6 (28.6 %)	Ser3, Gln4, Glu7, Pro8, Thr13, Arg19
2lx6	15 (88.2 %)	1 (5.9 %)	1 (5.9 %)	Val10
2m37	14 (82.4 %)	3 (17.6 %)	0 (0.0 %)	
2m8f	10 (45.5 %)	8 (36.4 %)	4 (18.2 %)	Asp9, Trp16, His19, Ala20
2mfv	8 (66.7 %)	2 (16.7 %)	2 (16.7 %)	Gly6, Gly10
2mlj	14 (87.5 %)	1 (6.2 %)	1 (6.2 %)	Ser5
2mmt	16 (84.2 %)	3 (15.8 %)	0 (0.0 %)	
2mmw	13 (68.4 %)	5 (26.3 %)	1 (5.3 %)	Asp14
2mw3	16 (84.2 %)	2 (10.5 %)	2 (5.3 %)	Leu2
2n5c	11 (84.6 %)	1 (7.7 %)	1 (7.7 %)	Pro6
2n68	15 (71.4 %)	5 (23.8 %)	1 (4.8 %)	Arg19
2n6u	16 (88.9 %)	2 (11.1 %)	0 (0.0 %)	
2n6v	18 (81.8 %)	4 (18.2 %)	0 (0.0 %)	
4nag	25 (89.3 %)	3 (10.7 %)	0 (0.0 %)	
5d9e	14 (100.0 %)	0 (0.0 %)	0 (0.0 %)	
5gvo	11 (73.3 %)	4 (26.7 %)	0 (0.0 %)	
5jqf	36 (94.7 %)	2 (5.3 %)	0 (0.0 %)	
5oqz	16 (100.0 %)	0 (0.0 %)	0 (0.0 %)	
5tj1	11 (64.7 %)	3 (17.6 %)	3 (17.6 %)	Arg6, Leu11, Lys17
5ui6	8 (50.0 %)	4 (25.0 %)	4 (25.0 %)	Gly2, Glu8, Trp10, Tyr17
5ui7	11 (64.7 %)	6 (35.3 %)	0 (0.0 %)	
5xm4	11 (78.6 %)	2 (14.3 %)	1 (7.1 %)	Pro3
6b5w	14 (82.4 %)	3 (17.6 %)	0 (0.0 %)	
3njw	15 (88.2 %)	2 (11.8 %)	0 (0.0 %)	
5jpl	8 (53.3 %)	4 (26.7 %)	3 (20.0 %)	Asn4, Asn9, Val16

Tabla G.9: Distancias del enlace que forma el ciclo de los lazo péptidos reportados

PDB	Distancia	Nota
2ls1	1,356	
2lti	1,337	
2lx6	1,356	
2m37	1,355	
2m8f	1,241	
2mfv	1,365	
2mlj	1,354	
2mmt	1,354	
2mmw	1,354	
2mw3	1,327	
2n5c	1,334	
2n68	1,335	Enlace no presente en el archivo PDB
2n6u	1,335	Enlace no presente en el archivo PDB
2n6v	1,335	
4nag	1,339	
5d9e	1,345	
5gvo	1,330	
5jqf	1,299	
5oqz	1,334	
5tj1	1,335	
5ui6	1,796	Enlace no presente en el archivo PDB
5ui7	1,719	Enlace no presente en el archivo PDB
5xm4	1,329	
6b5w	1,336	
3njw	1,338	
5jpl	1,328	