

# Tabla de Contenido

Lista de Figuras .....	xv
Lista de Tablas .....	xvii
1 Introducción.....	1
1.1 <i>Salinispora tropica</i> .....	2
1.2 Producción de Salinosporamide A .....	4
1.3 Ingeniería Genética y Metabólica de <i>Salinispora spp.</i> .....	5
1.3.1 Biosíntesis dirigida.....	5
1.3.2 Clúster de genes biosintético de salinosporamida .....	6
1.3.3 Herramientas moleculares .....	9
1.4 Eliminación racional de genes .....	10
1.5 Modelo a escala genómica .....	11
2 Hipótesis.....	13
3 Objetivos .....	13
3.1 Objetivo General .....	13
3.2 Objetivos específicos .....	13
4 Parte I Crecimiento de <i>Salinispora tropica</i> y determinación de Salinosporamide A.....	15
4.1 Introducción .....	15
4.1.1 Estudios de sensibilidad de la cepa a antibióticos.....	16
4.1.2 Determinación de Salinosporamide A.....	16
4.2 Metodología.....	17
4.2.1 Medios de cultivo .....	17
4.2.2 Antibióticos .....	19

4.2.3 Cepa.....	19
4.2.4 Reactivos .....	19
4.2.5 Condiciones de Cultivo.....	19
4.2.6 Extracción y determinación de metabolitos secundarios .....	20
4.3 Resultados y Discusión.....	21
4.3.1 Ensayos de sensibilidad en <i>Salinispora tropica</i> .....	21
4.3.2 Crecimiento de <i>Salinispora tropica</i> en medio complejo A1.....	22
4.3.3 Crecimiento de <i>Salinispora tropica</i> en medios mínimos.....	23
4.3.4 Determinación de Salinosporamida A en medios de cultivo .....	25
4.3.5 Determinación de Salinosporamida A producido en medios mínimos	
28	
5 Parte II Delección Racional de Genes .....	31
5.1 Introducción .....	31
5.1.1 Minería genómica de <i>Salinispora tropica</i> .....	32
5.1.2 Modificaciones genéticas realizadas en <i>Salinispora</i> .....	34
5.2 Metodología .....	36
5.2.1 Materiales .....	36
5.2.2 Métodos generales de Biología molecular .....	36
5.2.3 Modificaciones genéticas .....	36
5.3 Resultados y Discusión.....	39
5.3.1 Determinación de sitios de Delección.....	39
5.3.2 Generación de cebadores .....	39
5.3.3 Construcción de vectores de transformación .....	41
5.3.4 Transformación ET12567/pUZ8002.....	45
5.3.5 Conjugación de <i>Salinispora</i> .....	45

5.3.6 Producción Salinosporamida A en cepas conjugadas .....	47
6 Parte III Uso de Modelos a Escala Genómica (GSM).....	49
6.1 Análisis con el Modelo a Escala Genómica .....	49
6.2 Pruebas con el modelo a escala genómica .....	50
6.2.1 Predicciones sobre la producción de Salinosporamida A.....	50
6.2.2 Integración de datos cuantitativos y generación de modelo minimizado .....	51
6.2.3 Evaluación de predicciones del Modelo a Escala genómica .....	51
6.2.4 Equipos y programas .....	53
6.2.5 Configuración del Equipo:.....	53
6.2.6 Procedimiento: .....	54
6.2.7 Métodos de Ingeniería Metabólica.....	56
6.3 Resultados y Discusión.....	58
6.3.1 Contextualización de modelos y producción de Salinosporamida A	
58	
6.3.2 Integración de datos al modelo a escala genómica .....	61
6.3.3 Evaluación <i>in-silico</i> de modificaciones genéticas .....	65
7 Conclusiones .....	72
8 Bibliografía.....	74
Anexos.....	82
Anexo I Reactivos y Buffers .....	82
Anexo II Ensayos de Biología Molecular .....	85
<i>Ensayos de Sensibilidad a antibióticos Salinispora tropica CNB440</i> .....	85
<i>Determinación de crecimiento de Salinispora tropica CNB-440</i> .....	85
<i>Método de aislamiento de cepa CNB-440</i> .....	86

<i>Extracción de ADN genómico.</i> .....	86
<i>PCR de colonias conjugantes de S. tropica</i> .....	87
<i>PCR para clonación de fragmentos</i> .....	88
<i>Protocolo de conjugación para Salinispora tropica</i> .....	90
<i>Obtención de dobles conjugantes y confirmación de transformación.</i> ...	91
Anexo III Cepas, Vectores y Cebadores .....	93
Anexo IV Scripts de Matlab .....	95