UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS FISICAS Y MATEMÁTICAS

DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUIMICA BIOTECNOLOGIA Y MATERIALES

MANEJO DE LA PRODUCCIÓN DE SALINOSPORAMIDA A EN *SALINISPORA TROPICA* CNB-440 EMPLEANDO INGENIERÍA GENÉTICA Y METABÓLICA

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS DE LA INGENIERIA MENCION INGENIERIA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGIA

VIANEY DIANA SAUCEDO HERNÁNDEZ

PROFESOR GUÍA:
BARBARA ANDREWS FARROW
PROFESOR CO-GUÍA:
JUAN A. ASENJO DE LEUZE

MIEMBROS DE LA COMISION
ORIANA SALAZAR AGUIRRE
ALVARO OLIVERA NAPPA
CRISTINA DORADOR ORTIZ

SANTIAGO DE CHILE
2019

RESUMEN DE LA TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE: Doctora en Ciencias de la ingeniería, mención Ingeniería Química y Biotecnología
POR: Vianey Diana Saucedo Hernández
FECHA: Enero 2019
PROFESORES GUÍAS: Dra. Barbara Andrews y Dr. Juan A. Asenjo

MANEJO DE LA PRODUCCIÓN DE SALINOSPORAMIDE A EN *SALINISPORA TROPICA* CNB440 EMPLEANDO INGENIERÍA METABÓLICA Y GENÉTICA

Salinosporamide A es un citotóxico que se ha probado en el combate de diversos tipos de cáncer y malaria. Actualmente se encuentra en las fases II y III de aprobación como anticancerígeno. Las ventajas que presenta este ante otros citotóxicos son mayor actividad a bajas concentraciones, actúa sobre el sistema proteasoma-ubiquitina, que genera la apoptosis en células, y es altamente específico.

Este metabolito secundario es producido naturalmente por una bacteria actinomicetos estrictamente marina, *Salinispora tropica* y necesita una fuerza iónica específica en el medio para crecer. Debido a su naturaleza es una promisoria fuente de metabolitos secundarios de uso farmacéutico y por esta razón, está constantemente bajo estudio. La cepa CNB440 es la cepa representativa de la especie y cuenta con un modelo metabólico a escala genómica. El objetivo del presente trabajo es implementar diversas estrategias metabólicas y genéticas que permitan modificar la bacteria y aumentar la producción de Salinosporamide A.

El capítulo 4 de la presente Tesis, detalla los ensayos realizados para poder establecer los protocolos de crecimiento de la bacteria y determinación de Salinosporamide A. Se definió la sensibilidad de la bacteria a kanamicina (100 ug/ml), tioestreptona (12 µg/ml) y apramicina (12 µg/ml). Se definió la curva de crecimiento de la bacteria y mediante el crecimiento en diversos medios mínimos se pudo establecer la metodología de determinación de Salinosporamide A.

El capítulo 5 describe la estrategia genética utilizada para modificar la bacteria y a su vez generar una mayor concentración de Salinosporamide A. La estrategia a seguir fue mediante recombinación homologa con el vector sensible a temperatura (pGM1190) y transferido a *S. tropica* mediante conjugación con la cepa *E. coli* ET12567/pUZ8002, para delecionar sitios específicos del cromosoma de *S. tropica*. Estas herramientas moleculares han sido empleadas exitosamente en la transformación de diversos *Streptomyces*, pero no habían sido probadas en Salinispora. Los sitios a delecionar que se sugirieron para aumentar la producción del metabolito secundario fueron 3 clústeres de genes sporolides, linfostina y salinilactam. Pero debido a diversas complicaciones en el desarrollo de la presente solo se evaluó la deleción del clúster de genes sporolides. Con lo que se observó un aumento del 20% en la producción del metabolito.

El capítulo 6 detalla el uso del modelo a escala genómica iCC908 para aumentar la producción de Salinosporamide A. La primera etapa consistió en establecer el ambiente de trabajo del modelo, con esto también se identificó *in silico* la suplementación del medio de producción, para obtener más Salinosporamide A. En esta etapa también se integraron datos de crecimiento y determinación de Salinosporamide A. Para aumentar la exactitud del modelo. La segunda etapa consistió en aplicar diversos algoritmos OptKnock, OptGene, OptOrf, GDLS, FSEOF, que buscaran dentro del modelo a escala genómica reacciones o genes que pudieran ser bloqueados o sobrexpresados para aumentar la producción del metabolito secundario. Se encontraron diversos candidatos que fueron evaluados *in silico* y se propuso evaluar el bloqueo de dos genes. Como última parte se evaluó mediante complementación de sustratos las rutas metabólicas que aumentan la producción mediante la sobreexpresión de genes. La tirosina a una concentración 5mM logró aumentar en un 180%. la producción del metabolito secundario, mediante la presencia de más fenilalanina en el medio.

Con estos resultados se logró obtener un medio de producción mediante el uso del modelo a escala genómica que aumentó 2.8 veces la producción de Salinosporamide A. Se logró

transformar la cepa mediante herramientas genéticas utilizadas previamente en *Streptomyces.*

SUMMARY OF THE THESIS FOR THE DEGREE IN: Doctor in Engineering Sciences, mention chemical Engineering and Biotechnology., mención Ingeniería Química y Biotecnología
BY: Vianey Diana Saucedo Hernández
DATE: January 2019
SUPERVISORS: Dra. Barbara Andrews and Dr. Juan A. Asenjo

MANAGEMENT OF THE PRODUCTION OF SALINOSPORAMIDE A IN *Salinispora tropica* CNB440 USING METABOLIC AND GENETIC ENGINEERING

Salinosporamide A is a cytotoxic that has been proven to combat various types of cancer and malaria. It is currently in phases II and III of approval as an anticarcinogen. The advantages that poses over other cytotoxics are greater activity at low concentrations and highly specific. It acts on the proteasome-ubiquitin system, responsible of apoptosis in cells.

This secondary metabolite is naturally ocurred in the actinomycetes bacterium strictly marine, Salinispora tropica that needs a specific ionic force in the medium to grow. Due to his nature it is a promisory source of secondary metabolites for pharmaceutical use hereby is constantly studied. The CNB440 strain is the representative strain of the species and posses a Genome-Scale Metabolic Model (GSM). The goal of this work was to implement diverse metabolic and genetic strategies that allow improve the production of Salinosporamide A.

Chapter 4 of this thesis details the proves to establish the protocols for growth and determination of Salinosporamide A, Define the sensitivity of bacteria to kanamycin (100 ug/ml), thiostreptone (12 µg/ml) and apramycin (12 µg/ml). The growth curves in several minimum mediums, and stablish the methodology for the determination of Salinosporamide A.

Chapter 5 describes the genetic strategy used to modify the bacterium and generate a higher concentration of Salinosporamide A. The strategy followed was by recombination homologous with the temperature sensitive vector (pGM1190) and transferred to *S. tropica* by conjugation with the strain *E. coli* ET12567/pUZ8002, to delete specific sites on the chromosome of *S. tropica*. These molecular tools have been successfully used in the transformation of various *Streptomyces*, but had not been tested in Salinispora. The sites suggested to be deletedto increase the production of the secondary metabolite were 3 clusters of genes sporolides, lymphostine and salinilactam. But due to various complications in the development of the present work only the deletion of the sporolide gene cluster was evaluated and this resulted in an increase of 20% in metabolite production.

Chapter 6 details the use of genome-scale metabolic model iCC908 for increase the production of Salinosporamide A. The first stage consisted in establishing the working environment of the model, to increase the accuracy of the model, integrated growth data, metabolites in medium production and determination of Salinosporamide A, with this was also able define *in silico* the supplementation of medium production, to obtain more Salinosporamide A. . The second stage consisted of applying different algorithms OptKnock, OptGene, OptOrf, GDLS, FSEOF, which browse reactions or genes within the genome-scale model that could be, deleted, blocked or overexpressed to increase the production of the secondary metabolite. We found several candidates that were evaluated *in silico* and we proposed to evaluate the deletion of two genes. As the last stage, were evaluated the metabolic pathways that increase production by gene overexpression. The evaluation of this metabolic pathways consist in add diverse substrates that increase the flow in the pathway of the gene to be overexpresed, tyrosine at a concentration of 5mM increase the production of the secondary metabolite Salinosporamide A by 180%, enhancing the presence of phenylalanine in the medium.

With these results it was possible to obtain a medium production that increased in 2.8 times Salinosporamide A by fermentation based on the use of the genome-scale metabolic model. And also was possible transform the strain *S. tropica* with genetic tools previously proved in *Streptomyces*.

Nadie puede recibir nada a menos que Dios se lo conceda desde el cielo.

Juan 3:27

Agradecimientos

A CONICYT, por la "Beca de Doctorado para extranjeros 2013" con No. De Folio 63130220, otorgada para realizar estudios de Doctorado en Chile.

A la Universidad de Chile por el apoyo prestado para desarrollar las actividades académicas necesarias para poder optar al Grado de Doctor.

Al Centro de Biotecnología y Bioingeniería, por el apoyo y las instalaciones prestadas para realizar la investigación presentada en la presente Tesis.

En especial a los profesores guía Dra. Barbara Andrews y Dr. Juan Asenjo, por la confianza depositada en mí y por la ayuda incondicional, durante todo el desarrollo de la Tesis.

A los profesores del Area de Biotecnología, Dra. Oriana Salazar, Dra. María Elena Lienqueo, Dra. Ziomara Gertzen y Dr. Alvaro Olivera. Por ayudarme a comprender la Biotecnología y las herramientas que utiliza. A la Dra. Cristina Dorador por aceptar ser parte de mi comité revisor.

A Nancy Carrasco, por todas las facilidades para poder realizar el trabajo en el laboratorio.

También le agradezco a los compañeros del CEBiB que fueron mis guías para el desarrollo de esta tesis: Jean Castro, Vida Rodríguez, Diego Lagos, Valeria Razmilic y Carolina Contador.

A los compañeros del CEBiB, que estuvieron ahí para hacer la vida más amena en el trabajo. Gracias por hacer agradable el ambiente de trabajo.

Agradezco el apoyo de mis Padres, hermanos y sobrinos, que en todo este tiempo no dejaron de alentarme a terminar.

También a las buenas amistades que forme durante todo este tiempo en especial Juan Carlos, Nadia, Carlos, Dana, Medardo, Jahaira, Miriani, Allison, Galilea, Soledad, Cristina, Candy, Anett, Sandra, Francesca, Karima, Vale y Diego.

Tabla de Contenido

Lista de Figuras xv

Lista de Tablas xvii

1 Introducción 1

1.1 *Salinispora tropica* 2

1.2 Producción de Salinosporamide A 4

1.3 Ingeniería Genética y Metabólica de *Salinispora spp*. 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 *Salinispora tropica* y determinación de Salinosporamida A. 15

4.1 Introducción 15

4.1.1 Estudios de sensibilidad de la cepa a antibióticos. 16

4.1.2 Determinación de Salinosporamida 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 *Salinispora tropica* 21
4.3.2 Crecimiento de *Salinispora tropica* en medio complejo A1 22
4.3.3 Crecimiento de *Salinispora tropica* 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 Deleción Racional de Genes 31
5.1 Introducción 31
5.1.1 Minería genómica de *Salinispora tropica* 32
5.1.2 Modificaciones genéticas realizadas en Salinispora 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 Deleción 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 *Salinispora* 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 *in-silico* 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
Ensayos de Sensibilidad a antibióticos Salinispora tropica CNB440 85
Determinación de crecimiento de Salinispora tropica CNB-440..... 85
Método de aislamiento de cepa CNB-440 86

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

Lista de Figuras

Figura 1.1 Estructura molecular de Salinosporamide B, salinosporamide A (Eustaquio, et al., 2009), y Omuralide (Feling, et al., 2003)..... 4

Figura 1.2 Clúster de genes biosintético sal (Eustaquio et al. 2009; Lechner et al. 2011), genes codificados por color basado en la función confirmada/predicha: ensamble del anillo núcleo γ-lactam-β-lactona (gris), bionsintésis del cloroetilmalonil-CoA (rojo) y del aminoácido no proteinogénico L-3-ciclohex-2-enilainina (azúl), regulación y resistencia (amarillo), desconocida (blanco), y dos transposasas parciales (negro). 7

Figura 1.3 Vector pSET 152, que confiere la resistencia a apramicina a Streptomyces y se integra en el sitio attB. 10

Figura 4.1 Ensayo de sensibilidad en kanamicina para S. tropica. A) Sin antibiótico B) kanamicina 50 µg/ml y C) kanamicina 100 µg/ml..... 21

Figura 4.2 Ensayo de sensibilidad en apramicina para S. tropica. A) Sin antibiótico B)apramicina 12µg/ml y C)apramicina 100 µg/ml..... 22

Figura 4.3 Ensayo de sensibilidad en tioestreptona para S. tropica. A) Sin antibiótico B)tioestreptona 12 µg/ml y C)tioestreptona 50 µg/ml 22

Figura 4.4 Curva de crecimiento de S. tropica en medio A1..... 23

Figura 4.5 Curvas de crecimiento de S. tropica CNB440 en medios mínimos como fuente de carbono glucosa y celobiosa 23

Figura 4.6 Curva de crecimiento de medios mínimos como fuente de carbono xilosa, sacarosa, manosa, glicerol, rafinosa, D-galactosa y L-ácido glutámico. 24

Figura 4.7 Cromatograma de determinación de Salinosporamida A en columna Purospher 100 RP 18 (5µm), estandares y muestras. Las líneas, verde, gris y negra corresponden a la señal determinada por el detector UV del estándar de Salinosporamida A, en concentraciones de 250, 50 y 10 µg/ml. 25

Figura 4.8 Cromatograma estándar Salinosporamida A 250 ug/ml columna Lichrospher 100 RP C18 (5um)..... 27

Figura 4.9 Cromatograma de extracto de medio de producción de Salinosporamida A 27

Figura 4.10 Cromatograma estándar de Salinosporamida A 1µg/ml 28

Figura 4.11 Concentración de Saliosporamide A producido por cultivo de S. tropica en medios mínimos suplementado con diferentes fuentes de carbono, 1 medio minimo estándar, (2-22) (20mM), nitrógeno (21-29) (18.68 mM), fósforo (33) (36.29mM) y azufre (30-32) (0.81mM). .. 29

Figura 5.1 Representación del cromosoma de S. tropica CNB-440.Las líneas verdes indican los sitios donde se codifican los clusteres de Genes Biosintéticos (CGB's). 34

Figura 5.2 Diagramas de vectores de Conjugación basados en pGM1190 a) Véctor de conjugación con fragmentos de flanqueo y gen de resistencia a Kanamicina (Neo14) paso 1 b)Véctor de conjugación con fragmentos de flanqueo sin gen de resistencia. 37

Figura 5.3 Gradiente de temperatura en PCR para clonar los fragmentos flanqueantes de las deleciones. 41

Figura 5.4 PCR de colonias para verificar construcción de Vector SpA..... 42

Figura 5.5 Gel de ensayos de corte con enzimas de restricción sobre los vectores SpA, SlA y LymA. 43

Figura 5.6 Gibson Assembly de fragmentos Spo1+Neo+Spo2 44

Figura 5.7 Confirmación de conjugación de Salinispora tropica por vector SpA a) S. tropica sin antibiótico medio A1 b) S. tropica en presencia de apramicina y ácido nalidixico (-) c) S. tropica + E. coli sin presencia de antibioticos (+) d) S.tropica + E. coli en apramicina y ácido nalidixico, bacterias conjugantes 45

Figura 5.8 Fotos de S. tropica a)sin conjugar y b)conjugadas tomadas al microscopio 100X 46

Figura 5.9 Confirmación de transformación de S. tropica por PCR 47

Figura 5.10 Concentración de Salinosporamida A producida por S.tropica en cepa nativa y mutantes con cluster de genes Spo delecionado..... 48

Figura 6.1 Evaluación de metabolitos para suplementación en la producción de Salinosporamida A 60

Figura 6.2 Producción de Salinosporamida A (µg/ml) en medio suplementado 70

Lista de Tablas

Tabla 1.1 Salinosporamides generadas por biosíntesis dirigida 6

Tabla 1.2 Función de los genes del clúster de genes sal 7

Tabla 4.1 Fuentes de Carbono, Nitrógeno, Azufre y Fósforo para la preparación de medios mínimos 18

Tabla 4.2 Concetración de Salinosporamida A en MC en diferentes metodologías de medición 26

Tabla 5.1 Metabolismo secundario de Salinispora tropica CNB-440 Clústeres de Genes Biosintéticos. 33

Tabla 5.2 modificaciones genéticas realizadas en Salinispora 34

Tabla 5.3 Cebadores construidos con "Primer design tool for Gibson Assembly" 40

Tabla 6.1 Estudios de suplementación de medios en Streptomyces. 52

Tabla 6.2 Composición de medios de crecimiento y producción. 59

Tabla 6.3 Evaluación de suplementación de Medios 61

Tabla 6.4 Predicciones de crecimiento y producción de Salinosporamidas para cada medio 62

Tabla 6.5 Resultados de la Función "setQuantConstraints" 62

Tabla 6.6 Reacciones predichas por el modelo que presentan variación. 63

Tabla 6.7 Evaluación de modeloUnion y modeloIntersecto 64

Tabla 6.8 Predicciones mediante OptKnock 65

Tabla 6.9 Predicciones mediante optGene 66

Tabla 6.10 predicciones GDLS 67

Tabla 6.11 predicciones de OptForce 67

Tabla 6.12 predicciones MOST 68

Tabla 6.13 Estrategia para sobreexpresión de genes FSEOF 69

Tabla 8.1 Mezcla de reactivos para PCR de colonias. 87

Tabla 8.2 Mezcla de reactivos para PCR. 88

1 Introducción

La lucha contra las enfermedades que amenazan la vida como el cáncer demanda la desesperada búsqueda de nuevas drogas (Anjum et al. 2017). Los tratamientos anticancerígenos disponibles (radiación ionizante, hipertermia, agentes alquilantes, inhibidores de la ADN topoisomerasa y compuestos de platino que inducen el daño de ADN) matan indiscriminadamente ambos tipos de células, las normales y las células cancerígenas rápidamente proliferativas. Para mejorar la eficacia de estos tratamientos y reducir los efectos secundarios adversos, estos han comenzado a suplementarse por terapias dirigidas. Estas terapias comprenden inductores de apoptosis, inhibidores de angiogénesis, inhibidores de traducción de señal, anticuerpos monoclonales y terapia génica. (Beesoo et al. 2014).

El mayor interés en la búsqueda de la siguiente generación de agentes farmacéuticos se ha enfocado en el cultivo de actinomicetos raros o nuevos taxa. Diversos estudios han revelado que selectos grupos de actinobacterias, son una prominente fuente de nuevos productos naturales, poseen una habilidad sin paralelo para producir diversos metabolitos secundarios. Más del 50% de los antibióticos microbianos proviene de Actinomicetos, principalmente de los géneros Streptomyces y Micromonospora procedentes del suelo (Fenical and Jensen 2006).

El océano es un ambiente donde se ha especulado que existen estos tipos de actinomicetos; los océanos tienen abundancias microbianas típicas de 10^6/ml de agua de mar y 10^9/ml de sedimentos marinos. Ambos son ambientes microbiológicos altamente complejos y la mayoría de las actividades químicas de los microrganismos que los habitan no ha sido explorada (Fenical and Jensen 2006), además que los actinomicetos producen esporas resistentes que son conocidas por ser transportadas desde la tierra hacia el mar donde ellas pueden permanecer viables por muchos años (Mincer et al. 2002).

Los actinomicetos marinos obligados representan una nueva fuente de metabolitos secundarios estructuralmente diversos. De estos, se han aislado cerca de 2500 cepas pertenecientes a este taxa. Se han obtenido de 5 sistemas oceánicos distintos; tropicales, subtropicales y con profundidades de hasta 100m (Feling et al. 2003). Se ha encontrado que poseen actividades antibióticas, antioxidantes, citotóxicas, agentes antitumorales, agentes inmunosupresivos, cardiovasculares, enzimas, inhibidores de enzimas y pigmentos (Anjum et al. 2017; Dharmaraj 2010), regularmente estas bacterias se encuentran en los sedimentos, pero también se han aislado de esponjas marinas, tunicados, corales, moluscos, cangrejos, manglares y algas (Anjum et al. 2017).

El género *Salinispora* fue identificado como el primer actinomiceto marino obligado. Para su crecimiento es necesario que el medio presente una fuerza

iónica y un contenido de sales mínimo. Además de estos requerimientos mínimos para el crecimiento, la especie presenta propiedades fenotípicas que lo relacionan con el taxa *Micromonosporoceae.* Mediante un estudio quimiotaxonómico y de 16S rRNA se logró establecer que forman un nuevo género, al que pertenecen tres especies: *Salinispora tropica*, *Salinispora arenicola* (Maldonado et al. 2005), *Salinispora pacifica* (Ahmed et al. 2013).

La descripción general de este género lo detalla como una bacteria aerobia, Gram positiva, actinomiceto no acidorresistente que forma hifas de sustrato ramificado, contiene esporas de superficie lisa de 0.25-0.5 µm de diámetro, simples o en clúster, requieren agua de mar o un medio suplementado con sodio para crecer. Se reconocen por tener pocas hifas aéreas, la pigmentación varía desde un naranja brillante o pálido a negro en medio M1. Durante la esporulación las colonias se oscurecen y presentan buen crecimiento entre los 10-30°C y pH 7-12 (Maldonado et al. 2005).

Las cepas de esta especie actualmente se encuentran en varios estudios debido a que presentan una alta actividad farmacológica. Fenical y Jensen (2006) analizaron la actividad de 100 cepas del género *Salinispora*, de las cuales el 80% presentó inhibición de crecimiento de células tumorales y 35% actividad antibacteriana.

Una de las características primordiales reconocidas dentro de este género es que dedican un alto porcentaje de sus genomas (10%) a la biosíntesis de metabolitos secundarios, los cuales se producen en patrones específicos de acuerdo a la especie (Ahmed et al. 2013). La siguiente lista menciona los metabolitos que se han identificado en los extractos de fermentación y son específicos por especie. Dentro del genoma se han identificado más metabolitos, pero no se han logrado determinar en el extracto de fermentación.

- *S. tropica:* Salinosporamides A y B, Sporolides A y B, Linfostina y Salinilactam (Udwary et al. 2007).
- *S. arenícola*: Arenicólidos, Ciclomarina D, Rifamicina (Fenical and Jensen 2006).
- *S. pacifica* Lomaviticina A, Cianosporasidas y Sporolides (Fenical and Jensen 2006).

1.1 *Salinispora tropica*

La especie *S. tropica* presenta una temperatura óptima de crecimiento entre 15-28°C, crece en presencia de galactosa e inulina y es sensible a rifampicina (25 µg/ml). La cepa CNB440 es la cepa referencia de la especie, aislada de los

sedimentos cercanos a la costa en las Bahamas (Maldonado et al. 2005). Al secuenciar el genoma de *S. tropica* CNB440, se observó que posee un cromosoma circular, sin plásmidos y un promedio G+C de 69.5% (Udwary et al. 2007). Esta cepa dedica el 9.9% de su genoma para ensamble de productos naturales, similar a algunos actinomicetos productores, mayor a lo encontrado en otros *Streptomyces*. También se logró identificar 19 posibles clústeres biosintéticos de genes de metabolitos secundarios, con lo que se confirmó que el género *Salinispora* presenta una potencial fuente de producción de fármacos. Además, se identificó que algunos de ellos han sido introducidos al genoma como un resultado de transferencia génica horizontal reciente (Nett, Ikeda, and Moore 2009; Udwary et al. 2007)

Los extractos de la cepa CNB440 presentaron una alta citotoxicidad debido a la presencia del metabolito secundario Salinosporamide A, el mismo que se confirmó al analizar la secuencia genómica del microorganismo. Estudios genéticos muestran que el clúster para producción de Salinosporamide A está presente en la especie *S. tropica* (Lechner et al. 2011). Este es un compuesto que se encuentra en la Fase II y III de estudios clínicos para su uso como anticancerígeno de mieloma múltiple y glioblastoma respectivamente, y en Fase I para tumores sólidos y diversos mielomas (National Institutes of Health, 2018).

Salinosporamide A (Figura 1.1) es un metabolito secundario altamente activo, la estructura principal solo se había reportado antes en Omuralide (beta lactona gama-lactam bicíclica). Se ha probado en tratamientos contra la malaria (Hassan, et al., 2017), se comprobó citotoxicidad en las líneas celulares: cáncer de pulmón NCI-H226, sistema nervioso central SF539, cáncer de piel SK-MEL-28 y cáncer de mama MDA-MB-435 (Feling et al. 2003). Debido a su estructura present inhibición fuerte y selectiva del proteasoma 20S, un complejo proteolítico y multicatalitico que juega un rol crítico en los ciclos de los procesos celulares de diversas células cancerígenas de mieloma. Este actúa mediante una fuerte unión covalente al núcleo catalítico del proteasoma, conferida por sus particulares sustituyentes, un anillo ciclohexano y un grupo cloroetil, que han demostrado mejorar su potencia en ensayos *in-vivo* e *in-vitro*, comparado con otros inhibidores de proteasoma (Endo and Danishefsky 2005; Groll, Huber, and Potts 2006).

Este compuesto presenta actividad citotóxica 35 veces mayor que Omuralide; (Figura 1.1) compuesto aprobado por la FDA para uso como citotóxico, beta lactona, utilizado como inhibidor de proteasoma y estructuralmente semejante a Salinosporamide A (Feling et al. 2003; Jensen, Moore, and Fenical 2015).

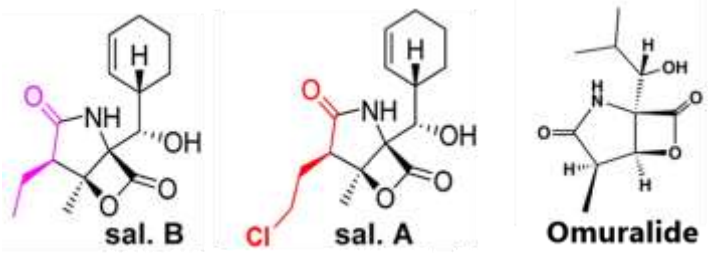

Figura 1.1 Estructura molecular de Salinosporamide B, salinosporamide A (Eustaquio, et al., 2009), y Omuralide (Feling, et al., 2003).

El proteasoma es un objetivo en la quimioterapia contra cáncer, este es parte del sistema ubiquitina y proteolítico dependiente de proteasoma (UPS), y es la mayor ruta para regular la degradación de proteínas en células eucariotas (Potts and Lam 2010). El proteasoma 26S es un complejo enzimático multicatalítico que está compuesto de una o dos cubiertas reguladoras 19S y un núcleo proteolítico 20S en el cual ocurre la degradación de las proteínas. En sistemas modelo de animales este proteasoma suprime el crecimiento de diversos mielomas y cáncer de colón (Beesoo et al. 2014; Fenical et al. 2009).

El proteasoma 20S de mamífero contiene tres actividades catalíticas quimotripsina, tripsina y caspasa que regulan la proteólisis de diversos sustratos, y las tres son inhibidas por Salinosporamide A , con valores IC-50 en el rango medio a bajo (IC_{50}: CT-L 2.6 nM (quimotripsin), T-L 21 nM (tripsin) y CA-L 430 nM (caspasa); RPMI 8226 8.2 nM), mientras Omuralide solo inhibe la subunidad quimotripsin (CT-L) (Fenical and Jensen 2006; Groll, Huber, and Potts 2006; Macherla et al. 2005).

1.2 Producción de Salinosporamide A

Debido al avance en los ensayos preclínicos de Salinosporamide A, se ha dado un aumento en la demanda del compuesto puro, para lo cual es necesario que la fermentación para la producción del compuesto sea más eficiente o que haya un mayor desarrollo en los procesos de síntesis química. Los métodos de producción de este incluyen fermentación y química de productos naturales, biosíntesis dirigida por precursores, mutasíntesis, semi síntesis y síntesis total. Cualquiera de estos métodos debe cumplir con estándares API (Active Pharmaceutical Ingredient), donde es necesario evitar el uso de productos provenientes de animales o de composición desconocida (Potts and Lam 2010).

Mientras las estrategias para realizar su síntesis total *de novo* están basados en la síntesis total de Omuralide (vide supra, nombre comercial) (Figura 1.1), Donde la complejidad para la síntesis de salinosporamida A, se desarrolla en integrar a esta molécula los grupos reactivos más funcionales de Salinosporamide A y el estereocentro adicional en el C-6 Figura 1.1, para lo cual se han probado diversas rutas sintéticas enantioselectivas,

complementadas por un creciente número de estrategias racémicas y síntesis formal (Potts and Lam 2010).

Debido al complejo desarrollo por síntesis química de Salinosporamide A, se prefiere la obtención del mismo mediante un robusto proceso de fermentación salina utilizando *S. tropica.* El primer desafío para la producción por fermentación fue la particular inestabilidad del anillo β-lactona de Salinosporamide A en solución acuosa. Se observó que los extractos crudos de *S. tropica* presentan productos de la hidrólisis de anillos β-lactona o su decarboxilación. La adición de resina al fermentador llevó a un incremento en la recuperación del compuesto 18 veces mayor, este aumento se debió a la estabilidad que la resina proporcionó al compuesto (Tsueng and Lam 2007)En el año 2008 Tsueng, Teisan, y Lam aislaron la cepa NPS21184 que presentó una mayor producción de Salinosporamide A, y produjo 3 veces menos el análogo Salinosporamide B (Figura 1.1) en comparación con la cepa inicial CNB476.

Potts y Lam en 2010 mencionaron que de acuerdo con el diseño del medio de fermentación se logró obtener una tasa de producción de Salinosporamide A de 450 mg/L, con lo que se alcanzó un incremento de 100 veces logrando el objetivo de conseguir un medio que cumpliera con los estándares de la FDA (Food Drug Association). En el diseño de este medio se reemplazó el agua de mar y medios derivados de animales, por una solución salina de composición química conocida, con una fuerza iónica definida y como fuente de aminoácidos se utilizó una peptona de origen vegetal, con lo que se aumentó la presencia de calcio y se redujo la concentración de sulfato y magnesio en el medio. Mientras que la presencia de aminoácidos se mantuvo a niveles similares que cuando se utilizan peptonas de origen animal.

Potts y Lam (2010) mencionan que actualmente Salinosporamide A es fabricado bajo un proceso de fermentación salina robusto que cumple con los estándares API, en el cual los últimos desafíos se enfocaron en estandarizar los parámetros como temperatura, oxigenación, agitación, limpieza y neutralización, para evitar el efecto corrosivo de las sales en la fermentación en reactores de 500 a 1500 L. En este sistema se logró obtener tasas de producción de 250-300 mg/L, que aún están lejanas de una producción favorable para obtener un metabolito. En la industria se reportan casos de producciones de metabolitos secundarios de hasta 80g/L (Fernandez and Tomasini 2003) Por tal motivo se siguen investigando diversas metodologías para aumentar la producción de Salinosporamide A basada en fermentación.

1.3 Ingeniería Genética y Metabólica de *Salinispora spp*.

1.3.1 Biosíntesis dirigida

La biosíntesis dirigida por precursores consiste en adicionar al medio de fermentación un análogo de alguna fracción del metabolito secundario

producido por el organismo. El análogo debe ser incorporado en el proceso metabólico del organismo para producir un metabolito modificado. Esta metodología se ha empleado exitosamente en la fermentación de *S. tropica* para incrementar la producción de las Salinosporamidas menores y generar nuevas salinosporamidas (Tabla 1.1).

Tabla 1.1 Salinosporamides generadas por biosíntesis dirigida

Precursor	**Productos**	**Concentración (mg/L)**
Lam et al. 2007		
NaCl	Salinosporamide A	277
NaBr	Bromosalinosporamide Salinosporamide B Salinosporamide A	19.4 80 1.2
Na_2SO_4	Salinosporamide A Otras salinosporamides	53 Aumentaron entre un 64 a 127%
Tsueng y Lam 2009		
L-Isoleucina	Salinosporamide C	
Valerate	Salinosporamide E Salinosporamide A	121 120
L-Valina	Salinosporamide B	16.7
Cobalto y Vitamina B12	Salinosporamide B	Se inhibió producción. (Efecto no observado en cepa CNB440)

La Tabla 1.1, resume dos estudios donde se emplearon diversos análogos que buscaban definir el comportamiento de estos sobre la producción de Salinosporamida A. En estos estudios se encontró que una alta concentración de ion cloruro, propiciaba la formación de Salinosporamida A, contra la formación de otras salinosporamidas, mientras que la ausencia de ion cloro, abatía su producción. La presencia del ion bromo en el medio de cultivo permitió reconocer que la enzima capaz de integrar el ion cloro a la estructura de Salinosporamida, también era capaz de integrar otro halógeno como el bromo. Sin embargo, este efecto no se verifico con el flúor. El otro estudio demostró que los análogos químicos tenían alta relevancia contra la clase de salinosporamida que se produciría.

1.3.2 Clúster de genes biosintético de salinosporamida

La identificación del clúster de genes de salinosporamida (*sal*), permitió observar que la biosíntesis de precursores (cloroetilmalonil-CoA y L-3-ciclohex-2-enilainina) está codificada dentro del clúster de genes del metabolito secundario (**Error! Reference source not found.**). Así también como las enzimas asociadas a la formación del compuesto.

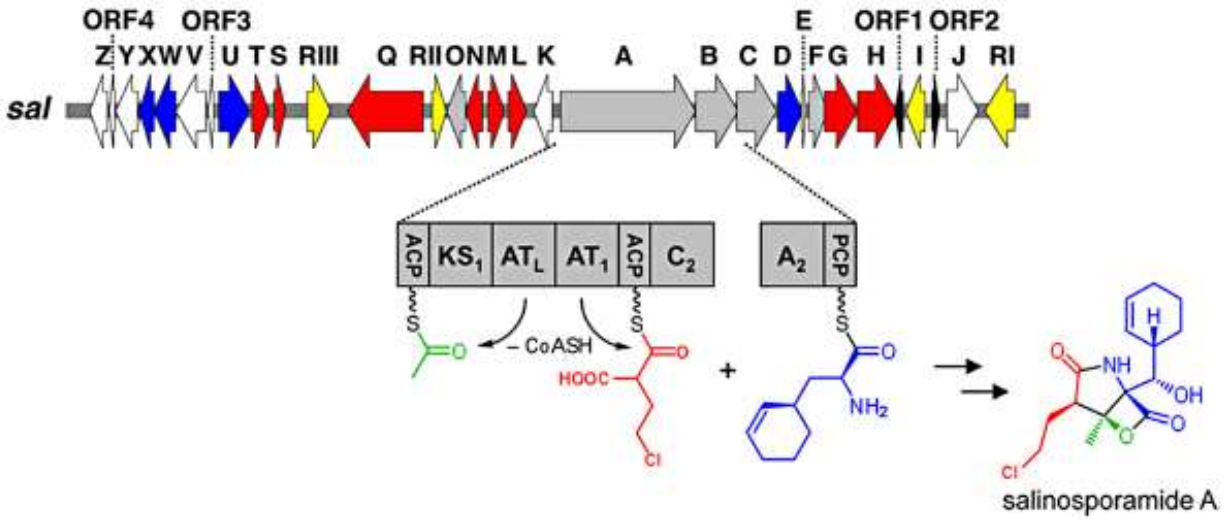

Figura 1.2 Clúster de genes biosintético sal (Eustaquio et al. 2009; Lechner et al. 2011)*, genes codificados por color basado en la función confirmada/predicha: ensamble del anillo núcleo γ-lactam-β-lactona (gris), bionsintésis del cloroetilmalonil-CoA (rojo) y del aminoácido no proteinogénico L-3-ciclohex-2-enilainina (azúl), regulación y resistencia (amarillo), desconocida (blanco), y dos transposasas parciales (negro).*

El análisis bioinformático del clúster de genes de la biosíntesis de salinosporamida (*sal*) permitió realizar diversas pruebas para interrogar las funciones de los genes (Figura 1.2 Clúster de genes biosintético sal *(Eustaquio et al. 2009; Lechner et al. 2011)*, genes codificados por color basado en la función confirmada/predicha: ensamble del anillo núcleo γ-lactam-β-lactona (gris), bionsintésis del cloroetilmalonil-CoA (rojo) y del aminoácido no proteinogénico L-3-ciclohex-2-enilainina (azúl), regulación y resistencia (amarillo), desconocida (blanco), y dos transposasas parciales (negro).). Dentro de estos estudios se encuentran la identificación de los genes que se encargan de la formación del PKS-NRPS (PolyKetide Synthase-NonRibosomal Peptide Synthetases), y los que codifican la síntesis de precursores y sus reguladores (Kale, McGlinchey, and Moore 2010; Lechner et al. 2011).

Tabla 1.2 Función de los genes del clúster de genes sal

Gen	Descripción
SalA	Gen PKS bimodular de organización inusual de dominios. Es encargada de seleccionar, unir y condensar Acetyl-CoA, y Cloroetilmalonil-CoA. Aparentemente el módulo AT_1 contiene puntos de promiscuidad por lo que acepta unidades extensoras distintas a Cloroetilmalonil-CoA.
salT	Cataliza la división fosfórilitica, convierte 5'ClDA a 5'ClRP
salL	Clorinasa SAM-dependiente análoga a *FlA*

Gen	Descripción
salNyM	Fosfatasa y Reductasa deshidrogenasa, catalizan la defosforilación de 5'ClRP a 5-Cloro-5-deoxy-D-ribosa
salH	Homólogo de dihidroxiacido dehidratasa convierte 5'ClRI a 5-cloro-4Hidroxi-2-oxopentanoato.
salQ	Cataliza la decarboxilación oxidativa a 4-cloro-3hidroxibutiril
salS	Tiene una identidad mayor al 50% con α-oxoacid ferrodoxin oxidoreductasa, cataliza la hidratación reversible de Crotoconyl-A, y dehidratasa cuando se acopla a una reductasa.
salG	Carboxilasa/reductasa (CCR) cataliza la carboxilación reductiva de 4-clorocrotonil-CoA a Cloroetilmalonil-CoA
ORF1 ***ORF2***	Transposasas parciales
salU	DAHD sintasa que inicia la biosíntesis de shikimato
salX	Prefenato dehidratasa
salW	Alifatic L-aminoacid amino transferasa
salB	Enzima NRPS, selecciona, activa y condensa por adenilación β-hidroxi-L-3-ciclohex-2-enilalanina (CHA), al producto de sala
salD	β-hidroxilación citocromo p-450 aminoacil PCP-β hidrolasa. Optimiza CHA para condensarse con el policétido bimodular proveniente de *sala*
salR1	Gen regulador tipo *merR* comúnmente envuelto en la resistencia a antibióticos
salR2	Gen regulador especifico tipo LuxR activa a genes involucrados en la biosíntesis de Cloroetilmalonil-CoA
salR3	Regulador transcripcional putativo tipo Lys-R
SalI	Gen de resistencia y/o regulación a β-subunidad del proteasoma
salO	Ciclasa putativa, se considera que puede participar en la ciclación del biciclo γ-lactam-β-lactona
salC	Cetosintasa/Eritronolide sintasa (homología)
salF	Tioesterasa (Homología)
salE	Formación del núcleo γ-lactam-β-lactona
salV	Acyl-CoA ligasa
salY	Ciclodeaminasa
salJ	Proteína hipotetica que presenta una señal adicional peptídica cuando R2 no está.
salK y salZ	Función no descrita
(Eustáquio et al. 2009; Lechner et al. 2011; Lechner, 2011; McGlinchey et al. 2008; Nett et al. 2009; Rachid et al. 2011)	

Las funciones de los genes *salX, salL y salR2* son descritos en mayor detalle a continuación, ya en esta tesis se realizó ensayos de bioingeniería dentro de la cepa *S. tropica* sobre ellos.

- ***salX**,* gen homólogo de prefenato deshidratasa. Su disrupción generó antiprotealide en una concentración de 0.5 mg/L, similar a la original, sin embargo la ausencia de Salinosporamide A, permitió observar la presencia de este compuesto, este híbrido molecular comprende la estructura nuclear de salinosporamida A con el grupo isopropil de omuralide en lugar del ciclo hexano, se confirmó que este gen activa la biosíntesis del ciclohexenil. Dentro del mismo estudio la fermentación se suplementó con precursores de sustratos aminoacídicos (proteinogénicos, no proteinogénicos y sintéticos), generando diversos análogos con modificaciones al ciclo hexenil que posee la estructura (McGlinchey et al. 2008). Un estudio posterior mostró la producción de antiprotealide en 3 cepas nativas de *S. tropica,* entre ellas CNB440, con una producción de 1.1 mg/L por lo que se estableció que antiprotealide es un producto natural. Al alimentar 1% de L-leucina al fermentador de *S. tropica* NPS21184 (sin mutación) se incrementó la producción de antiprotealide de 3 a 11mg/L (Potts and Lam 2010).

- ***salL**,* clorinasa, fue reemplazada por el gen *FlA* de *Streptomyces clattleya* en *S. tropica,* para evaluar la producción por mutasíntesis de fluorosalinosporamide, el mutante que requiere un nutriente especial para producir el producto particular se conoce como "idiotrofo". La cepa mutante de *S.tropica* pudo aceptar fluoruro como un sustrato para la producción de fluorosalinosporamide 4 mg/L (Eustáquio and Moore 2008).

- ***SalR2***, gen regulador de la vía. Este gen regulador actúa sobre los operones *salNO* y *salML,* su sobreexpresión aumento la producción de cloroetilmalonil-CoA, lo que produjo mayor especificidad sobre la producción de Salinosporamide A. Esta modificación aumentó al doble la producción del compuesto de importancia. (Lechner, 2011).

1.3.3 Herramientas moleculares

Lechner (2011) adaptó herramientas moleculares para transformación de *S. tropica:* vectores de expresión y promotores, un sistema de recombinación basado en el vector pSET152 (Figura 1.3), que contiene una copia funcional de oriT RK2, el replicón pUC18 y el fago φC31 integrativo. Con este sistema se realizó una recombinación sitio específica entre el sitio cromosomal de enlace attB y sitio de enlace del plásmido que codifica el fago attP, creando el sitio híbrido attL y attR. De acuerdo al diseño, el vector pSET152 integra una proteína de condensación putativa de cromosoma, lo cual permite que φC31 se integre mediante recombinación. Para esto es necesario que dentro de la secuencia genética de la bacteria a transformar se encuentre una secuencia

homóloga de la proteína SCO3798 de *Streptomyces coelicolor*, el cual no fue identificado en la secuencia por BLAST. Sin embargo, se identificaron 3 sitios alternativos attB también conocidos como pseudo sitios attB (Pseudo sitio attB2, strop0483; attB3, strop3569 y attB1 precedente al ORF strop0304 utilizado frecuentemente para la integración). Se utilizó exitosamente el promotor constitutivo del gen de resistencia de apramicina para la expresión en *S. tropica.*

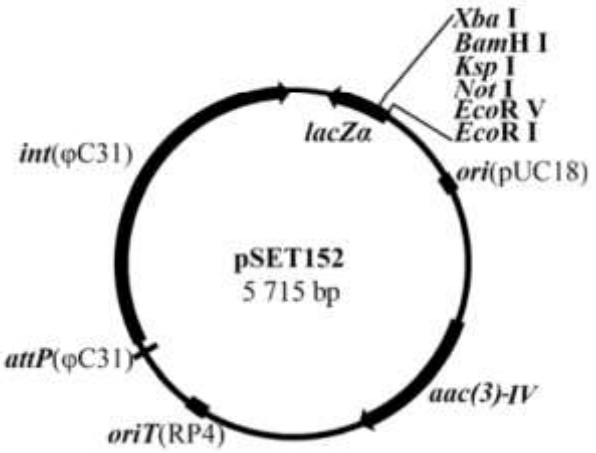

Figura 1.3 Vector pSET 152, que confiere la resistencia a apramicina a Streptomyces y se integra en el sitio attB.

A pesar de que diversas partes del clúster *sal* han logrado expresarse heterólogamente, la producción heteróloga de Salinosporamide A aún no se ha logrado. Esta se probó mediante varios ensayos en *Streptomyces coelicolor* M1152 y *Salinispora arenícola*, como hospederos de expresión (Lechner, 2011). Por el momento solo se ha reportado la producción heteróloga del clúster de genes biosintético de Cianabaramida de *Salinispora pacifica* en hospederos como *Strep. coelicolor* M1146 y *Strep. lividans* TK23 (Bonet et al. 2015).

1.4 Eliminación racional de genes

Gómez-Escribano y Bibb (2011) lograron aumentar la producción de Actinorodina de acuerdo a la modificación de 1.5 a 9 veces en *Strep. coelicolor* mediante ingeniería genética. En el estudio realizado en la cepa *Strep. coelicolor* M145 se borrarón 4 clúster de genes biosintéticos (Actinorodina, prodiginina y los clúesteres de genes biosintéticos *cpk* y *cda*) y se introdujeron dos mutaciones puntuales en los genes *rpoB* y *rpsL* que codifican para la RNA polimerasa β-subunidad y la proteína ribosomal S12.respectivamente. El objetivo del trabajo fue generar un hospedero capaz de expresar heterólogamente clúster de genes que en otras cepas están silenciados o bien aumentar la producción de metabolitos secundarios de interés, removiendo el flujo de los sustratos hacia la producción de otros metabolitos secundarios. En

otro estudio similar (Komatsu et al. 2010) se eliminó los genes no esenciales de *Strep. avermitilis,* una cepa industrial. En el estudio se logró obtener, en la cepa modificada, un aumento de la producción de tres metabolitos secundarios que fue superior a la obtenida en las especies productoras nativas. Se estima que este aumento se originó por la mayor disponibilidad de precursores que presenta esta cepa. Por estos resultados la eliminación racional de genes se presenta como una alternativa viable para el aumento de la producción de metabolitos secundarios.

Con referencia a *Salinispora tropica,* J. J. Zhang, Moore, and Tang (2018), lograron generar una mutante CNB4401 que fue capaz de producir heterólogamente tialoctamina, con una producción 3 veces mayor a la producida por el superhost *Strep. coelicolor* M1152 (Gomez-Escribano and Bibb 2011). Esta nueva cepa *S. tropica* CNB4401 fue modificada genéticamente, reemplazando 3 genes (*sal A-C*) del clúster de genes biosintético de salinosporamida por un sitio attB de integración del φc31. Los resultados indican que *S. tropica* promete ser un buen hospedero para producción heteróloga de metabolitos secundarios, sobre todo compuestos halogenados.

1.5 Modelo a escala genómica

La construcción de un modelo a escala genómica permite caracterizar las capacidades metabólicas de los organismos con la finalidad de entender y modelar la fisiología celular del organismo en cuestión. Estos modelos se han utilizado para detallar estudios de metabolismo logrando incrementar la producción de metabolitos especializados y la integración de datos ómicos. En base a esta necesidad Contador y colaboradores (2015) reconstruyeron y curaron manualmente un modelo a escala genómica, basados en anotaciones genómicas, datos ómicos y literatura (iCC908). Basado en éste se estudiaron las capacidades cepa-específicas de *S. tropica* CNB440 en medio mínimo definido. Mediante la incorporación de modificaciones se incrementó la precisión en las predicciones cualitativas de los experimentos de crecimiento/no crecimiento de un 76 a 93%, por lo que es una herramienta viable para definir las capacidades metabólicas de *S. tropica* y guiar y mejorar la producción de metabolitos especializados. El modelo de Contador et al. (2015) incorporó las rutas metabólicas que codifican la producción de salinosporamida y sporolide.

2 Hipótesis

La mayor disponibilidad de los precursores de Salinosporamida A; acetil-CoA, S-adenosil metionina, ciclohexenilalanina y el ión cloruro, permitirán aumentar la producción de este a más de 220 mg/L. La eliminación racional de genes y el uso de modelos a escala genómica son herramientas metabólicas que ayudaran a aumentar la disponibilidad de los precursores del metabolito secundario que aumentaran la producción de salinosporamida A.

3 Objetivos

3.1 Objetivo General

- Evaluar estrategias de ingeniería metabólica para aumentar la producción de Salinosporamide A en *Salinispora tropica* CNB440.

3.2 Objetivos específicos

- Estudiar el efecto de la eliminación racional de clúster de genes biosintéticos de metabolitos secundarios en la producción de Salinosporamide A en *Salinispora tropica* CNB440.
- Predecir modificaciones genéticas que incrementen la producción de Salinosporamide A a partir de un modelo a escala genómica de *Salinispora tropica* CNB440 y comprobarlo experimentalmente.
- Optimizar el medio de producción de Salinosporamide A a partir del modelo a escala genómica de *Salinispora tropica* CNB440 y comprobarlo experimentalmente.

4 Parte I Crecimiento de *Salinispora tropica* y determinación de Salinosporamida A.

Este capítulo engloba el desarrollo de los procedimientos básicos para el crecimiento de *Salinispora tropica* y determinación de salinosporamida A. Debido a las condiciones de crecimiento de la bacteria, fue necesario identificar una solución salina que presentara la fuerza iónica suficiente que sustente el crecimiento de la bacteria y promueva la mayor concentración de salinosporamida A. El medio de crecimiento y esporulación más efectivo para esta bacteria es el medio A1 (Feling et al. 2003; Fenical and Jensen 2006; Maldonado et al. 2005), se ha reportado que la temperatura óptima de crecimiento es de 28°C (Lam et al. 2007).

Debido a la naturaleza química de salinosporamida A, fue necesario ensayar y desarrollar una metodología específica para determinarlo dentro del laboratorio, en este proceso es necesario agregar una resina polimérica al medio para evitar la hidrolisis de salinosporamida A (Tsueng and Lam 2007).

Basados en el trabajo de Contador y colaboradores 2015, y para ensayar el método de determinación de salinosporamida A, se evaluó la producción de salinosporamida A en los medios mínimos que presentaban crecimiento en ese trabajo. Estos resultados también fueron utilizados para evaluar el modelo a escala genómica.

La producción por fermentación de *S. tropica* es el método con el que obtiene la mayor productividad. La aplicación de las mejores condiciones de producción de Salinosporamida A son la base para la correcta cuantificación en laboratorio de la producción del metabolito secundario.

4.1 Introducción

De acuerdo con Reed y colaboradores (2007), Potts y Lam (2010), se puede observar que los iones presentes en la formulación salina del medio para el crecimiento de *S. tropica*, afectan directamente en la producción de los Salinosporamidas, sobre todo la presencia de iones halógenos, que pueden producir variaciones de tipos de Salinosporamida. Por lo tanto, una formulación salina basada en Cl^-, es la mejor opción para producir el compuesto. Tsueng, Teisan, and Lam (2008) diseñaron una formulación salina y evaluaron la fuerza iónica de la misma para encontrar el óptimo de producción. Para la cepa CNB440 reportaron una máxima producción de 97 mg/L con 360 mM de NaCl.

Con respecto a las fuentes de vitaminas y nutrientes del medio, desde que *S. tropica* fue aislada e identificada se encontró que el mejor medio para preservar el crecimiento de la cepa fue el medio A1 (M1), (Reed et al. 2007; Tsueng and Lam 2008), que consiste en 10 g de almidón, 2 g de peptona y 4 g de extracto de levadura. Debido a que la formulación debe ser aprobada por la FDA y producir la menor cantidad de otros Salinosporamidas, Tsueng y Lam proponen el medio SHY (10 g de almidon, 4 g de Hysoy y 4 g de extracto de levadura) como medio de producción, este medio no contiene productos de origen animal lo que permite ser aprobado por la FDA para ser consumido por los humanos.

Las condiciones de cultivo Batch en laboratorio sobre las cuales la cepa presenta el mayor crecimiento son 28°C, a 250 rpm, en 50 ml de medio en matraces de 250 ml para obtener la máxima transferencia de oxígeno. Bajo las condiciones del laboratorio se monitoreó el crecimiento de la bacteria, mediante la determinación de proteínas totales de Meyers (Feling et al. 2003; Meyers et al. 1998) y peso seco de la muestra.

4.1.1 Estudios de sensibilidad de la cepa a antibióticos.

Dentro de los procedimientos de crecimiento de la bacteria era necesario conocer su sensibilidad a diferentes antibióticos. En la literatura se reportó las concentraciones de sensibilidad frente a: Rifampicina (20 µg/L), Gentamicina (5 µg/ml), Neomicina (5 µg/ml), Estreptomicina (5 µg/ml), Novobiocina (25 µg/ml), Penicilina (5 µg/ml) (Maldonado et al. 2005; Mincer et al. 2002). Debido a que no se encontrarón datos para Apramicina, Kanamicina y Tioestreptona, fue necesario realizar ensayos de sensibilidad para estos antibióticos, ya que son ampliamente utilizados en estrategias de modificación de bacterias (Gomez-Escribano and Bibb 2011).

Al mismo tiempo fue necesario definir las condiciones óptimas de esterilidad para trabajar con la cepa debido a que presentaba alto riesgo a contaminarse, debido a que en el manejo del microorganismo no se utilizaron antibióticos. Para poder asegurar que se trabajó con la cepa bajo estudio se aplicarón técnicas para aislamiento de este tipo de bacterias (Kumar and Jadeja 2016).

4.1.2 Determinación de Salinosporamida A.

La determinación de salinosporamida A consistió en estandarizar el proceso de determinación del compuesto bajo las condiciones particulares del laboratorio, refiriéndose en específico a la resina utilizada, extracción del compuesto, los equipos y columnas accesibles.

La naturaleza química de salinosporamida A lo hace inestable en solución acuosa debido a que posee un anillo β-lactona que es susceptible a hidrolisis bajo las condiciones normales de fermentación. Tsueng y Lam (2007) realizaron estudios agregando resina acrílica al medio de fermentación para identificar si la resina podría darle un efecto estabilizante al metabolito secundario, o la baja productividad se debía a una represión por productos. Lo que confirmo que la baja productividad se debía a la inestabilidad del metabolito secundario. La resina acrílica XAD-7, mostro tener la mayor retención del metabolito secundario. A las 24 horas de iniciada la fermentación se agrega la resina y a los 7 días de cultivo se llega al máximo de producción de salinosporamida A.

Esto permitió establecer una metodología robusta que permite la determinación del compuesto con un LDD (Límite de Detección) de 3 ng/L y con recuperaciones mayores al 80%. Los ensayos realizados en laboratorio permitieron definir la columna de HPLC a usar, temperatura de horno, medio de arrastre, tiempo de elución del metabolito e identificación de interferencias por otros compuestos, bajo las condiciones actuales de laboratorio.

Está determinación se realizó para cada uno de los medios mínimos que establece Contador y colaboradores (2015) que presentaron crecimiento de la bacteria, para la validación del modelo a escala genómica. El crecimiento en estos medios generó datos para poder mejorar la predicción del modelo bajo condiciones específicas de crecimiento.

4.2 Metodología.

4.2.1 Medios de cultivo

Todos los medios fueron preparados en 1 L de agua destilada y autoclavados a 1 atm durante 20 min y 120°C. Se mantienen a temperatura ambiente.

4.2.1.1 Medio de crecimiento Salinispora tropica CNB440

Medio A1 (10 g de almidón, 4 g de extracto de levadura, 2 g de peptona por litro) adicionado con Formulación salina (modificada de Tsueng and Lam 2010): 24 g de NaCl, 0.69 g de KCl, 4.29 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.43 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 86 mg de KBr, 21.5 mg de H_3BO_3, 15.5 mg de $SrCl_2$, 2.1 mg de NaF y 208 µg de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, manteniéndolo a 28°C y agitación de 230 rpm cuando es cultivo líquido y se agrega 17 g de Agar para medio en placas (Tsueng and Lam 2008).

4.2.1.2 Medio de producción de salinosporamida A en Salinispora tropica CNB-440

10 g de almidón, 4 g de HySoy, 4 g de extracto de levadura, 1 g de $CaCO_3$, 40 mg de $Fe_2(SO_4)_3$, y 100 mg de KBr. Formulación salina para producción: 24 g de NaCl, 0.69 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.43 g de $CaCO_3$, 0.43 g de $CaCl \cdot 2H_2O$, 85.9 mg de KBr, 21.5 mg de H_3BO_3, 15.5 mg de $SrCl_2$, 2.6 mg de NaF, y 208 µg de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$. Para las hacer placas de este medio se agregan 17g de Agar.

4.2.1.3 Medios mínimos Salinispora tropica CNB-440

Formulación salina medios mínimos: 24 g de NaCl, 4.29 g de $MgSO_4$, 0.43 g de CaCl, 0.69 g de KCl, 85.9 mg de KBr, 15.5 mg de $SrCl_2$, 21.5 mg de H_3BO_3, 208 µg de CoCl, 2.1 mg de NaF.Medios mínimos: fuentes de carbono 20 mM (glucosa), fuentes de nitrógeno 18.6846 mM (cloruro de amonio), fuentes de azufre 0.8114 mM (sulfato de magnesio) y fuentes de fósforo 36.29 mM (Disodio hidrogen fosfato).

Tabla 4.1 Fuentes de Carbono, Nitrógeno, Azufre y Fósforo para la preparación de medios mínimos

Carbono	Nitrógeno	Azufre	Fósforo
D-Glucosa	Glicina	Sulfato de Magnesio	Fosfato trisódico
D-Manosa	Amonio	Sulfito	
D-Xylosa	Nitrato de Sodio	L-Cisteina	
Glicerol	Urea	L-Metionina	
Sucrosa	L-Glutamato		
D-Fructosa	Inosina		
Manitol	L-Glutamina		
Acetato de Sodio	Adenosina		
D-Sorbitol			
L-Arabinosa			
Alginato de Sodio			
Citrato			
L-Glutamato			
Glicina			
Celobiosa			
Rafinosa			
Uridina			
D-Galactosa			
Adenosina			
Trehalosa			
L-Glutamina			
Inosina			

4.2.2 Antibióticos

Todos los antibióticos fueron preparados por disolución del sólido en agua destilada, a menos que se mencione otra especificación y esterilizados por filtración a 0.02 µm y preservados a -20°C en alícuotas de 1.5 mL en tubos Eppendorf. Ácido Nalidixico disuelto en NaOH 0.3M 25 mg/mL.

- Ampicilina 100 mg/ml.
- Carbenicilina disódica 50 mg/ml.
- Cicloheximida obtenida en solución al 10% (100 mg/ml). Guardar en alícuotas de 1.5 ml.
- Cloranfenicol disuelto en etanol absoluto 50 mg/ml.
- Estreptomicina 50 mg/ml.
- Higromicina B de *Streptomyces hygroscopicus*, obtenida en solución buffer fosfato (PBS) a una concentración de 50 mg/ml. Cubrir con papel aluminio para proteger la solución de la luz (Higromicina B es sensible a la luz).
- Kanamicina 50 mg/ml.
- Sulfato de Apramicina 50 mg/ml.
- Tioestreptona disuelto en Solucion Dimetil Sulfoxido (DMSO) a 50 mg/ml.

4.2.3 Cepa

Salinispora tropica CNB440 fueron proporcionadas al CeBiB mediante la investigación realizada por Contador y colaboradores (2015), las cuales fueron bondadosamente donadas por el Dr. Paul Jensen.

4.2.4 Reactivos

La lista de reactivos y buffers utilizados en esta metodología se encuentra detallada en el Anexo I.

4.2.5 Condiciones de Cultivo

Salinispora tropica se creció a una temperatura de 28° a una velocidad de agitación de 250 rpm, los cultivos se mantuvieron creciendo por 4 semanas.

La metodología utilizada para determinar la sensibilidad a antibióticos, crecimiento de bacterias, aislamiento de bacterias y extracción de ADN genómico se presenta en el Anexo II.

4.2.6 Extracción y determinación de metabolitos secundarios

1. Inocular medio A1 con 1 ml de la cepa de 2-3 días de crecimiento en medio A1.
2. Agregar a las 24 horas de cultivo 20 g/L de resina hidratada XAD-7 (Anexo II, Ensayos de Laboratorio).
3. Parar la fermentación a los 7 días de crecimiento.
4. Agregar estándar de recuperación (ampicilina 20 µg/ml).

Una vez parada la fermentación se extrajeron los metabolitos secundarios por dos metodologías.

a) Recuperación de resina por Filtración.

- Se toma el cultivo completo con las resinas y es filtrado al vacío.
- Se hace un enjuague a la resina recuperada con agua destilada
- Se eluye mediante filtración al vació los metabolitos secundarios adsorbidos en la resina, el eluyente es acetona 10 ml.
- Evaporar acetona hasta sequedad mediante flujo de nitrógeno.
- Resuspender en acetonitrilo.

b) Extracción liquido-liquido de metabolitos

- Tomar una alícuota de 15 ml de fermentado, añadir acetato de etilo 3:1 (muestra:solvente) y se agita en vortex por 1 min.
- Centrifugar a 1000g x 3 min, tomar la capa superior (4ml) y depositarla en vial de vidrio, libre de compuestos orgánicos (Anexo II, Ensayos de Laboratorio).
- Evaporar el acetato de etilo hasta sequedad mediante flujo de nitrógeno dentro de campana de extracción.
- Resuspender en acetonitrilo. Inyectar la Muestra en HPLC.

4.2.6.1 Condiciones de operación de HPLC

El HPLC utilizado fue Shimadzu A20. La detección de los compuestos se realizó con el dectector UV a 210 nm. El buffer de elución es acetonitrilo en agua al 35%, flujo de 0.5 ml/min. Tiempo de corrida 25 min. La columna utilizada es LiChroCart 125-4 LiChroSphere 5 µm 100RP-18 (C18 tipo L1) para fase reversa. Temperatura del horno 35°C.

La determinación de la concentración de Salinosporamida A se realizó mediante el uso de estándar del metabolito puro de Salinosporamida A y la estimación del área bajo la curva, detectada en HPLC.

El estándar de Salinosporamida A fue inyectado a 3 concentraciones (250 µg/ml, 50 µg/ml, 5 µg/ml) y 1 µg/ml para identificar el LDD. Para descartar interferencias y estimar la recuperación se inyectaron DMSO, Acetonitrilo y Ampicilina (500 µg/ml, 250 µg/ml, 100 µg/ml).

4.3 Resultados y Discusión

4.3.1 Ensayos de sensibilidad en *Salinispora tropica*

Los antibióticos utilizados en los ensayos fueron, kanamicina, apramicina y tioestreptona. Para kanamicina y apramicina, se evaluó la sensibilidad a 25, 50, 100 y 250 µg/ml. Mientras que para tioestreptona se evaluó la sensibilidad a 12 y 50 µg/ml.

Kanamicina

Figura 4.1 Ensayo de sensibilidad en kanamicina para S. tropica. A) Sin antibiótico B) kanamicina 50 µg/ml y C) kanamicina 100 µg/ml

Como se muestra en la Figura 4.1b *S. tropica*, no presenta sensibilidad a 50 µg/ml, ya que se observa el crecimiento de al menos 2 UFC, a los 100 µg/ml no presento crecimiento, por lo tanto, se sugiere utilizar concentraciones mayores a esta para hacer los ensayos de transformación de kanamicina.

Apramicina

Figura 4.2 Ensayo de sensibilidad en apramicina para S. tropica. A) Sin antibiótico B)apramicina 12µg/ml y C)apramicina 100 µg/ml

Los ensayos de sensibilidad fueron evaluados desde 12 µg/ml, desde esta concentración se observó que la bacteria *S. tropica* fue sensible a este antibiótico.

Tioestreptona

Figura 4.3 Ensayo de sensibilidad en tioestreptona para S. tropica. A) Sin antibiótico B)tioestreptona 12 µg/ml y C)tioestreptona 50 µg/ml

En el caso de tioestreptona la bacteria *S. tropica* presento sensibilidad a una concentración de 12 µg/ml, y esto se comprobó a concentraciones mayores donde tampoco hubo crecimiento de colonias.

4.3.2 Crecimiento de *Salinispora tropica* en medio complejo A1

La Figura 4.4 muestra el crecimiento de *S. tropica* en medio A1 suplementado con la formulación salina mencionada anteriormente, para construir la curva de crecimiento se determinó el contenido de proteínas totales, línea azul. Estos

datos fueron transformados a unidades de concentración de microorganismos mg/ml, línea morada, esta correlación se realizó mediante la determinación de peso seco de S. tropica, Anexo IV.

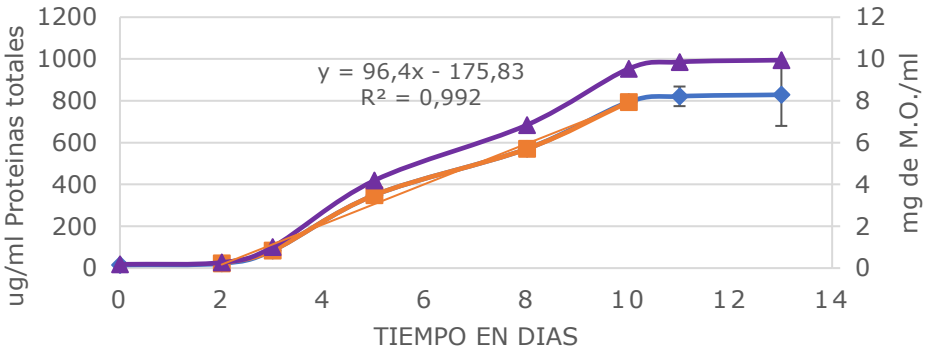

Figura 4.4 Curva de crecimiento de S. tropica en medio A1

Los datos mostrados en la Figura 4.4, muestran que la bacteria presenta una fase lag de crecimiento de 2 días y la fase exponencial de crecimiento dura 8 días, esta fase exponencial presentó una constante de crecimiento de $0.46d^{-1}$. Estas determinaciones se realizaron en 4 cultivos distintos de *S. tropica* en medio A1 suplementado con formulación salina, sin adición de antibióticos.

4.3.3 Crecimiento de *Salinispora tropica* en medios mínimos

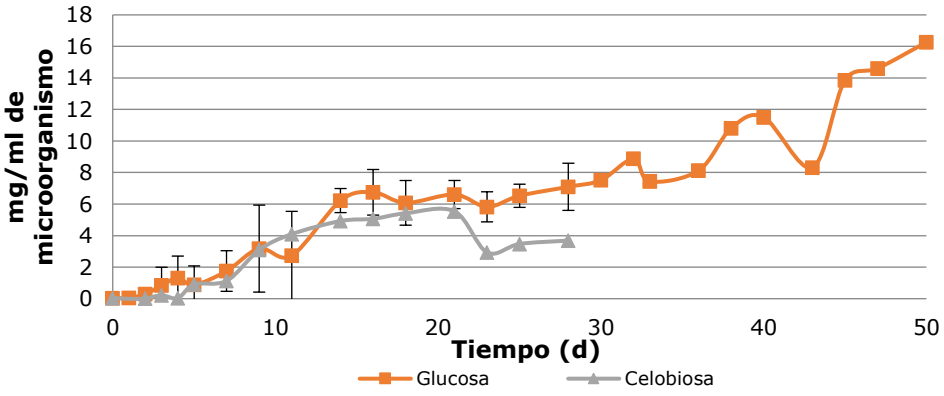

Figura 4.5 Curvas de crecimiento de S. tropica CNB440 en medios mínimos como fuente de carbono glucosa y celobiosa

La Figura 4.5 muestra el crecimiento de *S. tropica* en un medio mínimo basado en glucosa y celobiosa. Como se ve en la Figura 4.5, el crecimiento en ambos sustratos es muy similar, esto se debe a que básicamente la celobiosa es un

disacárido formado de dos unidades iguales de glucosa unidos por un enlace beta, lo que sugiere que *S. tropica* es capaz de hidrolizar este tipo de enlaces sin problema y asimilar la celobiosa de manera similar a la glucosa. En este caso el monitoreo de la fermentación de glucosa se llevó a cabo por más de 50 días registrando una concentración de microorganismos de 16 mg /ml sin observar que en algún momento se llegara a una meseta de crecimiento. Para la celobiosa, se vio una disminución en el crecimiento a partir del día 21, que se alcanzó una concentración de microorganismos de 6 mg/ml.

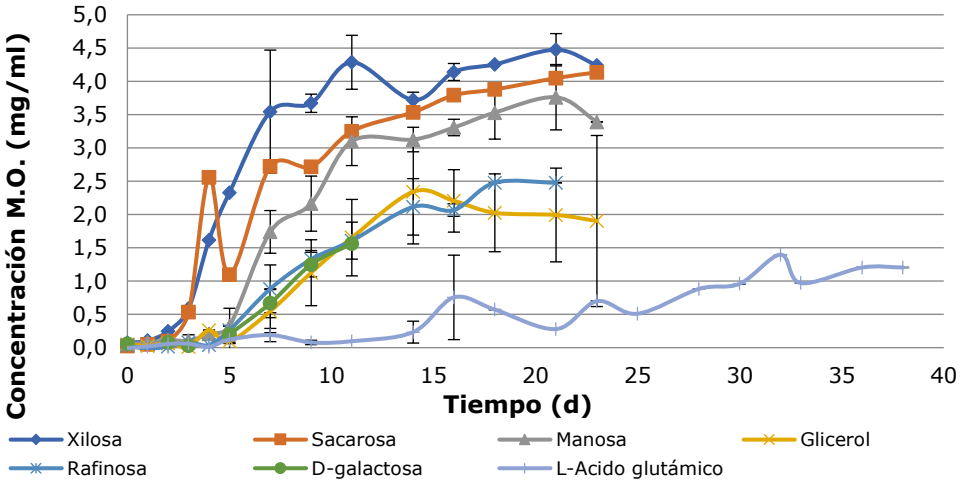

Figura 4.6 Curva de crecimiento de medios mínimos como fuente de carbono xilosa, sacarosa, manosa, glicerol, rafinosa, D-galactosa y L-ácido glutámico.

La Figura 4.6 presenta las curvas de crecimiento determinadas para los medios mínimos de xilosa, sacarosa, manosa, glicerol, rafinosa, D-galactosa y L-ácido glutámico. Como se observa, la máxima concentración de biomasa alcanzada fue de 4.5 mg/ml, que es una cuarta parte de la alcanzada en glucosa. Para Xilosa y Sacarosa, la fase lag duró dos días y llegaron a su máximo crecimiento en el día 20. Para el resto de los medios mínimos probados, la fase lag duró 5 días, manosa presentó un crecimiento muy similar a xilosa y sacarosa, que puede estar asociado a que se tratan de sacáridos. glicerol, rafinosa y galactosa, presentan curvas de crecimiento muy similar llegando a su máximo crecimiento en el día 15. El medio basado en L-ácido glutámico, presentó el menor crecimiento, apenas superando 1 mg/ml, después de 30 días de crecimiento.

Las otras fuentes de carbono que mostraron crecimiento fueron alginato, citrato, glicina y adenosina. Sin embargo, el crecimiento que presentaron fue menor a 1.0 mg/ml, donde el alginato presento una fase lag de 15 días. Los

ensayos hechos sobre medios mínimos que no presentaron crecimiento fueron lactosa, uracil, uridina y lactato.

4.3.4 Determinación de Salinosporamida A en medios de cultivo

La primera etapa de resultados consistió en probar la extracción de salinosporamida A en dos clases de resina XAD16 y XAD7. Estas resinas fueron extraídas del medio líquido mediante filtración y después fueron eluidas con acetona (Lechner et al., 2011). La columna utilizada en HPLC fue LiChroCart 125-4 Purospher RP-18, con la cual se obtuvieron los cromatogramas de la Figura 4.7.

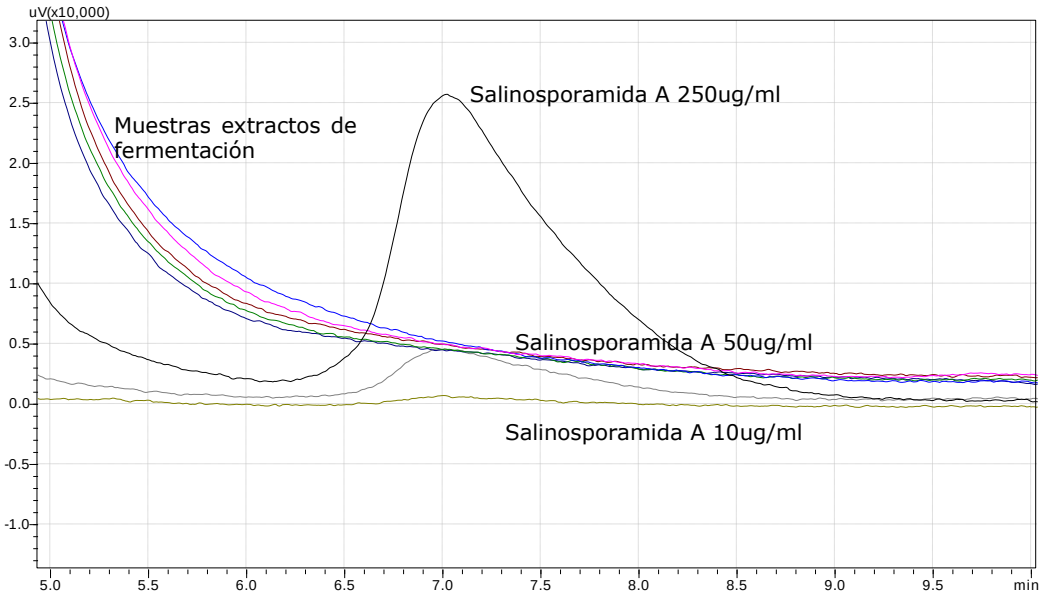

Figura 4.7 Cromatograma de determinación de Salinosporamida A en columna Purospher 100 RP 18 (5µm), estandares y muestras. Las líneas, verde, gris y negra corresponden a la señal determinada por el detector UV del estándar de Salinosporamida A, en concentraciones de 250, 50 y 10 µg/ml.

En la Figura 4.7, se muestran los cromatogramas de diversas corridas en el HPLC utilizando la columna Purospher RP 18. Se observa en las curvas generadas con los estándares que el tiempo de elución de Salinosporamida A es 7.0 min. Sin embargo, en las curvas que corresponden a las muestras de los extractos de la fermentación, no se alcanza a distinguir el peak de salinosporamida A debido a que la curva del metabolito se sobrepone a la curva de acetonitrilo que se utilizó como solvente de la muestra. Debido a este problema, se buscó una nueva columna con la cuál trabajar y debido a lo

complejo que resultó hacer la filtración de resinas, se decidió buscar una alternativa en la metodología de extracción de salinosporamida A.

La nueva estrategia para determinar la concentración del metabolito secundario consistió en hacer una extracción líquido-líquido con solventes. El solvente para extracción fue acetato de etilo, en una relación de 1:3 solvente:muestra. En la Tabla 4.2 se muestran los resultados de la determinación de salinosporamida A, cuando la recuperación de Salinosporamida A se hace mediante recuperación de resina por filtración y extracción líquido-líquido (capítulo 4.2.6). Como se observa en la extracción líquido-líquido se logró obtener mayores concentraciones del metabolito secundario, comparado con la recuperación de resina y posterior elución con Acetona. Debido a que la recuperación fue mayor con la extracción liquido-liquido se eligió éste como método de recuperación del metabolito, además de que esta metodología implicaba menos pasos de extracción. Comparando la efectividad de las dos resinas se corroboró, que las mayores concentraciones de Salinosporamida A, se determinaron cuando se utilizó la resina XAD-7.

Tabla 4.2 Concetración de Salinosporamida A en MC en diferentes metodologías de medición

Muestra	Sal A (mM)
ST triptona Resina filtrada	0,28
ST peptona	5,35
ST triptona	0,42
ST-*S.tropica*	

La Figura 4.8 muestra un cromatograma a partir del cual se determinó la curva de calibración con el estándar de Salinosporamida A. Esta figura muestra una mayor resolución de los peaks detectados por el cromatograma. El tiempo de elución de Salinosporamida A a 0.5 ml/min de flujo es de 12.5 min, como se observa en el cromatograma.

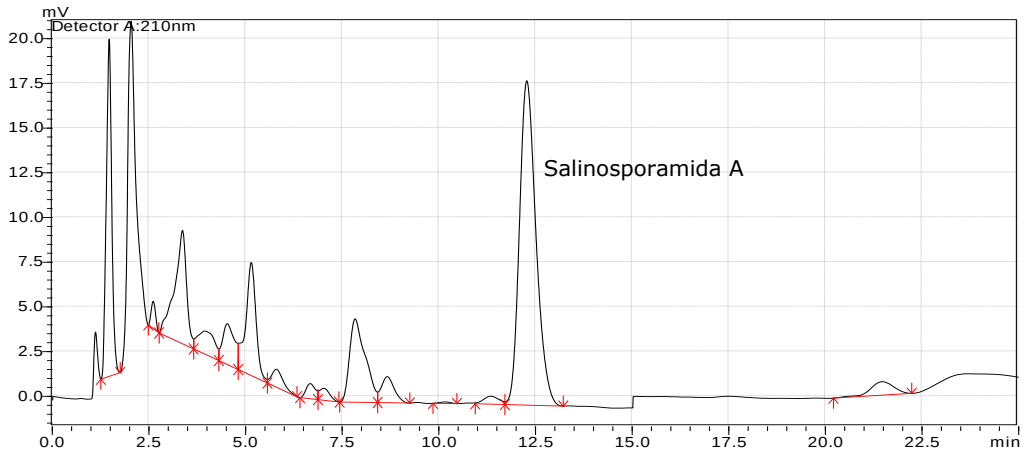

Figura 4.8 Cromatograma estándar Salinosporamida A 250 ug/ml columna Lichrospher 100 RP C18 (5um).

La Figura 4.9 muestra un cromatograma de la muestra del medio de producción, para determinar la concentración de Salinosporamida A. Se observa que el cromatograma muestra buena resolución y se pueden determinar los peaks relacionados a la adición del estándar de recuperación y al metabolito secundario de interés. Por lo tanto, la columna Lichrospher 100 RP C18 (5uM) puede ser utilizada para la determinación de Salinosporamida A en las muestras debida a la buena resolución que presenta y a la baja interferencia de otros compuestos.

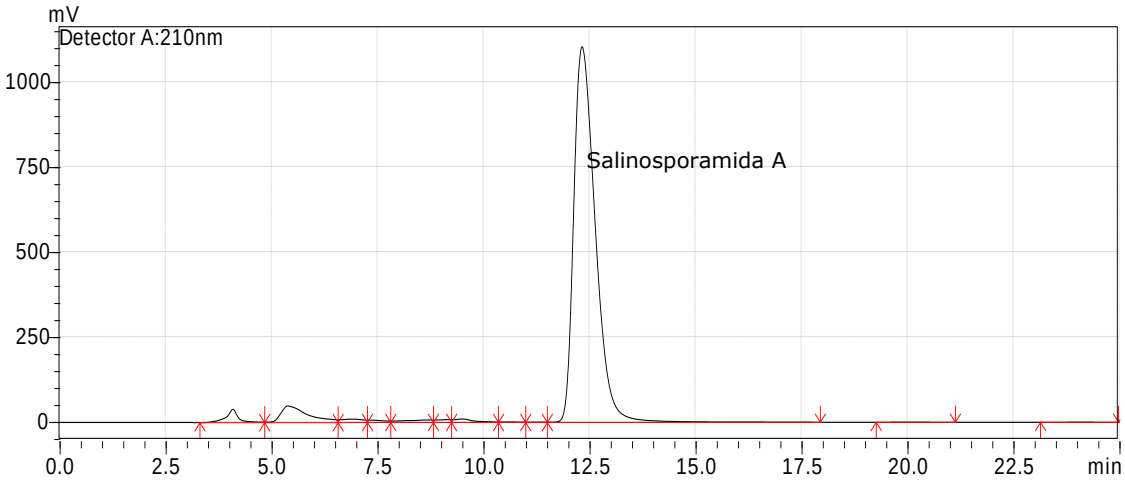

Figura 4.9 Cromatograma de extracto de medio de producción de Salinosporamida A

La Figura 4.10 muestra el cromatograma del estándar Salinosporamida A a 1 µg/ml. Esta concentración servirá para determinar el LDD. Como se observa,

en el tiempo 12.65 min hay un *peak* que nos indica la presencia del metabolito secundario, que no se mezcla con el ruido que podría presentarse normalmente en el cromatograma, por lo que se considera que en una solución concentrada de Salinosporamida A, se puede determinar hasta 1 µg/ml límite inferior. Al concentrar el extracto del metabolito en 300 veces, se puede llegar hasta un LDD de 3 ng/ml.

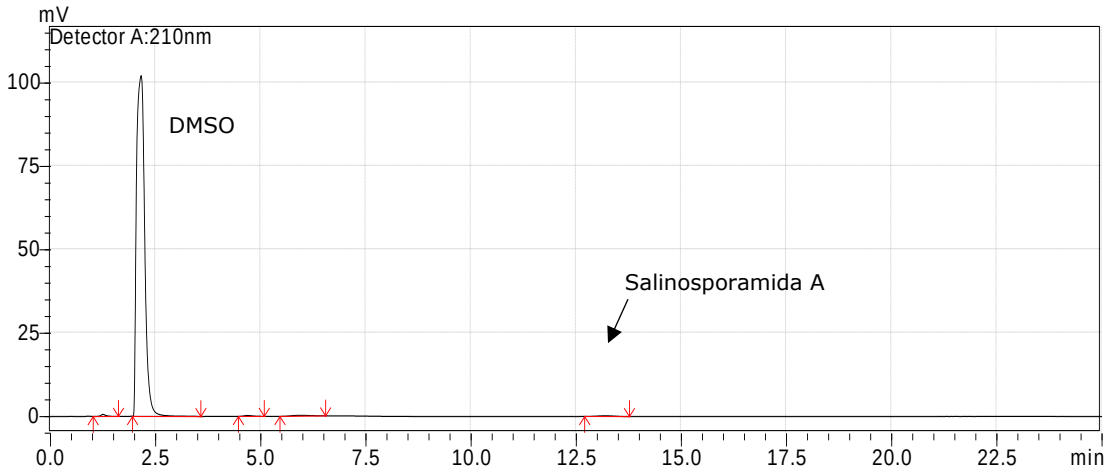

Figura 4.10 Cromatograma estándar de Salinosporamida A 1µg/ml

4.3.5 Determinación de Salinosporamida A producido en medios mínimos

Una vez definida la metodología final para la determinación del metabolito secundario, se procedió a hacer ensayos de crecimiento y determinación de Salinosporamida A en medios mínimos reportados por (Contador et al. 2015) (Capitulo 4.1). Como se observa en la Figura 4.11 la concentración mayor se encontró para el medio mínimo en el que se sustituyo el cloruro de amonio por nitrato de sodio el cuál produjo 0.45 más salinosporamida A y la menor concentración se encontró en el medio en el que se sustituyo el sulfato por el sulfito donde se redujo 0.33 veces la concentración de salinosporamida A, comparado con el medio minimo blanco. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado. En estos resultados no se observa diferencias en la producción del metabolito al cambiar los medios mínimos entre fuente de carbono, nitrógeno, fósforo o azufre.

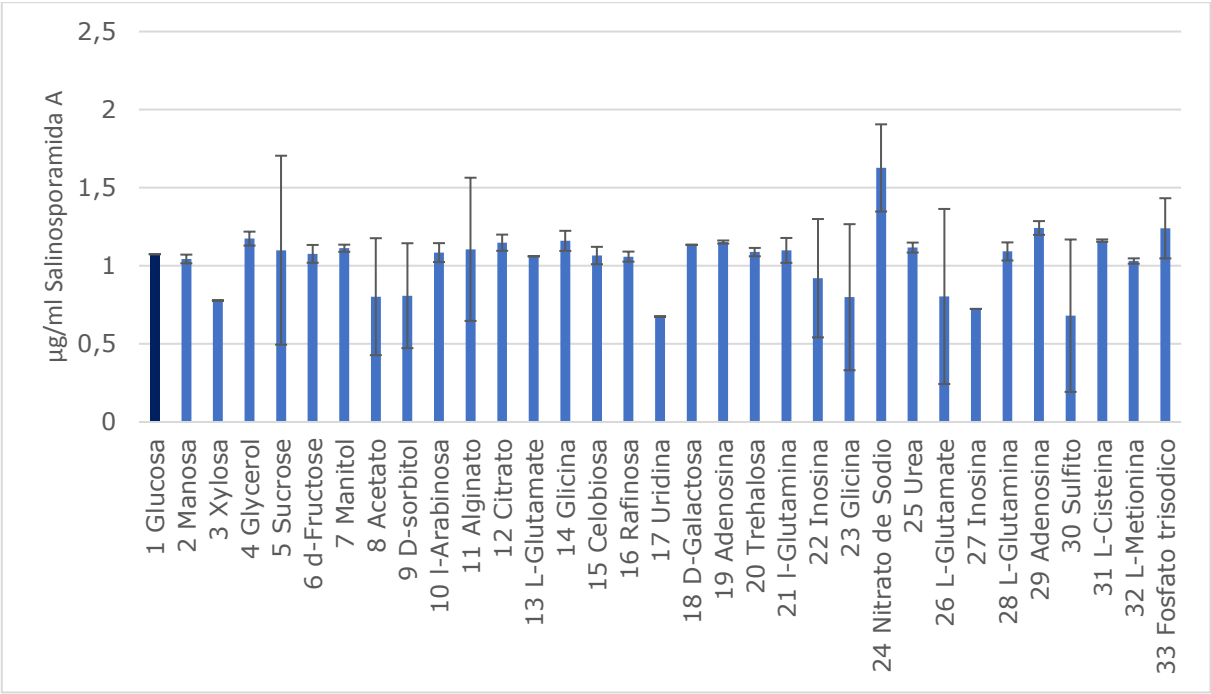

Figura 4.11 Concentración de Saliosporamide A producido por cultivo de S. tropica en medios mínimos suplementado con diferentes fuentes de carbono, 1 medio minimo estándar, (2-22) (20mM), nitrógeno (21-29) (18.68 mM), fósforo (33) (36.29mM) y azufre (30-32) (0.81mM).

Los datos mostrados en la Figura 4.11 a muestran una clara variación de concentración al utilizar nitrato como fuente de nitrógeno, esta variación puede estar asociada a la presencia de una alta cantidad de amonio en el medio que se ha identificado como un ión que reprime la actividad de las enzimas oxidorreductasas (Feng et al. 2014), lo que sugiere que la presencia del ión amonio esta limitando la asimilación de nitrógeno inorgánico de la bacteria. La reducción de la concentración de salinosporamida A asociada al uso de sulfito en el medio, es que el uso de este propicia la formación de succinil-CoA sobre la formación de S-Adenosyl-metionina, que es precursor del metabolito secundario, esto indica que la presencia de sulfito en el medio, disminuira la producción del metabolito secundario, estos datos son relevantes para el diseño del medio de producción

Como se esperaba en todos los casos la producción del metabolito secundario es menor que en el medio de mantención (5.35 µg/ml), lo que justifica el uso de medios más complejos en la producción de metabolitos secundarios. Los datos generados en estos ensayos también son utilizados paravalidar la metodología utilizada para la determinación de Salinosporamida A, definir lo replicabilidad del método de determinación, y por ultimo la integración de estos datos en el modelo a escala genómica conlleva a mejorar las predicciones

cuantitativas del mismo, realizando un ajuste del modelo a los datos generados.

5 Parte II Deleción Racional de Genes

En este capítulo se detallan las estrategias genéticas utilizadas para modificar la cepa *S. tropica* CNB440. Las estrategias de modificación de la cepa buscan generar una cepa que sea capaz de aumentar la producción de Salinosporamida A. Las modificaciones sugeridas se basan en la información obtenida del genoma de la cepa. El aumento en la producción del metabolito secundario se consigue minimizando el flujo de precursores a otros metabolitos.

De acuerdo con Komatsu y colaboradores (2010) y Gómez-Escribano y Bibb (2011), para formar un hospedero de expresión de clúster de genes heterólogos, es necesario realizar como primera etapa, la deleción de clústeres de genes de metabolitos endógenos. Con la finalidad de remover los sumideros de carbón y nitrógeno, lo que incrementaría la disponibilidad de precursores y la productividad de otros clústeres de genes. Estas modificaciones genéticas en sus respectivos estudios mostraron aumentar la producción del metabolito secundario de 3 a 5 veces en el hospedero natural (mutante 1146 vs 1145 de *Streptomyces coelicolor*). Debido a estas observaciones se busca generar un actinomiceto marino modelo capaz de generar altas productividades de metabolitos secundarios mediante el bloqueo de pérdidas de carbono y nitrógeno.

5.1 Introducción

Las actinobacterias producen más de la mitad de los compuestos bioactivos conocidos que provienen de microorganismos estos incluyen antibióticos, agentes inmunosupresivos, agentes antitumorales y enzimas. (Komatsu et al. 2010; G. Zhang et al. 2014). En los ambientes marinos la abundancia típica de microorganismos en los sedimentos es de 10^9/ml, y se conoce que más del 9% de estos pertenece a las actinobacterias, sin embargo, la mayoría de ellas son especies no cultivables en laboratorio, por lo que resulta complejo conocer que compuestos bioactivos pueden producir (G. Zhang et al. 2014).

Los compuestos que se producen a partir de los organismos marinos son conocidos como "productos marinos naturales" (MNP's). Las diferencias con los compuestos provenientes de los organismos terrestres radican en sus características estructurales debido a que frecuentemente incorporan átomos halogenados desde el agua marina que los rodea. Esto les confieren ventajas, como menores dosis efectivas, mejor selectividad contra tejidos malignos y no son vulnerables a desarrollar resistencia lo que las vuelve moléculas objetivo útiles (Beesoo et al. 2014).

Debido a la posible riqueza que se encuentra por descubrir en estos ambientes marinos (Beesoo et al. 2014; G. Zhang et al. 2014), en específico actinobacterias marinas. La minería de genomas, que consiste en la identificación y caracterización de los clústeres de genes biosintéticos (CGB's) identificados por secuenciación, se ha convertido en una invaluable herramienta para la elucidación de la biosíntesis de metabolitos secundarios y una importante fuente de información de metabolitos crípticos codificados por rutas biosintéticas silenciadas (Cobb et al. 2013; Gomez-Escribano and Bibb 2011).

Para la expresión heterologa de los CGB's, sobre todo los crípticos, es necesario contar con cepas modificadas, que presenten altos rendimientos de producción, lo que permitiría revisar una gran cantidad de CGB's (Shen et al. 2015). Para esto se sugiere que estas cepas modificadas sean los mismos hospederos naturales o cepas subrogadas (Gomez-Escribano and Bibb 2011).

5.1.1 Minería genómica de *Salinispora tropica*

En diversos actinomicetos, incluyendo el género *Salinispora*, que pertenece a la familia *Micromonosporaceae*, se ha encontrado que cerca del 10% de sus genomas codifican para CGB's. Al secuenciar diversas cepas de *Salinispora* de de diferente especie se observó un alto grado de conservación en todos los genomas de *Salinispora*, donde las mayores diferencias se veían en islas que codificaban los metabolitos secundarios (Nett et al. 2009; Udwary et al. 2007). Nett y colaboradores en el 2009, realizó la minería genómica de las cepas *S. tropica* CNB440 y *S. arenícola* CNS205 y encontró 49 clústeres de metabolitos secundarios distintos en total. Muchos de ellos están silenciados, lo que indica la alta diversidad de nuevos productos naturales con potencial biológico que pueden ser descubiertos.

Salinispora es considerado uno de los mayores potenciales productores de compuestos marinos bioactivos naturales, de los que destacan antibióticos y tratamientos anticancerígenos (Jensen, Moore, and Fenical 2015; Manivasagan et al. 2014; Mayer et al. 2009; Nett, Ikeda, and Moore 2009; Ng et al. 2013). Este es un actinomiceto persistente y ampliamente distribuido en el mar (Feling et al., 2003), para el cual se cuenta con diversos estudios sobre crecimiento y producción en laboratorio (Maldonado, et al., 2005; Tsueng and Lam 2008). En el caso específico de la cepa *S. tropica* CNB440 la secuenciación y la minería de genoma permitió predecir que tiene 19 CGB's, descritos en la Tabla 5.1 (Nett et al., 2009, Udwary, et al., 2007).

Tabla 5.1 Metabolismo secundario de Salinispora tropica CNB-440 Clústeres de Genes Biosintéticos.

No.	Localización del clúster	Producto actual o predicho	Designación de Clúster (tipo)
1	Stro0586-0610	Enediyne de 10 miembros	pks1 (Enediyne-PKS)
2	Stro0667-0694	Dipéptido	nrps1 (NRPS)
3	Stro1012-1043	**Salinosporamida**	sal (PKS-NRPS)
4	Stro2174-2227	Decacetido Glicosilado	pks2 (PKS tipo II)
5	Stro2340-2346	Aminociclitol	amc (Aminocyclitol)
6	Stro2428-2440	Tiazolilpéptido	thp (Thiazolilpeptido)
7	Stro2486-2510	Policétido Aromático	pks3 (PKS tipo II)
8	Stro2541-2555	**Desferroxiamina**	sid1 (NRPS)
9	Stro2645-2659	Sideróforo (Yersiniabactin)	sid2 (PKS-NRPS)
10	Stro2691-2737	**Sporolide**	spo (Enediyne-PKS)
11	Stro2757-2781	**Salinilactam**	slm (PKS tipo I)
12	Stro2786-2813	Ácido dihidroeroginoico	sid3 (PKS-NRPS)
13	Stro2814-2842	Coelibactin	sid4 (NRPS)
14	Stro3042-3054	Bacteriocina Clase I	bac1 (Bacteriocin)
15	Stro3055-3066	**Linfostina**	lym (PKS-NRPS)
16	Stro3244-3253	Pigmento Carotenoide (Sioxanthin)	terp1 (Terpeno)
17	Stro4264-4267	Lípido Fenólico	pks4 (PKS tipo III)
18	Stro4410-4429	Tetrapéptido	nrps2 (NRPS)
19	Stro4437-4441	Pigmento Carotenoide (Sioxanthin)	terp2 (Terpeno)

(Nett et al., 2009, Udwary, et al., 2007)

Como se muestra en la tabla 5.1 la mayoría de los clústeres codifican para la biosíntesis de compuestos químicos todavía desconocidos. En la mayoría de estos clústeres se han encontrado genes que codifican estructuras del tipo policétidos (PKS) I, II y III, y mezclas de PKS-NRPS.

De los compuestos anotados y aislados se destacan los PKS-NRPS Salinosporamida y Sporolides, el metabolito previamente caracterizado en *Streptomyces,* Linfostina y el PKS de Tipo I altamente repetitivo Salinilactam. En la Tabla 5.1 se resaltaron los metabolitos secundarios que han podido identificarse en el medio de fermentación. La Figura 5.1 muestra la distribución de los CGB's presentes en *S. tropica* CNB440.

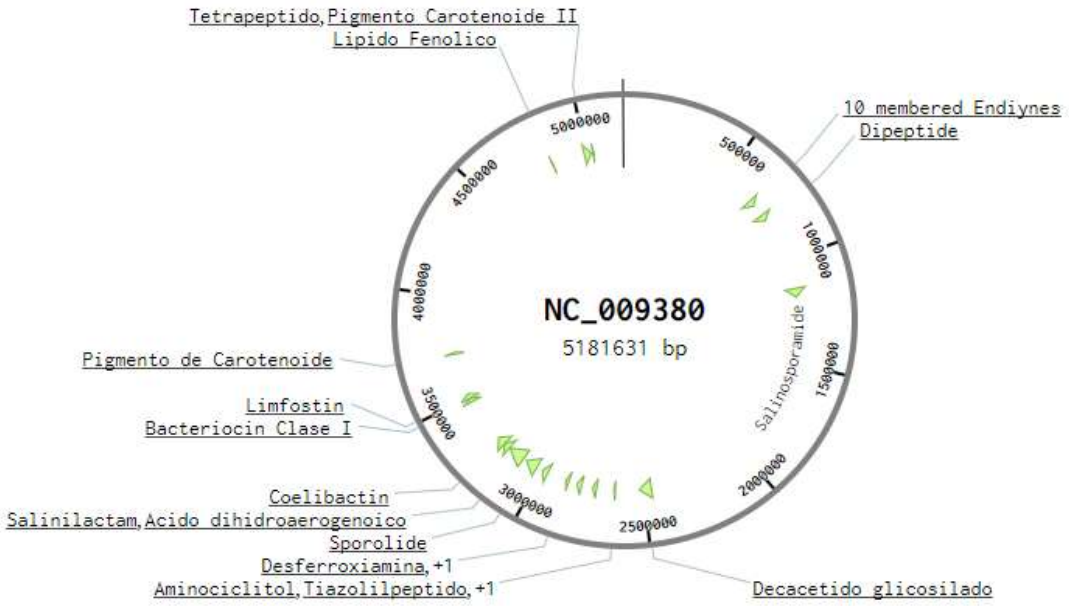

Figura 5.1 Representación del cromosoma de S. tropica CNB-440.Las líneas verdes indican los sitios donde se codifican los clusteres de Genes Biosintéticos (CGB's).

5.1.2 Modificaciones genéticas realizadas en Salinispora.

La Tabla 5.2 resume las principales modificaciones genéticas que se han realizado en *Salinispora* y las estrategias de modificación utilizadas.

Tabla 5.2 modificaciones genéticas realizadas en Salinispora

Modificación genética	Estrategia utilizada	Objetivo
Knockout de gen *salL* y expresión en *E. coli* (Eustáquio et al. 2008)	REDIRECT PCR mutagénesis Conjugación con *E. coli* S17-1	Identificar la función del gen *sal*
Disrupción genética de genes en el cromosoma de *S. tropica* (Mc.Glinchey et al., 2008)	REDIRECT PCR targeting Conjugación con *E. coli* S17-1	Generar derivados de salinosporamida A, utilizando ingeniería genética y biosíntesis dirigida por precursores
Bloqueo del gen *salA* (Eustáquio et al. 2009)	Transformación por recombinación homóloga, recombinación simple Conjugación *E. coli* 12567/pUZ8002	Identificación de la función del gen *sala*
Sobreexpresión de gen *salR2*	REDIRECT PCR targeting modificado vector de	Interrogar la función de los genes reguladores y

(Lechner et al. 2011)	integración pSET152 de fago ΦC31 Conjugación *E. coli* 12567/pUZ8002	aumentar la producción de Salinosporamida A
Reemplazamiento de genes *salA-C* por sitio de integración attB de fago ΦC31 (J. J. Zhang, Moore, and Tang 2018)	REDIRECT PCR targeting pSET152, recombinación doble *E. coli* 12567/pUZ8002	Obtener un hospedero heterólogo de expresión de CGB's

En la Tabla 5.2 se presentan los estudios donde se realizó la modificación cromosomal de *S. tropica,* se observa que la conjugación es la estrategia utilizada para transformar estas cepas. Esta consiste en el intercambio horizontal de genes, donde una bacteria donante (*E. coli* 12567) es capaz de donar un vector de transformación (pSET 152) a otra (*Salinispora*): para esto el donante debe contener un vector que ayude en el intercambio del vector donado (pUZ8002).

Una etapa crítica de la selección de herramientas para la transformación de *Salinispora* es el tipo de modificación que se desea realizar con la transformación. Cuando se busca una integración no específica se pueden utilizar los pseudo sitios de integración attB que posee la bacteria. Pero si se busca la deleción o disrupción de algún gen en un sitio específico del cromosoma es necesario realizar una integración genómica en un sitio específico mediante recombinación homóloga. La Tabla 5.2 hace referencia al PCR targeting, que es una estrategia de modificación genética basada en el uso de librerías genómicas con las cuales se genera un vector con el sitio a modificar, que mediante la ayuda de un organismo se integra en el sitio del cromosoma deseado, para ambas situaciones es necesario contar con la librería genómica de la cepa, fósmidos.

Debido a que el laboratorio no cuenta con fósmidos para *Salinispora tropica*, se sugiere utilizar la estrategia utilizada por (Razmilic et al. 2018) en *Streptomyces*, que consiste en clonar las regiones que flanquean el sitio que se desea delecionar en el plásmido pGM1190 sensible a temperatura. La integración de los sitios que flanquean los genes y la resistencia se integran al plasmido por Gibson Assembly.

5.2 Metodología

5.2.1 Materiales

5.2.1.1 Medios

Medio LB pH 7.0, suplementado con antibiótico de selección de acuerdo con la cepa utilizada. Medio de crecimiento A1 con formulación salina. Descrito en el Capítulo 4.2.1, ambos medios en sólido y líquido.

5.2.1.2 Cepas, Vectores y Cebadores

La lista de cepas, vectores y cebadores utilizados en el desarrollo del presente trabajo se encuentra descrita en el Anexo III.

5.2.1.3 Reactivos y Buffers

Los reactivos y buffers utilizados para el desarrollo de este apartado se encuentran descritos en el anexo I.

5.2.2 Métodos generales de Biología molecular

Los métodos generales de Biología Molecular utilizados en este apartado se describen en el Anexo II. Cabe destacar que para lograr la transformación de las cepas de *S. tropica* se realizó transformación por conjugación con *E. coli* ETZ12567/pUZ8002 con el vector correspondiente a la transformación que se deseaba realizar.

5.2.3 Modificaciones genéticas

De acuerdo con Fenical y colaboradores (2007) se conoce que *S. tropica* CNB440 dedica cerca del 10% de su metabolismo a la producción de metabolitos secundarios, que son codificados por al menos 19 clústeres.

Basados en la búsqueda bibliográfica de los clústeres de genes biosintéticos de *S. tropica* CNB440, se definieron los clústeres de genes que pueden presentar un mayor impacto sobre la producción de salinosporamida A, por clase de compuesto que puede producir el gen, los sustratos que pueden ser precursores del mismo y si se ha determinado su producción en el medio

Una vez definidos los candidatos a eliminar se procedió a diseñar las herramientas moleculares necesarias para lograr la correcta eliminación de los clústeres de genes biosintéticos de metabolitos secundarios de interés.

La primera etapa consistio en obtener los clones de los sitios que flanqueaban los cluster de genes para hacer la recombinación homóloga. Donde se

probaron los partidores diseñados por temperatura y una vez definida la temperatura a la que se obtiene el fragmento con el tamaño deseado, se realizó una nueva clonación de fragmentos en condiciones óptimas, seguida de la purificación de los fragmentos en geles de agarosa al 1%. El vector pGM1190 fue linearizado mediante digestión con la enzima NdeI, y el gen de resistencia a kanamicina (*neo*) se obtuvo mediante clonación por PCR, con partídores específicos (Anexo III). La Figura 5.2 muestra un esquema de la construcción de los vectores que se ocuparán para la modificación de *Salinispora*.

La deleción de los clústeres de genes en el genoma de *S. tropica* CNB440 por doble recombinación homóloga cruzada. La primera etapa consistió en conjugar la bacteria y seleccionar conjugantes mediante resistencia a antibióticos, (vector a), para seleccionar aquellas cepas que integraron el vector pGM1190 sensible a temperatura, con el cual como segunda etapa se buscan las colonias que perdieron el vector pero integraron el gen de resistencia en el genoma (dobles recombinantes) Posteriormente para sacar la resistencia a kanamicina se usa el vector b.

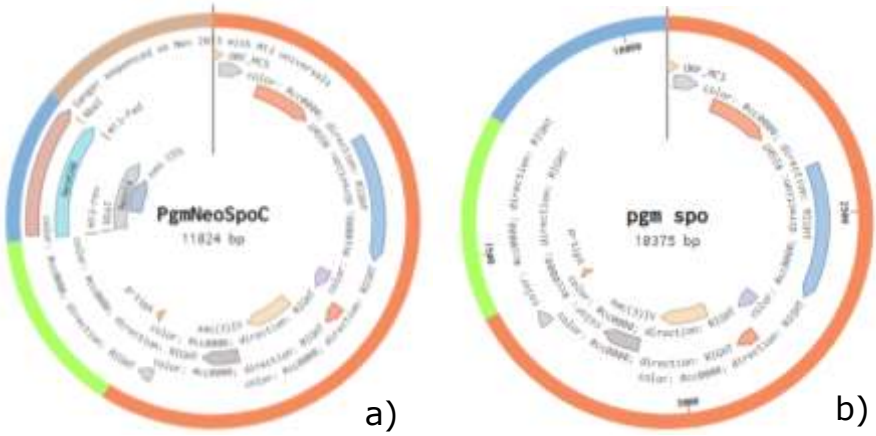

Figura 5.2 Diagramas de vectores de Conjugación basados en pGM1190 a) Véctor de conjugación con fragmentos de flanqueo y gen de resistencia a Kanamicina (Neo14) paso 1 b)Véctor de conjugación con fragmentos de flanqueo sin gen de resistencia.

Como se observa en laFigura 5.2, el vector a) se construyó con los fragmentos de ADN clonados del cromosoma de *S. tropica* (fragmentos verde y rosado), el gen de resistencia (azul) y el vector pgm1190 (naranja). Para esta primera etapa se construyó un vector con resistencia a kanamicina por cada una de las deleciones. Para la segunda etapa se construyó el vector b) para cada una de las deleciones, sin la resistencia a kanamicina pero posee los mismos

fragmentos de ADN que recombinan al lado de los clústeres a delecionar (fragmentos verde y azul) y el vector pGM1190 (naranja).

Todos los vectores fueron construidos mediante Gibsson Assembly, para lo cual se diseñaron los cebadores específicos (Tabla 5.3). En una primera etapa se mezclaron todos los fragmentos para obtener el vector de conjugación. Con el producto de Gibson Assembly, se transformó *E. coli* top 10 para clonar los vectores construidos, las bacterias que adquirieron el plásmido fueron seleccionadas por resistencia en placa a apramicina o apramicina y kanamicina, de acuerdo al vector ingresado SpA, SpB, SlA, SlB, LymA y LymB (Anexo III).

De las colonias seleccionadas mediante el pcr de colonias se obtuvieron clones de los vectores pgm1190 mediante miniprep, que fueron ingresados en *E. coli* ETZ 12567/pUZ8002, mediante transformación química. Los antibióticos de selección utilizados fueron cloranfenicol, kanamicina y apramicina. Las colonias que crecieron en placa contienen el vector, de las cuales se seleccionó alguna para crecer en medio líquido en presencia de los antibióticos correspondientes hasta una OD de 0.6. De estas se tomó una alícuota para preservar en Glicerol y otra alícuota se tomó como preinóculo para la conjugación.

De las conjugantes se tomaron colonias y se crecieron en placas de medio A1 en presencia de apramicina y kanamicina a dos temperaturas distintas (28 y 37°C), para identificar cuáles de las bacterias aceptaron el vector de transformación. Las bacterias que recibieron el vector correctamente son capaces de crecer a ambas temperaturas. Las bacterias que crecieron en ambas temperaturas se replaquearon al menos 3 ocasiones en placas con kanamicina y apramicina, a 37°C para degradar el vector pGM1190, que es sensible a temperatura. Las colonias que permanecieron en las placas de kanamicina, son las que aceptaron el gen de resistencia y degradaron el vector pgm1190, estas se inoculan en placas independientes para hacer stock de esporas de las conjugantes (AnexoII).

A partir del stock de esporas se cultivaron placas de medio A1 con ácido nalidixico, para que después de un día de crecimiento se hicieran copias de las placas en Medio A1 Apramicina y A1 kanamicina, para verificar la presencia del vector pGM1190 y la presencia del gen de resistencia a kanamicina. Las que crecieron en presencia de kanamicina y no en apramicina son las bacterias dobles recombinantes, ya que fueron capaces de degradar el vector pGM1190 que les confería la resistencia a apramicina, y solo integraron la resistencia a kanamicina. A estas bacterias se les realizó PCR de colonias, con cebadores que alineaban 300 pb antes de la zona de transformación en cromosoma y después del gen de resistencia *neo* para la parte I, para la parte II antes del

gen de resistencia *neo* y 300 pb después de la zona de transformación en el cromosoma de *S.tropica*, para comprobar la deleción del clúster de genes (Figura 5.9)

Para cada eliminación será necesario corroborar por medio de selección por antibióticos y PCR de colonias las mutaciones realizadas, y mediante fermentación la producción de salinosporamida A alcanzada después de cada mutación.

5.3 Resultados y Discusión

5.3.1 Determinación de sitios de Deleción

La determinación de los sitios de deleción consistió en una búsqueda bibliográfica sobre los clústeres de genes que se encuentran en la cepa CNB440, como se muestra en la Tabla 5.1, hay diversos metabolitos secundarios que se ha identificado que se producen naturalmente en la cepa, salinosporamida A y B, sporolides A y B, salinilactam, desferroxiamina, sioxanthina y linfostina. De estos compuestos, sporolides es un compuesto producido por una policetidosintasa, lo que indica que podría estar compitiendo por algunos precursores de salinosporamida. Sumado a esto, es el único compuesto determinado en *S. tropica* que también presenta una halogenación. Otro compuesto que se presume ocupa una gran cantidad de precursores es salinilactam. Este también se produce a partir de una policetidosintasa, que une al menos 10 módulos de extensión. El otro compuesto elegido fue linfostina, que es un antibiótico generado en varios *Streptomycetes* y por todas las especies de *Salinispora*. Es codificado por un clúster del tipo PKS-NRPS. Este vector utiliza como precursores una molécula de triptófano y de malonil-CoA, aunque también puede utilizar diversos acil-CoA (Miyanaga et al. 2011). Se sugiere delecionar este debido a su amplia distribución en la especie.

5.3.2 Generación de cebadores

La primera etapa para realizar la estrategia de transformación descrita por (Razmilic et al. 2018), consiste en identificar las zonas a clonar dentro del vector de transformación. Para esto se sugiere que las zonas a clonar sean muy específicas, que no se repitan con otras zonas del genoma y se sugiere un tamaño mínimo de 1700 pares de bases. Las zonas que se eligen para clonar están justo flanqueando el clúster de genes a delecionar. Por lo tanto, se eligen las 1700 pares de bases antes y después del clúster de genes, para cada una de las deleciones a realizar.

Una vez identificados estos fragmentos, se corrió un Blastn sobre la secuencia genómica de S. tropica CNB440, para poder identificar si existían sitios

homólogos a estos fragmentos, que presentarán homología menor al 80%, con cadenas de nucleótidos de tamaño similar. Para los 6 fragmentos que se seleccionaron, se encontró que no había homología con otras zonas del genoma de *Salinispora*.

Por lo tanto, se procedió a realizar los cebadores mediante la herramienta computacional, "Primer design tool for Gibson Assembly" (http://pdtga.cofla.cl/). En esta herramienta son ingresadas las secuencias de los fragmentos que se desean clonar, la secuencia del vector digerido donde se insertarán los fragmentos (pGM1190 con corte en el sitio AdeI) y dependiendo el caso la secuencia del gen de resistencia kanamicina (*neo*). La herramienta genera cebadores que tienen la particularidad de sobretraslaparse en el vector y el gen de resistencia por medio de Gibson Assembly y clonar desde el ADN cromosonal de la cepa los fragmentos deseados. La Tabla 5.3 presenta los cebadores diseñados mediante la herramienta mencionada, esta también entrega la Tm (temperatura de apareamiento) del cebador, peso molecular y porcentaje de pares GC, de cada uno de los cebadores.

Tabla 5.3 Cebadores construidos con "Primer design tool for Gibson Assembly"

Nombre	**Secuencia**	**TM °C**	**TM °C Overlap**
pGM1190-Spo1F	5' gagaagggagcggacagcaagctggtccgg 3'	69.8	48.5
Spo1-NeoR	5' gcttggcgtaatcatggtccaggatccaccctg 3'	68.1	48.0
Neo-Spo2F	5' ctcgaattcactggccgtactcagcccggctc 3'	69.5	50.3
Spo2-pGM1190R	5' gcaggcatgcaagcttcataagggtggctggcg 3'	69.7	50.3
Spo1-Spo2R	5' ggctgagtccaggatccaccctg 3'	62.4	48.5
Spo1-Spo2F	5' gatcctggactcagcccggctc 3'	62.3	48.5
pGM1190-Slm1F	5' agagaagggagcggacagagggctggttcggc 3'	70.8	49.5
Slm1-NeoR	5' agcttggcgtaatcatggttgtcctccggctcc 3'	68.1	48.9
Neo-Slm2F	5' ctcgaattcactggccgttctacgtctcccgcc 3'	69.4	50.3
Slm2-pGM1190R	5' gcaggcatgcaagcttcaagcagcgaatgcggg 3'	69.4	50.3
Slm1-Slm2R	5' agacgtagatgtcctccggctcc 3'	60.6	50.3
Slm1-Slm2F	5' cggaggacatctacgtctcccgcc 3'	64.2	50.3
pGM1190-Lym1F	5' agagaagggagcggacacgcgcctggccca 3'	71.2	49.5
Lym1-NeoR	5' gcaatccatcttgttcaatcatcggctttctccttgtcgctgg 3'	69.3	49.2
Neo-Lym2F	5' cttcttgacgagttcttctgaatcgccccggcccat 3'	69.0	50.5
Lym2-pGM1190R	5' gcaggcatgcaagcttcaacgagcgcacagctca 3'	69.2	50.3
Lym1-Lym2R	5' ggggcgatcggctttctccttgtc 3'	71.6	51.1

Lym1-Lym2F	5' gaaagccgatcgccccggccc 3'	64.1	51.1

5.3.3 Construcción de vectores de transformación

Una vez sintetizados los cebadores, se procedieron a clonar por PCR los fragmentos que flanquean las zonas a delecionar. Cada fragmento tiene una longitud de 1700 pb. En la Figura 5.3 se muestran los resultados del gradiente de temperatura para obtener los fragmentos flanqueantes de las deleciones de genes. Las temperaturas utilizadas fueron: T1(50.8°C), T2(56.5°C), T3(61.8°C), T4(67.1°C), T4(71°C) y T6(72°C).

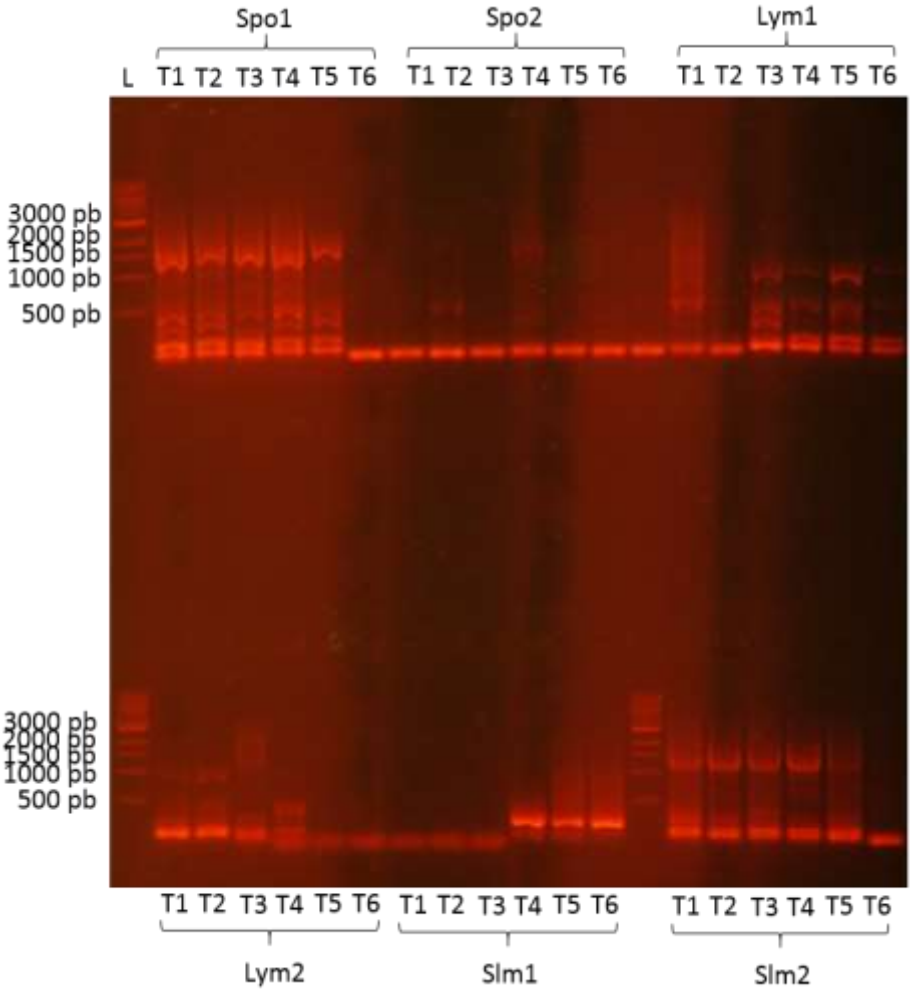

Figura 5.3 Gradiente de temperatura en PCR para clonar los fragmentos flanqueantes de las deleciones.

La Figura 5.3 muestra los resultados del gradiente de temperatura para obtener los clones de los fragmentos desde *S. tropica* que serán utilizados para

construir los vectores de transformación para recombinación homóloga. En este ensayo se busca la temperatura a la cual se obtienen los fragmentos de 1.7Kb con mayor resolución. Esto se relaciona con pocas bandas inespecíficas y que la banda con el peso deseado (para estos casos 1.7 Kb) se note claramente. En los casos de los fragmentos, Spo2, Lym1 y Slm2, se observa que la temperatura de alineamiento óptima es de 67.1°C. Para los fragmentos Lym2 la temperatura es 61.8°C. Para el fragmento Spo1 la temperatura fue 71°C. Para la Slm1 no se observó amplificación de la banda esperada a las temperaturas testeadas, esto puede deberse a que la temperatura ideal se encuentra entremedio de las temperaturas utilizadas en el gradiente.

Mediante Gibsson Assembly se construyeron los 6 vectores para la doble transformación homologa cruzada en *S. tropica*. En la siguiente Figura se muestra el PCR de colonias generado a partir de las bacterias transformadas con el producto de Gibson Assembly.

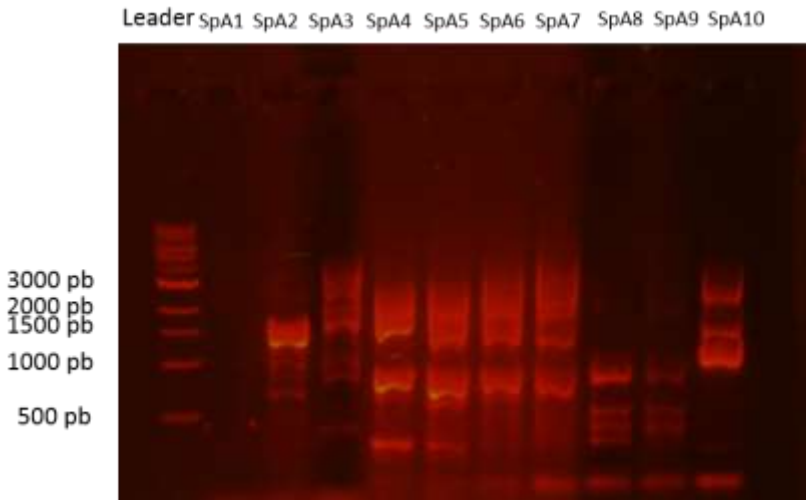

Figura 5.4 PCR de colonias para verificar construcción de Vector SpA

La Figura 5.4 muestra los resultados del PCR de colonias realizado a las colonias que fueron transformadas con el véctor SpA. La verificación de la correcta construcción se realizó mediante PCR de colonias, con los cebadores pGM1190-Spo1F y NeoR. En la Figura se observa que las bacterias que recibieron el véctor correctamente ensamblado son las bacterias SpA3 y SpA10, ya que presentan un fragmento de un tamaño similar al esperado, 3.1 kb. Las colonias que adquirieron el vector correctamente ensamblado se crecieron en medio LB con antibióticos de resistencia, para obtener copias de los vectores, los cuales fueron purificados por miniprep. El vector purificado se envió a secuenciar.

Los resultados de la secuenciación de los vectores (Anexo III), mostraron que en el caso de SpA, el vector seleccionado para transformación no presentaba la unión de los 3 fragmentos que se esperaba. Por secuenciación se pudo confirmar que el fragmento Spo1 y el gen de resistencia a antibiótico Neo y se integraron en el vector pGM1190, por lo que el valor positivo de PCR de colonias estaba correcto, sin embargo, el vector estaba incompleto. Estos resultados fueron entregados después de haber realizado los ensayos de conjugación para la cepa. En el apartado 5.3.5 se presentan los resultados de la conjugación de *S. tropica* con el vector SpA incompleto, obtenido en este ensayo.

Cuando se determinó que el vector estaba incompleto, se volvieron a construir los vectores por Gibson Assembly, y para confirmar la correcta construcción de los nuevos vectores, además del PCR de colonias se realizó otro ensayo de confirmación utilizando corte del vector por enzimas de restricción.

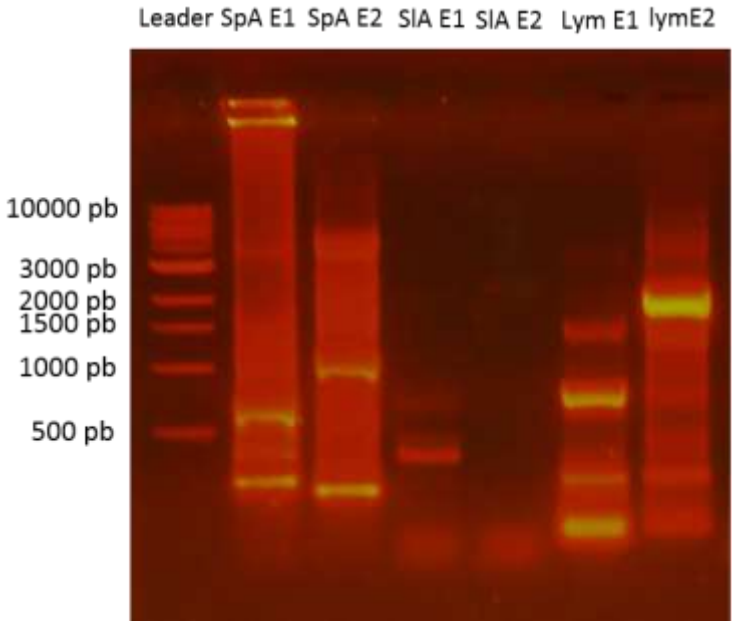

Figura 5.5 Gel de ensayos de corte con enzimas de restricción sobre los vectores SpA, SlA y LymA.

Para los vectores construidos para cada una de las deleciones, se realizó la digestión del vector con al menos dos enzimas distintas. Se observaron las digestiones virtuales para cada uno de los vectores que se construyeron, usando Benchling. Al confirmar las digestiones virtuales con el gel de agarosa mostrado en la Figura 5.5, se comprobó que los patrones de corte no correspondían a los deseados.

Con estos resultados se decidió construir el vector fragmento a fragmento mediante Gibson Assembly. Primero se probó unir el fragmento 1 más el gen de resistencia, para después ser purificado en gel de agarosa, y sobre esta construcción unir el segundo fragmento, para al final tener un fragmento completo de 4.8 kb. En esta etapa se lograron unir el fragmento 1 o 2, con el gen de resistencia sin problema, sin embargo cuando se incluía el tercer fragmento, se lograba ver una tenue línea de 4.8 kb en el gel de agarosa Figura 5.6. Al momento de ser purificada, la concentración del fragmento recuperado fue mínimo, y al hacer el Gibson Assembly con el vector, no se logró reconstruir ningún vector completo.

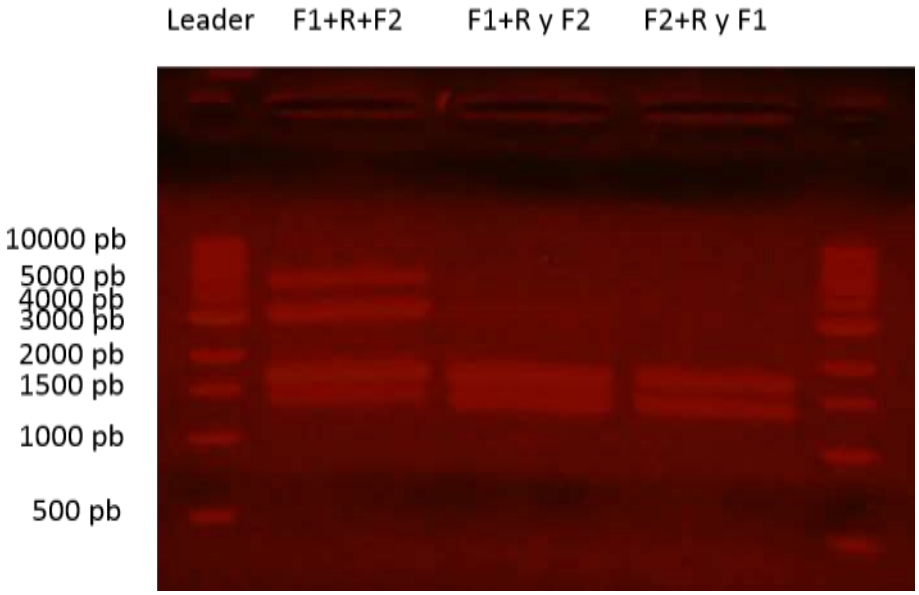

Figura 5.6 Gibson Assembly de fragmentos Spo1+Neo+Spo2

El fragmento de 4.8 kb, que se observa en la Figura 5.6, se purificó y se utilizó para unirse al vector pGM1190 por Gibson Assembly. De la reacción obtenida se tomaron 8uL para transformar *E.coli* top10 en medio LB en presencia de kanamicina y apramicina, sin embargo no se logró obtener colonias transformadas. Además, el fragmento de 4.8 kb después de purificarse, se clonó mediante PCR, con los cebadores que flanqueaban la unión de los dos fragmentos con el vector PGM1190. Sin embargo, al observarse el gel de agarosa, no se logró ver el fragmento deseado. Para lograr unir los fragmentos también se modificaron las temperaturas de unión, con lo que se reducia la especificidad de unión, sin embargo no se logró llegar al resultado esperado.

Se considera que las dificultades encontradas para la unión de los fragmentos al vector, estan relacionadas con la reacción del Gibson Assembly, la cual se

va a revisar para mejorar la unión de los fragmentos ya que este es un paso crucial para lograr hacer la recombinación homóloga en nuestra cepa.

5.3.4 Transformación ET12567/pUZ8002

De las colonias seleccionadas mediante la Figura 5.4 se obtuvieron clones de los vectores mediante miniprep, que fueron ingresados en *E. coli* ETZ 12567/pUZ8002, mediante transformación química. Esta etapa de transformación de véctores no presento ninguna dificultad, ya que el método de selección de estas era muy fuerte. Las bacterias obtenidas en esta etapa se utilizarón para la siguiente etapa de estudio.

5.3.5 Conjugación de *Salinispora*

La conjugación se realizó en *S. tropica,* con la cepa *E. coli* ETZ/pUZ8002-SpA, esta cepa contiene el vector diseñado para delecionar el clúster de genes que produce Sporolides. Este ensayo de conjugación se realizó antes de conocer los resultados de secuenciación del vector con que fue transformado.

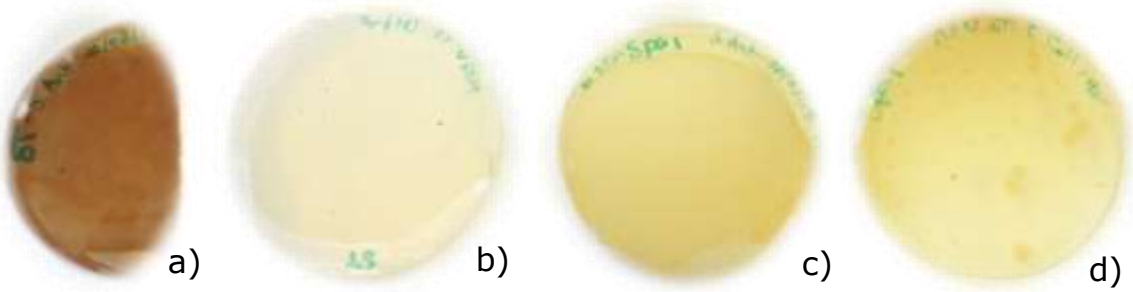

Figura 5.7 Confirmación de conjugación de Salinispora tropica por vector SpA a) S. tropica sin antibiótico medio A1 b) S. tropica en presencia de apramicina y ácido nalidixico (-) c) S. tropica + E. coli sin presencia de antibioticos (+) d) S.tropica + E. coli en apramicina y ácido nalidixico, bacterias conjugantes

La Figura 5.7 muestra los resultados de la conjugación de *S. tropica* con *E. coli* ETZ 12567/pUZ8002-SpA. Todas las fotos fueron tomadas después de 7 días de haber realizado la cobertera de antibióticos sobre las placas. En la primera placa se observa el crecimiento de la cepa *S. tropica* que se utilizó en el ensayo de conjugación, en esta placa no se pudieron determinar las UFC, debido a que el número era mayor a lo que se podía determinar, en la segunda placa se observa el crecimiento de la bacteria en presencia de apramicina y ac. nalidixico, donde no hay colonias (0 UFC). La tercera placa muestra el crecimiento de las dos bacterias sin presencia de antibiótico y no se pudo determinar el número de UFC, debido al excesivo crecimiento de bacterias en

esta placa, sin embargo debido a la presencia de *E. coli* en esta placa se observaron crecimiento de *E. coli,* bacterias pequeñas blancas, colonias grandes y blancas que no se observaban en la placa a) (*S. tropica)* y colonias iguales a las encontradas en a), la última placa muestra el crecimiento de las dos bacterias en presencia de apramicina y ac. nalidixico. Como se observa en esta última se pudo determinar que hubo 10 UFC y a pesar de que son colonias independientes presentan un color naranja a blanco. Por esto fue necesario observarlas al microscopio para definir si se trataba de las colonias de *S. tropica* (Figura 5.8). Se demostró que la morfología de *S. tropica* sin conjugar y conjugada es la misma. La mayor diferencia observada es que en las conjugantes b) el número de bacterias presentes es menor y el crecimiento es mucho más disperso sobre las hifas, comparado con la cepa sin transformar a). Al parecer este cambio en la densidad de crecimiento de bacterias es lo que le confiere un cambio de coloración a las colonias a nivel macroscópico.

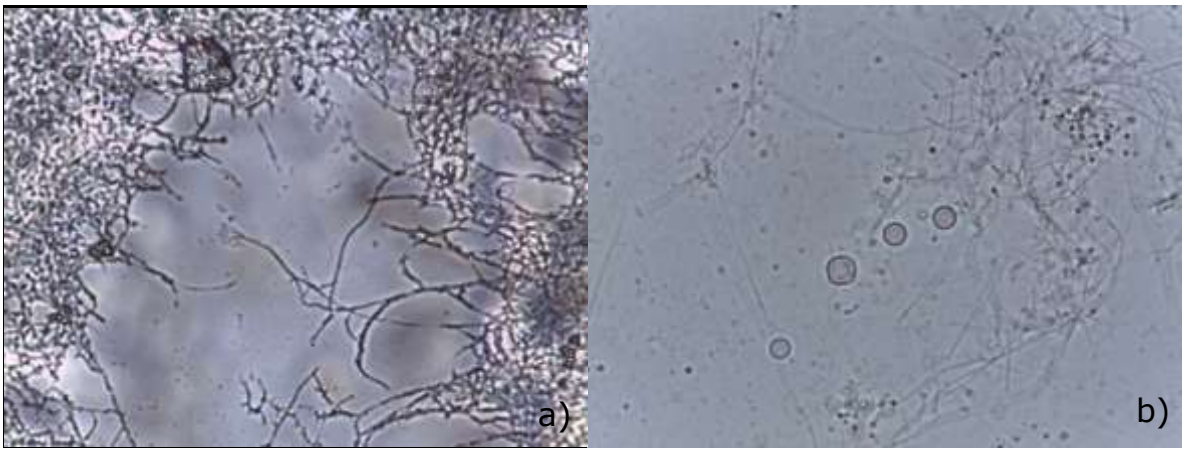

Figura 5.8 Fotos de S. tropica a)sin conjugar y b)conjugadas tomadas al microscopio 100X

Las bacterias de la Figura 5.8 b), se replaquearon de acuerdo al ensayo para eliminar el vector pGM1190, con el que se obtuvo un stock de esporas de dos colonias distintas. De las que en placa obtuvierón mayor crecimiento a 37°C y en presencia de Kanamicina a lo largo de toda la prueba. A estas bacterias se les realizó PCR de colonias, para comprobar la deleción del clúster de genes (Figura 5.9)

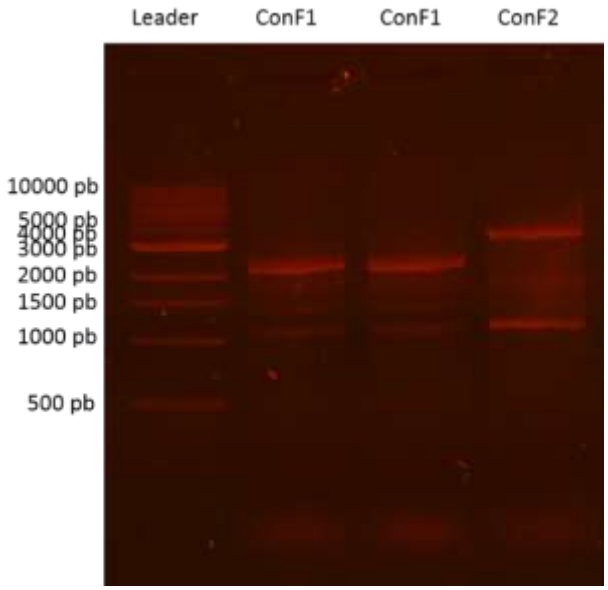

Figura 5.9 Confirmación de transformación de S. tropica por PCR

Al realizar el PCR de colonias con los cebadores generados para esta prueba de confirmación. Se comprobó que los dos fragmentos que correspondían a los tamaños esperados para confirmar la transformación se encontraron en la bacteria. Ya que se buscaba un fragmento de aproximadamente 2 kb y otro de 3 kb (Figura 5.9). Lo que nos confirma, que se pudo realizar la transformación cromosonal de *S.tropica*, bloqueando el cluster de genes *spo*, mediante la integración del elgen de resistencia *neo* en el cluster de genes Spo, logrando también la doble recombinación, ya que se confirmo que se degrado el vector de conjugación pGM1190 utilizado para hacer la integración cromosonal del material genético por doble recombinación homologa.

5.3.6 Producción Salinosporamida A en cepas conjugadas

Las colonias 6 y 8, que resultaron ser positivas en el PCR de colonias, se cultivaron en medio líquido A1 para determinar la producción de Salinosporamida A.

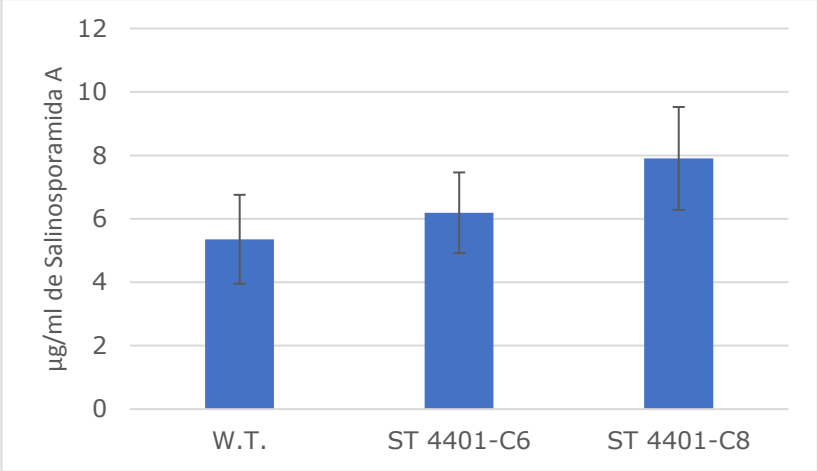

Figura 5.10 Concentración de Salinosporamida A producida por S.tropica en cepa nativa y mutantes con cluster de genes Spo delecionado

En ambas cepas se observó un aumento de producción de salinosporamida A de 16 y 48% respectivamente comparado con la cepa no modificada bajo las mismas condiciones de crecimiento. Este ensayo de producción de salinosporamida A, confirma que la transformación genética realizada sobre la cepa contribuyo al aumento de la producción del metabolito secundario mediante redirección en el uso de los sustratos que se utilizan para la producción de sporolide, hacia la producción de salinosporamida A. Debido a que solo se cuenta con el estándar de salinosporamida A, no se pudó determinar la presencia de salinosporamida B y sporolides en el medio de fermentación. El aumento del 42% implica que se podría obtener una productividad a escala piloto de 312.4 mg/L.

6 Parte III Uso de Modelos a Escala Genómica (GSM)

El uso de modelos a escala genómica ha aumentado desde que se logró secuenciar el genoma de los diversos organismos. Esta herramienta permitió establecer el grupo de reacciones bioquímicas que ocurren en el organismo de interés. Esta red de reacciones genera una base de datos de ecuaciones químicas. Las reacciones son entonces organizadas en rutas, las rutas en sectores, y por último en redes a escala genómica.

Estas redes son construidas basadas en anotaciones genómicas, caracterización bioquímica y literatura científica publicada sobre el organismo en cuestión. Esta reconstrucción incluye bases genéticas explícitas para cada reacción bioquímica en el reactoma y también información sobre la localización del gen. La importancia de que estas redes puedan convertirse a un formato matemático es que permite que puedan realizarse análisis matemáticos con estos datos y darles un tratamiento computacional (O'Brien, Monk, and Palsson 2015).

6.1 Análisis con el Modelo a Escala Genómica

La representación matemática de los modelos a escala genómica (GEM por sus siglas en inglés), consiste en la representación matricial de los coeficientes estequiométricos de las reacciones bioquímicas realizadas por el organismo. Estas relaciones estequiométricas definen también las relaciones de los flujos de los metabolitos dentro del modelo. Las restricciones del modelo son matemáticamente representadas como balances o desigualdades que imponen límites al sistema. Estos límites aseguran que la cantidad total de cualquier compuesto producido sea igual a la cantidad de los compuestos que son consumidos en el estado estacionario. Las reacciones son restringidas entre limites altos y bajos, lo que permite definir los flujos máximos y mínimos entre los cuales cada reacción puede moverse (O'Brien, Monk, and Palsson 2015; Senger et al. 2015).

La aproximación matemática que analiza el flujo de los metabolitos a través de la red metabólica, es el análisis de balance de flujos (FBA) (Orth, Thiele, and Palsson 2010; Schellenberger et al. 2011). Esta aproximación se basa en la condición de crecimiento en estado estacionario y el balance de masas del sistema. Las igualdades y desigualdades que restringen el modelo generan un área de posibles soluciones. Lo que implica que hay muchas soluciones para satisfacer las ecuaciones que gobiernan el sistema. Lo que realiza esta aproximación matemática es que define una función objetivo, bajo la cual todo el sistema es optimizado. Encontrando una solución óptima, esta solución siempre caerá dentro del área de solución. La solución de este sistema de

ecuaciones se encuentra mediante el uso de programación lineal (Zomorrodi et al. 2012).

Una de las formas más básicas de restringir los modelos es definir el sustrato o nutrientes disponibles para ser tomados por el sistema. Estás restricciones siempre pueden ser modificadas por el usuario. Hay una función biológica que el sistema debe cumplir. Regularmente esta función es la reacción de biomasa, que representa la velocidad de crecimiento del organismo (μ). Esta reacción está determinada por mediciones de la composición de biomasa. Regularmente estos sistemas se utilizan para computar los flujos de salida de la red, basadas en las condiciones de entrada. Por lo cual estas aproximaciones son ampliamente utilizadas para sobreproducción de bioquímicos o comprender interacciones intracelulares.

Regularmente las predicciones obtenidas por el modelo son de carácter cualitativo y cuantitativo (O'Brien et al., 2013). En ambos casos, las predicciones se utilizan para hacer pruebas sobre el funcionamiento del modelo, que finalmente dará información bioquímica sobre el organismo, ya que estos modelos están basados en toda la información disponible del organismo. Esto no implica que todas las reacciones que se lleven a cabo dentro del organismo estén descritas dentro del modelo. La información obtenida al utilizar estos modelos puede servir como retroalimentación de los mismos, al momento de ser comparada con los datos obtenidos en el laboratorio. Las predicciones cualitativas regularmente identifican partes presentes o ausentes en la reconstrucción. Las predicciones cuantitativas regularmente indican que tan cercana es la aproximación encontrada con la realidad, estas son comúnmente usadas para aplicaciones de bioingeniería, que pueden guiar el diseño de una cepa.

La integración al modelo de nuevos datos metabólicos intra y extracelulares busca aumentar la precisión del modelo, sobre todo mejora las predicciones cuantitativas del modelo. Con esta integración el modelo se vuelve mucho más específico, bajo ciertas condiciones especiales.

6.2 Pruebas con el modelo a escala genómica

Las pruebas realizadas con el modelo a escala genómica se realizaron en 3 etapas.

6.2.1 Predicciones sobre la producción de Salinosporamida A

Las predicciones de producción fueron evaluadas en medios mínimos y complejo. En esta primera etapa las restricciones se basaron en definir los metabolitos que componian cada medio, integrar estos valores de manera al

modelo a escala genómica y encontrar la productividad esperada para cada uno de los medios utilizados en laboratorio.

6.2.2 Integración de datos cuantitativos y generación de modelo minimizado

Para la integración de datos obtenidos en laboratorio se siguió la metodología de MetaboTools, que integra datos extracelulares en el modelo a escala genómica, para generar un nuevo modelo minimizado. Este modelo minimizado, es capaz de predecir con más precisión la producción del metabolito secundario, bajo condiciones específicas de crecimiento. Debido a esta mayor precisión este modelo minimizado se utilizó para identificar las modificaciones genéticas *in silico*, con diferentes métodos de identificación de modificaciones genéticas (Aurich, Fleming, and Thiele 2016).

6.2.3 Evaluación de predicciones del Modelo a Escala genómica

Sobre el modelo a escala genómica se realizaron dos clases de predicciones, la primera se basa en reformular el medio de producción y la segunda en identificar modificaciones genéticas que aumenten la producción del metabolito. Ambas clases de predicciones fueron evaluadas en laboratorio.

6.2.3.1 Reformulación del medio de producción

Mediante búsqueda bibliográfica se identificaron posibles sustratos que aumentan la producción de metabolitos secundarios sobre la familia de las *Streptomyces* (Tabla 6.1). En la mayoría se encontró que suplementar con aceites y aminoácidos ayudaba al aumento de la producción de los metabolitos secundarios. En el caso de Salinosporamida la estrategia de Reeves y colaboradores (2006), donde se modificarón las fuentes de aminoácidos y sales inorgánicas, ya se había probado en la reformulación del medio de producción (Tsueng and Lam 2008). Otra estrategia ya probada en *S. tropica* fue la adición de vitaminas del complejo B y cobalto al medio de producción (Tsueng and Sing Lam 2009), esta modificación al medio aumento la producción de Salinosporamida A sin aumentar la producción de Salinosporamide B, esta estrategía se evaluó en 3 cepas de *S. tropica* CNB 476, NPS 21184 y CNB440, donde no se observó modificación en la producción para la cepa CNB440.

Tabla 6.1 Estudios de suplementación de medios en Streptomyces.

Metabolito	Suplemento	Microorganismo	Referencia
Roseoflavin	Guanina	*Streptomyces davawensis*	(Matsui et al. 1979)
Antibióticos	Nitrato de Sodio, Nitrato de potasio, Almidón, Hierro, Zinc	*Streptomyces galbus*	(Paul and Banerjee 1983)
Tetraciclina	Aceites vegetales	*Streptomyces aureofaciens*	(Jones and Porter 1998)
Neomicina	Maltosa, Glutamato	*Streptomyces marinensis*	(Srinivasulu et al. 2002)
Streptomicina	S-adenosilmetionina	*Streptomyces griseus*	(Shin et al. 2006)
Daptomicina	Fosfato de potasio	*Streptomyces lividans*	(Penn et al. 2006)
Eritromicina	Peptonas de soya, Carbonato de Calcio, Sulfato de Magnesio, Sulfato de Hierro, Methyl Oleate	*Saccharopolyspora erythraea*	(Reeves et al. 2006)
FK506	Methyl-Oleate	*Streptomyces clavuligerus*	(Mo et al. 2009)
Salinosporamida A	Vitamina B-12 y Cobalto	*Salinispora tropica*	(Tsueng and Sing Lam 2009)

Los sustratos mencionados en la tabla se evaluaron *in silico* a distintas concentraciones sobre el modelo a escala genómica, utilizando como base la composición del medio de producción. Aquellos que predijeron los mayores aumentos fueron evaluados en laboratorio mediante la suplementación del medio de cultivo y posterior determinación de Salinosporamida A por HPLC.

6.2.3.2 Identificación de modificaciones genéticas que aumentan la producción de Salinosporamida A.

Para encontrar modificaciones genéticas sobre los modelos a escala genómica, actualmente se utilizan diversas herramientas o algoritmos que se pueden probar por lograr identificar modificaciones genéticas que mejoren la producción de ciertos metabolitos o bien la biomasa. Estos programas pueden ser elegidos en función del tipo de modificación genética que se desea realizar y son específicos para el tipo de herramienta matemática y sistema operativo utilizado. Los programas más comunes, son los que se basan en encontrar deleciones o *knockouts* de genes, y los menos comunes son los basados en encontrar sobreexpresiones. Debido a la diversidad de herramientas que existen actualmente, para esta tesis se probaron 5 herramientas para

delecionar genes, 1 hibrida deleciones/sobreexpresiones y 1 para sobrexpresiones.

Una vez obtenidos los resultados de las herramientas, se realizó la comprobación *in silico* de las predicciones y aquellas que obtenían la mayor producción de metabolito son las elegidas para ser modificadas genéticamente en el laboratorio.

Las modificaciones genéticas para deleción de genes están descritas en el capítulo 5 de esta tesis. Por otra parte la estrategia de modificación genética para sobreexpresión de genes esta descrita en (Razmilic 2017). Sin embargo, para la presente tesis se probó una estrategia alternativa a la modificación genética para sobreexpresar genes, la cual consistió en suplementar los metabolitos al medio de producción para simular una situación similar a la sobreexpresión. Todos los ensayos de suplementación se realizaron en duplicados.

En el apartado 6.2.7, se detallan las principales funciones utilizadas por las herramientas computacionales para identificar modificaciones genéticas y cuál es la suposición para buscarlas.

6.2.4 Equipos y programas

- *Matlab(MathWorks) R2015a software de computación númerico y visualización
- Caja de herramientas COBRA (COnstraint-Based Reconstruction and Analysis Toolbox) v2.0.
- libSBML librería de programación v5.16.0 (Keating, SM., 2006)
- Caja de herramientas SBML v4.1.0
- Gurobi Optimizer V. 7.5.2 (Licencia Académica 172813)
- GitBash v. 2.16.2 Gestor de programas (free source).
- MOST v. 2.0a9 (free source por GNU)

Equipo:

Dell inspiron 14, procesador Intel i3 2400 Ghz, Memoria Ram de 4GB.

6.2.5 Configuración del Equipo:

- Instalar Matlab
- Instalar librería y caja de herramientas SBML, y añadir la ruta en Matlab
- Instalar GitBash, y registrar usuario.
- Instalar caja de herramientas COBRA utilizando GitBash. Esto permitirá instalar la última versión de la caja de herramientas. Añadir la ruta en Matlab.

- Instalar el solver de programación lineal (Gurobi Optimizer), es necesario descargarlo, instalarlo y después obtener la licencia. Añadir la ruta a Matlab.
- Una vez iniciado Matlab, verificar que las rutas de los programas, cajas de herramientas y librerias esten funcionales.
- Instalar MOST mediante GitBash.

6.2.6 Procedimiento:

Inicializar la caja de Herramientas COBRA. Esta acción permite cargar e identificar todas las herramientas disponibles para la ejecución de la caja de herramientas COBRA *InitCobraToolbox*. Opcionalmente se puede ejecutar la función *testAll(),* que realiza una serie de pruebas que verifica el correcto funcionamiento de Matlab y COBRA. El código utilizado para este procedimiento se encuentra en el Anexo IV.

```
>>InitCobraToolbox

>>TestAll()
```

Verificando que el funcionamiento de la caja de herramientas es adecuado. Se lee el modelo a escala genómica de *Salinispora tropica* iCC908 (Contador et al., 2015), mediante el comando ReadCbModel, este modelo contiene los campos necesarios que describen el modelo, y con el formato para ser utilizados en los siquientes pasos.

```
>> model=readCbModel('iCC908.mat');
```

Para la evaluación del funcionamiento del modelo y debido a que se conocen las condiciones específicas de fermentación del microorganismo, se puede establecer el ambiente del modelo mediante la función SetMediumConstraints. Esta función asocia la composición del medio en concentraciones mM, lo cuál servirá para restringir el comportamiento del mismo, y toma en cuenta información relativa a la concentración celular "cellConc" (No./ml), peso celular "cellWeight" (g/L) y tiempo de fermentación "t" (hr). También permite asociar nuevos valores a las restricciones infinitas del modelo, así como algunas restricciones específicas que mejorarán el comportamiento del modelo, como la toma de oxígeno.

```
>> [modelMedium, basisMedium]=setMediumConstraints(model, …
>>  set_inf, current_inf, Medium_composition, met_Conc_mM, …
>>  cellConc, t, cellWeight, mediumCompounds, …
>>  mediumCompounds_lb, customizedConstraints, …
>>  customizedConstraints_ub, customizedConstraints_lb);
```

Establecido el ambiente del modelo, y con datos de crecimiento y generación de metabolitos recuperados en laboratorio, se pueden generar perfiles de intercambio individuales para cada muestra evaluada en laboratorio. Los perfiles también toman en cuenta los datos exometabólicos obtenidos para el modelo, la función CheckExchangeProfiles, integra y agrupa las nuevas restricciones que se integran al modelo e identifica los intercambios que de acuerdo al modelo no se están consumiendo mediante un análisis de Balance de Flujos Metabólicos (FBA). Para obtener un resumen de los metabolitos agrupados se utiliza la función CheckExchangeProfiles.

```
>> [mapped_exchanges, minMax, mapped_uptake,
mapped_secretion]=checkExchangeProfiles(samples, outputPath,
nmets);
```

Para contextualizar el modelo es necesario contar con la mayor cantidad de datos exometabólicos, consumo y secreción para cada muestra. La primera etapa consiste en generar modelos metabólicos específicos para cada muestra reportada, mediante la función SetQuantitativeConstraints. Esta función arroja submodelos donde solo se toman en cuenta las reacciones asociadas a la reacción objetivo.

```
>> [ResultsAllCellLines, OverViewResults] =
setQuantConstraints(model, samples, tol, minGrowth, obj,
no_secretion, no_uptake, medium, addExtraExch, addExtraExch_value,
outputPath);
```

Mediante los modelos generados en el paso anterior, se realiza un modelo unitario, que se basa en los modelos generados para cada muestra, con los ajustes realizados por los valores exometabólicos. La función makeSummaryModels, genera dos modelos, el modelo unión que contiene todas las reacciones que tienen efecto sobre la función objetivo. El modelo intersecto, que contiene solo aquellas que tienen efecto en todos los ejemplos investigados. Para poder generar estos modelos es necesario comparar los resultados con el modelo genérico (iCC908.mat). El modelo unión es el modelo contextualizado.

```
>> [unionModel, intersectModel,diffRxns,diffExRxns] =
makeSummaryModels(ResultsAllCellLines, samples, modelMedium);
```

Una vez definido el modelo contextualizado, se puede comenzar a investigar las posibles opciones de deleción de genes que el modelo predice. Para lo cual es necesario definir la lista de genes que pueden ser delecionados. Estos genes

no deben de estar asociados a ecuaciones de transporte, mantenimiento de biomasa, ni asociadas a los metabolitos secundarios. La primera función utilizada para definir deleciones es *AnalyzeSingleGeneDeletion.* esta función se encuentra dentro de la caja de herramientas COBRA Metabotools. Lo que hace es evaluar cuál sería el crecimiento de la bacteria o función objetivo, si se deleciona gen por gen. Genera una matriz de resultados e identifica cuales son los genes esenciales y cuales no. En el caso de esta herramienta evalúa los genes en cada escenario que fue definido en los pasos anteriores.

AnalyzeSingleGeneDeletion

```
>> [genes, ResultsAllCellLines, OverViewResults] = analyzeSingleGeneDeletion(ResultsAllCellLines, outputPath, samples, cutoff, OverViewResults);
```

La función *checkEffectRxnKO* revisa el efecto de restringir las reacciones asociadas con un gen o grupo de genes y cuál es el efecto que generan sobre la función objetivo. Da como resultado el valor de la función objetivo una vez que se deleciona el gen.

checkEffectRxnKO

```
>> [FBA_Rxns_KO, ListResults] = checkEffectRxnKO(samples_to_test, fill, genes_to_test, samples, ResultsAllCellLines);
```

6.2.7 Métodos de Ingeniería Metabólica

La caja de herramientas COBRA contiene diversos metodos insilico de ingeniería metabolica. OptKnock, OptGene, GDLS, OptForce, GDBB (MOST) y FSEOF (Kim et al. 2015; Lakshmanan, Koduru, and Lee 2018; O'Brien, Monk, and Palsson 2015; Senger et al. 2015).

Para el uso de estos métodos es necesario definir la lista de reacciones a evaluar en todos los casos. Estas no deben incluir las reacciones asociadas a la producción de biomasa, conversiones energéticas, de transporte e intercambio de metabolitos.

Método OptKnock

El método determina un grupo de reacciones que serán bloqueadas para encontrar la sobreproducción de una reacción objetivo-específica cuando el modelo esta optimizado (Burgard, Pharkya, and Maranas 2003). En este método es necesario fijar los valores de biomasa y consumo energético. La predicción la realiza basado en FBA.

```
>> optKnockSol = OptKnock(model, selectedRxns, options);
```

Método OptGene

Este método también se utiliza para determinar la deleción de genes que puedan llevar a la sobreproduccion de un producto específico. Es capaz de identificar si la lista a evaluar es de genes o reacciones (Lakshmanan, Koduru, and Lee 2018; Schellenberger et al. 2011). Y como resultado genera una lista de genes.

```
>> [x, population, scores, optGeneSol] = optGene(model, 'EX_salinosporamideA','EX_Biomass', selectedRxns);
```

Método GDLS

Busqueda local de diseño genético (Genetic Design Local Search). Puede ser utilizada para identificar que genes borrar en orden de incrementar la producción in silico de ciertos metabolitos (Lun et al. 2009).

```
>> [gdlsSolution, bilevelMILPproblem, gdlsSolutionStructs] = GDLS(model, 'EX_salinosporamideA', 'minGrowth', 2.5, 'selectedRxns', selectedRxns, 'maxKO', 10, 'nbhdsz', 3);
```

OptForce

Identifica genes objetivos para Deleción y sobre/baja regulación por análisis comparativo de los rangos de los flujos metabólicos en la cepa nativa y las cepas modificadas (Ranganathan, Suthers, and Maranas 2010).

```
>> [optForceSets, posOptForceSets, typeRegOptForceSets,… flux_optForceSets] = optForce(model, targetRxn, biomassRxn,… mustU, mustL, minFluxesW, maxFluxesW, minFluxesM, maxFluxesM,… 'k', k, 'nSets', nSets, 'constrOpt', constrOpt, 'runID', runID,… 'outputFolder', 'OutputsOptForce', 'outputFileName', 'OptForce',… 'printExcel', 1, 'printText', 1, 'printReport', 1, 'keepInputs',… 1, 'verbose', 1);
```

MOST (Metabolic Optimization and Simulation Tool)

Herramienta de optimización y simulación metabólica, basado en el algoritmo GDBB (genetic design through branch and bound) que se especializa en encontrar knockouts (Kelley et al. 2015). Esta herramienta es la única que no se utiliza dentro del programa Matlab, ya que es un programa independiente.

Capaz de leer los modelos a escala genómica e implementar el análisis mediante el balance de flujos (FBA).

FSEOF (Flux Scanning based on enforced objective flux)

Escaneo de flujos basado en forzar el flujo objetivo que está enfocado en buscar genes que pueden sobrexpresarse, mediante forzar al modelo a que el crecimiento celular sea mínimo y la función objetivo aumente (Choi et al. 2010). El algoritmo de uso de esta herramienta es:

1. Restringir el modelo a escala genómica, restringir metabolitos conocidos y velocidad de consumo de ATP de mantenimiento y de formación de producto en laboratorio
2. Maximizar la función objetivo, formación de biomasa y determinar su valor.
3. Definir una nueva función objetivo, formación de producto.
4. Maximizar la nueva función objetivo, y esta es considerada como la máxima formación de producto teórica.
5. Simular la maximización de formación de biomasa a medida que aumenta la formación de producto entre el flujo determinado en laboratorio hasta un valor cercano a la formación máxima de producto. A medida que se va aumentando la formación de producto, la formación de biomasa tiende a 0.
6. Registrar los flujos de cada simulación.
7. Al terminar todas las simulaciones evaluar los flujos metabólicos internos. Los flujos que incrementan mientras incrementa la formación de producto, son los potenciales objetivos de amplificación para incrementar la taza de producción del producto deseado.

6.3 Resultados y Discusión

A continuación, se presentan las predicciones obtenidas en cada una de las etapas descritas en el apartado 6.2.2.

6.3.1 Contextualización de modelos y producción de Salinosporamida A

La primera etapa del uso del modelo a escala genómica consistió en definir el medio de producción mediante revisión bibliográfica. Con esta información se pudo definir los metabolitos esenciales de 4 medios distintos, en los cuales se varió la fuente de aminoácidos proveniente de peptona de distinta procedencia (Peptona, Triptona, Soytone y Hysoy) (Difco 2000). Las vitaminas son aportadas por el extracto de Levadura y la principal fuente de carbono provenía

del almidón. La Tabla 6.2 muestra los metabolitos que componían cada uno de los medios.

Tabla 6.2 Composición de medios de crecimiento y producción.

	Medios de crecimiento y producción (mM)			
Componente	**Peptona**	**Triptona**	**Soytone**	**Hysoy**
Maltosa	24,54	24,54	24,54	24,54
Isomaltosa	3,17	3,17	3,17	3,17
Nitrogeno Amino	18,20	20,32	21,37	14,09
Calcio	2,94	2,95	12,99	13,14
Hierro	0,00	0,00	0,20	0,20
Magnesio	17,53	17,54	0,39	0,54
Potasio	13,37	13,41	15,64	16,43
Sodio	413,02	414,39	417,38	416,15
Cloruro	426,69	426,22	426,38	429,25
Sulfato	17,40	17,40	1,31	0,49
Cobalto(II)	8,74 E-4	8,74 E-4	2,18 E-4	2,18 E-4
Alanina	5,74	4,05	4,56	4,44
Arginina	1,41	1,31	1,38	1,95
Asparagina	0,40	0,46	0,46	0,35
Acido aspártico	2,71	2,75	3,75	4,49
Cisteina	0,08	0,14	0,23	0,31
Acido glutámico	4,17	5,25	5,67	6,83
Glutamina	0,06	0,08	0,09	0,06
Glicina	7,68	2,70	3,58	3,77
Histidina	0,50	0,66	0,70	0,78
Isoleucina	1,43	2,03	2,05	1,98
Leucina	2,12	2,77	2,97	2,96
Lisina	1,97	2,40	2,34	2,58
Metionina	0,35	0,56	0,40	0,56
Fenilalanina	1,09	1,41	1,55	1,40
Prolina	2,64	2,18	1,65	2,12
Serina	1,08	1,24	1,38	2,15
Treonina	0,85	0,99	1,07	1,62
Triptofano	0,14	0,19	0,15	0,15
Tirosina	0,37	0,45	0,61	0,74
Valina	1,98	2,60	2,50	2,45
**Vitaminas Extracto de Levadura*				
Biotina	0,00	0,00	0,00	0,00
Ácido Fólico	0,03	0,03	0,03	0,03

	Medios de crecimiento y producción (mM)			
Componente	**Peptona**	**Triptona**	**Soytone**	**Hysoy**
Niacinamida (Nicotinato)	0,34	0,34	0,34	0,34
Ca Pantotenato	0,55	0,55	0,55	0,55
Riboflavina	0,13	0,13	0,13	0,13
Tiamina	0,05	0,05	0,05	0,05
Piridoxamina	0,07	0,07	0,07	0,07
Predicciones				
Crecimiento (mg/ml)	0.29	0.38	0.34	0.34
Producción Salinosporamida A (mM)	4,21	4,27	4.39	4.51
Producción Salinosporamida B (mM	4.16	4.21	4.34	4.45

Todos los medios fueron evaluados con el modelo a escala genómica, en el que se restringio solo la tasa de consumo y el límite superior se dejo libre. Las predicciones obtenidas, fueron, la producción de Salinosporamida A y B, y la formación de biomasa, que es el único valor que el modelo da en mg/ml. El medio que produjo la mayor cantidad de Salinosporamida A, fue el medio basado en la peptona, Hysoy.

En la Tabla 6.2 se observa, que los metabolitos Calcio, Potasio, Glicina, Leucina, Prolina, Serina, Treonina y Tirosina, tenían las concentraciones más altas en el medio basado en Hysoy y Soytone, comparado con los medios de Peptona y Triptona. Por lo cual se evaluó la variación de estos metabolitos a diversas concentraciones desde el 10% al 200% de la concentración en que se encontraban en el medio, para predecir cuál de estos metabolitos aportaba más en la producción del metabolito Salinosporamida A.

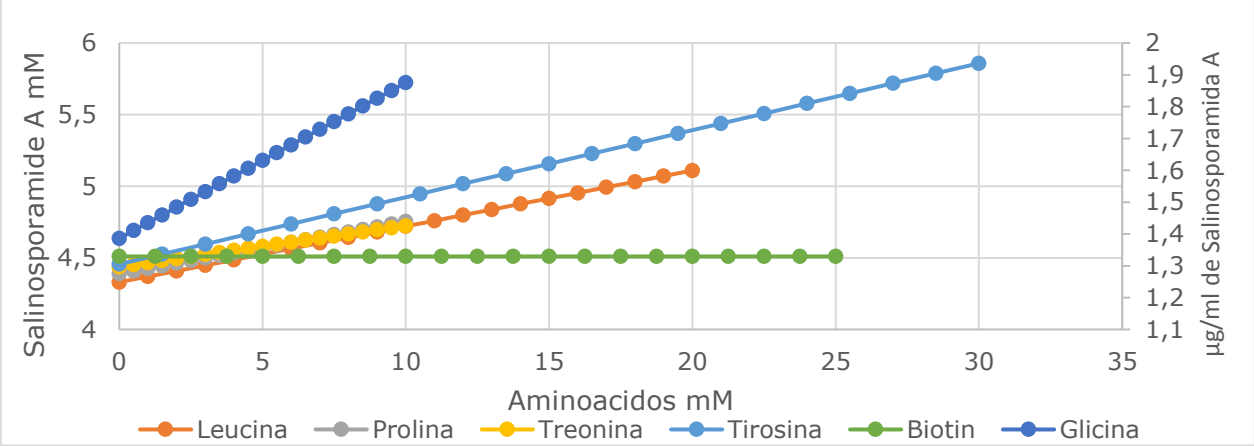

Figura 6.1 Evaluación de metabolitos para suplementación en la producción de Salinosporamida A

Como se observa en la Figura 6.1 los metabolitos que estimulaban más la producción de Salinosporamida A, fueron glicina y tirosina. De acuerdo al modelo el aumento sería del 30% al agregarlos al medio de cultivo. Por esta razón estos dos aminoácidos fueron elegidos para suplementar el medio. Para estos análisis también se evaluaron la variación de sales. De las cuales se observó que la sal que estimulaba un aumento en la producción del metabolito secundario fue el calcio.

Para evaluar el comportamiento predicho por el modelo, se realizó un experimento de fermentación con la suplementación de dos concentraciones distintas de glicina y tirosina. La Tabla 6.3 muestra las concentraciones de Salinosporamida A determinadas en HPLC para las 2 concentraciones de Glicina y Tirosina evaluadas.

Tabla 6.3 Evaluación de suplementación de Medios

Medio	**Salinosporamida A (µg/ml)**
Producción	19.72
Glicina 50mM	0.71
Glicina 100mM	21.67
Tirosina 5mM	54.94
Tirosina 20mM	8.66

Como se observa en la Tabla 6.3, la suplementación de glicina (100mM) y tirosina (5mM) aumento la producción de Salinosporamida A en 10% y 180% respectivamente. Sin embargo, las predicciones de aumento de la producción del metabolito secundario en concentraciones crecientes de tirosina (Figura 6.1) no fue observado en el ensayo experimental, donde se observo una disminución en la producción de Salinosporamida A en presencia de tirosina 20mM. Esto puede estar asociado a la presencia de otros precursores o un desvió de flujos hacia otros metabolitos. Con glicina, la tendencia de aumento de concentración que predijo el modelo si fue correcta, sin embargo, el aumento de producción fue apenas del 10%.

6.3.2 Integración de datos al modelo a escala genómica

En este paso se evaluó la integración de los datos determinados en laboratorio al modelo a escala genómica mediante el uso de la caja de herramientas MetaboTools, con la finalidad de obtener predicciones cuantitativas más certeras. El script completo del ensayo se encuentra en el Anexo IV.

Se integraron los datos investigados en laboratorio como crecimiento celular, y el medio de cultivo utilizado para crecer el microorganismo. Estos datos sirvieron para organizar el ambiente del modelo. A partir de este nuevo

ambiente, se realizan las primeras predicciones como crecimiento y producción de Salinosporamida A (Tabla 6.4 Predicciones de crecimiento y producción de Salinosporamidas para cada medio Tabla 6.4).

Tabla 6.4 Predicciones de crecimiento y producción de Salinosporamidas para cada medio

	Peptona	**Triptona**	**Soytone**	**Hysoy**
Salinosporamida A (mM)	4,21	4,27	4.39	4.51
Salinosporamida B (mM)	4.16	4.21	4.34	4.45
Crecimiento (mg/ml)	0.29	0.38	0.34	0.34

En este nuevo ambiente de trabajo se integraron los datos para cuatro muestras, de las que se tenían datos externos de crecimiento y producción de metabolitos. Esta parte del protocolo se realizó para identificar cuáles de los metabolitos no son consumidos y por lo tanto no son parte de los perfiles de intercambio del medio. Los datos relacionados a los 4 experimentos (Producción en medio complejo triptona y peptona a 2 tiempos distintos de producción Anexo IV) se guardan como una matriz para que el programa los pueda utilizar.

Una vez realizada la integración de los datos, mediante la función *prepIntegrationQuant*, la función identifica cuales de los metabolitos se están consumiendo y produciendo en el modelo. A su vez *setQuantConstraints*, realiza un FBA para cada una de las 4 muestras ingresadas y mediante este ensayo es capaz de identificar cuáles de las reacciones dentro de todo el modelo, están modificándose bajo las condiciones dadas (Tabla 6.5).

Tabla 6.5 Resultados de la Función "setQuantConstraints"

Muestra	**Rxns -**	**Rxns +**	**met +**	**Genes**	**Max Crec**	**Rxns de intercambio**	**Genes esenciales**
Trip	19	917	688	908	0.00202	48	193
Tripb	19	917	688	908	0.00967	48	193
Pep	12	904	682	908	0.00134	41	184
Pepb	12	904	682	908	0.00146	41	184

Los resultados resumidos de la Tabla 6.5, indican cuantas de las Reacciones (Rxns), metabolitos (met) y Genes, no se modificaban durante la evaluación de los modelos y se podían quitar de la evaluación, así como cuantos fueron los que se conservaron durante la variación y que fueron considerados durante todas las predicciones. La función objetivo es el Máximo crecimiento de la cepa y es el valor con el cual se restringe el crecimiento de la cepa y el modelo es ajustado a este.

Otra tabla que se genera es de reacciones que el modelo predice que presentaron variación en los 4 experimentos Se identificó que 21 de las reacciones no cuantificadas presentaban cambios en el modelo, para poder llegar a los valores ingresados al modelo Tabla 6.6.

Tabla 6.6 Reacciones predichas por el modelo que presentan variación.

Reacción	Muestra	Tipo de variación	Reacción	Muestra	Tipo de variación
EX_CO2	2	secreción	EX_Oxygen	4	consumo
EX_Citrate	2	secreción	EX_Potassium	4	Consumo
EX_D_DASH_Fructose	2	secreción	EX_Sulfite	4	secreción
EX_D_DASH_Galactose	2	secreción	EX_Trehalose	2	secreción
EX_D_DASH_Sorbitol	2	secreción	EX_Urea	2	secreción
EX_Folate	4	secreción	EX_ala_DASH_D	2	secreción
EX_Formate	4	secreción	EX_glyc3p	2	secreción
EX_Glycerol	2	secreción	EX_orn_DASH_L	4	secreción
EX_Lumichrome	4	secreción	EX_salinosporamide B	4	secreción
EX_Nicotinate	2	consumo	EX_sporolideA	4	secreción
EX_Nitrite	4	secreción			

La Tabla 6.6 menciona que 21 reacciones presentaban variación y no fueron integradas como restricciones en el modelo. El modelo indica que estas reacciones variaron su concentración de entrada al sistema o bien se están secretando al medio.

El siguiente paso consistió en evaluar cuales de los genes dentro del modelo eran esenciales mediante la función *analyzeSingleGeneDeletion*. Lo que se determinó con esta función es si la deleción de cada uno de los genes del modelo provoca la muerte del organismo, o cambios en el crecimiento. Los resultados que se generan dentro de esta función pueden ser 3: Gen esencial, si su bloqueo genera un crecimiento menor al 5% del normal. Gen no esencial si su bloqueo genera un crecimiento mayor al 95%, y genes que alteran el crecimiento, si está en el rango intermedio de crecimiento (5-95%). Los genes esenciales encontrados se presentan en el Anexo IV.

Una función que realiza predicciones similares es *checkEffectRxnKO*, esta evalúa el flujo de las reacciones asociadas a los genes, y lo que realizó fue bloquear los flujos en la lista de reacciones dada, (Anexo IV), debido a que las

ecuaciones de transporte y gasto energético no deben ser consideradas dentro de esta lista, la predicción de esta función determino que 249 de las reacciones del modelo deben de tener siempre flujo para asegurar el crecimiento del organismo, todas las reacciones fueron asociadas a los genes y reacciones que interactuaban con ellas.

La última parte de la integración de datos al modelo a escala genómica es la generación de un modelo más pequeño que solo toma en cuenta las reacciones que se modifican dentro del modelamiento. Para esto se corrió la función *makeSummaryModel*, que genera un modelo unión y un modelo intersecto. El modelo unión, contiene todas las reacciones que se utilizaron al menos una vez en los modelos que se están comparando. El modelo intersecto contiene las reacciones utilizadas en todos los modelos, si se utilizaban en un solo modelo, no se contabilizaba.

Los modelos generados: contienen 921 reacciones y 690 metabolitos para el modeloUnion y 900 reacciones y 680 metabolitos para el modeloIntersecto. En estos modelos se evaluó la producción de Salinosporamida A, Salinosporamida B y Biomasa. Con estos modelos se realizan predicciones cuantitativas más certeras. Las reacciones que los modelos conservaron se encuentran en el Anexo IV. Las predicciones determinadas se presentan en la Tabla 6.7.

Tabla 6.7 Evaluación de modeloUnion y modeloIntersecto

Modelo	**Salinosporamida A mM**	**Salinosporamida B mM**	**Crecimiento mg/ml**
modeloUnion	0.0483	0.0552	0.0065
modeloIntersecto	0.0300	0.0419	0.0030
Determinados HPLC	0.0116		0.0015

Los resultados mostrados aquí son cuantitativamente más semejantes a los resultados de concentración de Salinosporamida A medidos en HPLC, ya que el ajuste al minimizar los modelos aproxima el modelo a los resultados que se midieron en HPLC. Por esta razón es que estos modelos se utilizan para predecir concentraciones cuantitativas más cercanas a la realidad y poder considerar aquellos flujos que son distribuidos hacia la producción de otros metabolitos.

Una vez generados estos modelos, se procedió a correr sobre el modeloUnion, que es el que contenia todos los genes y reacciones que mostraron variación en los experimentos evaluados, para tratar de tener una mayor área de búsqueda, en las metodologías para hacer modificaciones genéticas sobre el organismo.

6.3.3 Evaluación *in-silico* de modificaciones genéticas

Las herramientas para evaluar modificaciones geneticas *in silico* fueron: OptKnock, Optgene, GDLS, OptForce, MOST y FSEOF. Para todas estas herramientas fue necesario realizar una lista de reacciones a evaluar. La lista no considera las reacciones de biomasa, de energía, intercambio y transporte.

Al evaluar la herramienta Optknock, como parámetro se pedían como máximo 10 reacciones a bloquear. La herramienta solo predijo 4, para las cuales se identificó a que subsistema pertenecían y al bloquearlas cuál era la variación de producción de Salinosporamida A.

Tabla 6.8 Predicciones mediante OptKnock

Reacción	**Subsistema**	**Salinosporamida A mM**
r_0045	Metabolismo de alanina, aspartato y glutamato; metabolismo de Arginina y prolina	0.0483
r_0113	Biosintesis de Folato	0.0483
r_0261	Biosíntesis de Folato	0.0483
r_0744	Metabolismo de Arginina y Prolina	0.0483

La Tabla 6.8 presenta las 4 reacciones predichas mediante OptKnock. Como se observa la evaluación de la concentración de Salinosporamida A no varió. Sin embargo, la evaluación de las rutas metabólicas que bloquea nos indica como el modelo redirige los flujos para aumentar la producción. En el caso de las reacciones r_0045 ((S)-1-pirrolina-5-carboxilato: NAD+ oxidoreductasa)y r_0744 (L-Glutamato-5-semialdehido: NADP+ 5-oxidoreductasa/fosforilación) estas deleciones propician la redirección de los flujos hacia un aumento de la producción de piruvato, y este a su vez aumente la producción de acetyl-CoA que es un precursor de Salinosporamida A. En el caso de las reacciones relacionadas con la biosíntesis de Folato (r_0113, 2-amino-4-hidroxi-6-(D-eritro-1,2,3-trihidroxipropil)-7,8-dihidropteridina: glicolialdehido-liasa y r_0261, 7,8-dihidropteroato:L-glutamato ligasa ADP-formación), el modelo busca aumentar el flujo de la sintesis de S-adenosil-L-Metionina (SAM) que es el precursor de cloroetilmalonil-CoA, otro bloque de formación de Salinosporamida A. Con estas variaciones se estarían aumentando 2 de los 3 precursores de Salinosporamida A y en todos los casos se estaría buscando la reducción de producción de glutamato en el organismo, que aparentemente desvía la producción hacia otros acil-CoA, de cadenas más largas.

Tabla 6.9 Predicciones mediante optGene

Reacción	**Subsistema**	**Salinosporamida A mM**
r_0040	Degradacion de Valina Leucina e isoleucina; Metabolismo de propanoato	0.0483
r_0082	Degradacion de Valina Leucina e isoleucina; Metabolismo de propanoato	0.0483
r_0142	Degradacion de Xylano; Degradacion de Benzoato; Degradación de Dioxinas	0.0483
r_0221	Metabolismo de Tirosina; Degradación de estireno	0.0483
r_0624	Metabolismo de Glutation	0.0483
r_0666	Metabolismo de Tirosina; Degradación de estireno	0.0483
r_0669	Metabolismo del Azúfre	0.0483
r_0685	Metabolismo de Purina	0.0483
r_1139	Metabolismo butanoato	0.0483

Los resultados de OptGene se presentan en la Tabla 6.9. Al bloquear las reacciones r_0040 (Metilmalonil-CoA: CoA Carbonilmutasa) y r_0082 (Metilmalonato semialdehido: NAD+ oxidorreductasa), se reduce la formación de succinil-CoA y propanil-CoA. Estos precursores derivados de acil-CoA no son requeridos para la formación de Salinosporamida A. Las reacciones r-0142 (2-oxopenta-4-enoato hidratasa), r-0221 (4 maleylacetoacetato cis-trans-isomerasa) y r-0666 (homogentizado:oxigeno 1,2 oxidoreductasa deciclante)son reacciones irreversibles que están relacionadas con la degradación de fenilalanina a formación de acetyl-CoA o piruvato. El bloqueo de estas reacciones evita la degradación de los compuestos fenólicos en el organismo que son los precursores de shikimato otro de los precursores de formación de Salinosporamida A. La reacción r-0624 (glutatión gamma-gluamilaminopeptidasa) está involucrada en la formación de glutamato, el bloqueo de esta reacción propiciaría una reducción de formación de glutamato en el organismo. Las reacciones r_0669 (hidrógeno-sulfuro:ferredoxina oxidorreductasa) y r-1139 (succinato:oxidorreductasa aceptor) están involucradas en la formación del precursor S-Adenosyl-Metionina. La primera se encuentra dentro de la ruta de formación de sulfito, donde se bloquea la formación de sulfito a partir de los recursos de azúfre que hay en el microorganismo y la segunda se sitúa en el TCA, donde evita que el ciclo siga hacia la formación de succinil-CoA, al bloquear la formación de Sulfito y Succinyl-CoA se propicia la formación de SAM, estos resultados son consistentes con lo observado en los medios minimos donde, el uso de sulfito en el medio reducia la producción de salinosporamida A. En el caso de la reacción r_0685 (Inosina ribohidrolasa) que produce hypoxanthine en una

reacción reversible a partir de inosina, se desconoce a la formación de cuál de los precursores se busca desviar este flujo, ya que este flujo tiene otras rutas alternativas de transformación.

Tabla 6.10 predicciones GDLS

Reacción	**Subsistema**	**Salinosporamida A mM**
r_0141	Ciclo del citrato, Ciclo de los ácidos tricarboxilicos	0.0483
r_0669	Metabolismo del Azúfre	0.0483

Con la herramienta GDLS (Tabla 6.10) se encontraron dos predicciones similares a las encontradas con la herramienta optGene. La reacción r-0141 (2-oxoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa decarboxilación), también busca interrumpir el ciclo TCA en la formación de succinil-CoA a partir de sulfito y la reacción r_0669 (hidrógeno-sulfuro:ferredoxina oxidorreductasa) que desvía los flujos hacia la producción de SAM, esta misma reacción también fue predicha por OptGene. Esta similitud en resultados se basa en que ambas herramientas hacen la simulación de la deleción de genes mediante FBA, gen a gen sobre el modelo a escala genómica, y determinan con cuál de las deleciones predichas se obtiene la mejor puntuación de acuerdo a la función objetivo que se desea cumplir. En ambos casos se buscaba maximizar la concentración de Salinosporamida A.

Tabla 6.11 predicciones de OptForce

Reacción	**Subsistema**	**Salinosporamida A mM**
r_0994	Glycolysis/Gluconeogenesis; Ciclo de citrato (TCA cycle); Metabolismo de Piruvato	0.0483

La Tabla 6.11, muestra las predicciones hechas por la herramienta optForce, que está diseñada para aumentar la producción de metabolitos. Esta, en comparación de las otras, busca cualquier modificación genética y/o mezcla de ellas que pueda aumentar la producción del metabolito. En este caso, solo predijo una modificación genética, que fue el KnockOut de la reacción r_0994 (2-oxoglutarato dehidrogenasa complejo: piruvate dehidrogenasa segundo paso), la cual une dos ciclos que transforman piruvato a Tiamina y Tiamina a acetyl-CoA, el bloqueo de esta reacción evitaría el flujo de nutrientes en estos ciclos, y forzaría la transformación de Piruvato a acetyl-CoA, sin pasar por la formación del metabolito intermedio de Tiamina, lo que implicaría la perdida de sustratos y energía por formación de metabolitos intermedios.

Tabla 6.12 predicciones MOST

Gen	**Subsistema**	**Salinosporamida A mM**
Strop1863	Sintesis de CoA desde (R)-Pantotenato	0.0483
Strop0004	Oxidoreductasa, formación de pentosas a partir de hexosas	0.0483
Strop4278	Sintesis de CoA desde (R)-Pantotenato	0.0483
Strop3024	Oxidoreductasa, Biosintesis de los ácidos grasos	0.0483
Strop1192	Biosintesis de los ácidos grasos,	0.0483

La Tabla 6.12 presenta las predicciones de MOST, esta herramienta predice *knockouts* de genes que aumentan la producción del metabolito deseado. Los Genes Strop1863 (fosfopantotenoilcisteina decarboxilasa) y Strop4278 (tipo III pantotenato kinasa) están involucrados en la biosíntesis de Pantotenato, el bloqueo de estos genes impide que se formen fosfopantotenoil-cisteína y fosfopanteteina. En ambos casos se bloquea la incorporación de moléculas de L-cisteína a moléculas fosfopantotenato lo que provocaría que todo el pantotenato del sistema pasara a coenzyma A y que la cisteína se utilice para formar S-adenosyl-Metionina. El gen Strop0004 (6-fosfogluconato dehidrogenasa) provoca la degradación de hexosas a pentosas, su ausencia en el organismo provocaría un mayor flujo hacia la formación de piruvato que aumenta la producción de acetyl-CoA. La ausencia de Strop3024, que también es una oxidorreductasa, bloquea las transformaciones de los ácidos grasos a cadenas más largas de acil-transferasas. Por último el gen Strop1192 (malonil-ACP: transferasa) que también evita la transformación de malonil-CoA en acidos grasosde ácidos grasos, evitando que se formen otras cadenas de acil-transferasas.

Las reacciones mostradas en la Tabla 6.13, son las reacciones que en las predicciones hechas con FSEOF, muestran las variaciones más grandes de producción. Para seleccionarlas se verificó que el aumento en el flujo de esta reacción fue al menos el doble de la inicial, esto solo como estrategia de selección y sin que ninguno de los puntos de predicción decayera. Una vez identificados se predijo la producción de Salinosporamida A, aumentando al doble el flujo de la reacción en cada punto. La relación del aumento de la producción de Salinosporamida A se encuentra en la tercera columna. Como se observa, se encontraron dos reacciones que predicen aumentos muy altos en la producción r_0382 (ATP: L-metionina S-adenosiltransferasa) y r_0338 (ATP: adenosina 5-fosfotransferasa).

Tabla 6.13 Estrategia para sobreexpresión de genes FSEOF

Reacción	**Subsistema**	**Final/Incial**
r_0983	Fosforilación oxidativa	1.92
r_0241	Biosintesis de Fenilalanina, Tirosina y Triptofano	
r_0717	Metabolismo de Alanine, Aspartato and Glutamato; Metabolismo ácido Cianoamino; Metabolismo de Nitrogeno	1.66
r_1395	Biosintesis de Salinosporamidas	
r_0477	Ciclo de citrato (TCA ciclo)	2.82
r_0873	Metabolismo de Alanina, Aspartato y Glutamato; Metabolismo de purina	1.8
r_0405	Biosintesis de Fenilalanina Tirosina y Triptofan	
r_0220	Metabolismo de Histidina	1.82
r_0382	Metabolismo de cisteína y metionina	1700
r_1121	Ruta pentosa-fosfato; fijación de carbono	1.72
r_0689	Ciclo de citrato (ciclo TCA); Metabolismo de Glicosilato y dicarboxilato	2.79
r_0338	Metabolismo de Purina	1700

Se identificaron 12 reacciones que aumentaban la producción de Salinosporamidas. Las reacciones r_0983, r_0341, r_0382 y r_0689 se encuentran en el subsistema de metabolismo de cisteína y metionina, estas reacciones al aumentar producen un aumento en la producción de Pirofosfato, Ortofosfato y S-adenosil-L-metionina, a partir de Metionina. Sin embargo, se probó *in silico* el aumento de estos precursores con respecto a la producción de Salinosporamida A y no se observó aumento en la producción del mismo. El segundo grupo de reacciones, r_0241, r_0405 y r_1395, se encuentra en las rutas que estimulan el aumento de la producción de corismato, que es el precursor de 3-ciclohex-2-enilalanina, el aminoácido no proteinogénico que integra el gen *salB*, la NRPS que forma los salinosporamidas. Al hacer la evaluación *in silico* de esta ruta, se encontró que los precursores que podrían aumentar la producción de este subsistema son fenilalanina, tirosina y triptofano. Con respecto al resto de las reacciones, r_0717, r_0477, r_0873, r_0220 y r_0338, estas estimulan la producción de las rutas que producen acetil-CoA, el tercer sustrato de Salinosporamida. Al hacer la evaluación *in silico* de esta ruta, se identificó que los sustratos que pueden alimentar estas rutas son xylosa y glutamato, por lo tanto, se evaluó mediante fermentación la variación de la concentración de los sustratos mencionados.

Todos los precursores que alimentaban las rutas de transformación, fueron predichos mediante Paint4net (Kostromins and Stalidzans 2012) que modelaban la ruta metabólica que relacionaba cada una de las reacciones hasta la formación de Salinosporamida A (Anexo V), así es como se pudo

observar cuales eran los precursores que se podrían evaluar para la sobrexpresión. Al igual que en el capítulo 6.3.1, se evaluaron diversas concentraciones de los precursores para definir las concentraciones de precursores a evaluar en la fermentación.

Para probar la sobrexpresion de metabolitos, se decidió evaluar mediante la suplementación de sustratos si las sobrexpresiones predichas concordaban con la realidad. Se ensayaron dos concentraciones distintas de cada uno de los precursores identificados y una mezcla de todos, todas estas suplementaciónes se evaluaron sobre el medio de producción. Los resultados se muestran en la Figura 6.2.

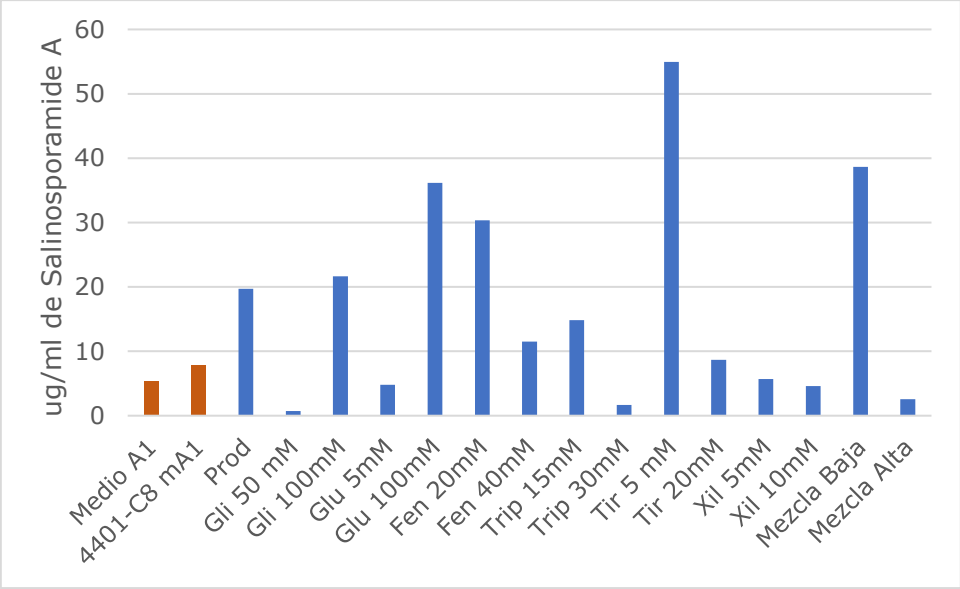

Figura 6.2 Producción de Salinosporamida A (µg/ml) en medio suplementado

La Figura 6.2 presenta los resultados del cultivo de *Salinispora* en los medios de producción suplementados con los sustratos que evaluan la sobreexpresión de las reacciones predichas por FSEOF a dos concentraciones distintas. De acuerdo a lo observado, el sustrato que mejoró la producción del metabolito en mayor cantidad (55 µg/ml), fue tirosina 5mM (menor concentración). Este sustrato estimula la ruta de producción del precursor corismato. El segundo sustrato fue glutamato 100 mM (concentración alta), que estimula la ruta de producción de acetil-CoA. El tercer sustrato que mejoro la producción fue fenilalanina 20 mM (concentración baja), que también estimula la producción de corismato. Los otros sustratos no aumentaron la producción de Salinosporamida A. Sin embargo al mezclar en baja concentración todos los sustratos se observa que se llega a aumentar la concentración del metabolito al doble de la inicial. Esto se debe principalmente a la presencia de tirosina en

el medio. Por lo tanto, se puede considerar que el sustrato que limita un aumento en la producción de la Salinosporamida es el corismato.

En la Figura 6.2 también se muestran los resultados obtenidos en el ensayo del capitulo 4, donde se evaluo la modificación genética de la bacteria, y estas determinaciones se hicieron utilizando el medio A1 (mantención), en el que se produce 4 veces menos que en el medio de producción. Si se toman en cuenta estas observaciones, se podría obtener con la cepa modificada en el medio de producción una concentración de salinosporamida A de 31 μg/ml.

Otra forma de probar la sobrexpresión es mediante ingeniería metabólica. De todas las reacciones predichas por FSEOF se seleccionó una de las reacciones para ser evaluada r_0382, la cual estimula la producción de S-Adenosil-metionina, y mediante el uso de sustratos no se observo ningún efecto sobre esta ruta. Sin embargo esta estrategia queda pendiente para ser evaluada como trabajo futuro. Así como también la evaluación de *knockouts* predichos por las otras herramientas computacionales, queda recomendado para evaluar en trabajos futuros, pues el tiempo de crecimiento y transformación de la bacteria es muy lento.

Con el uso de las herramientas computacionales de ingeniería metabólica se logro reducir el tiempo de búsqueda sobre las posibles rutas metabólicas que pueden incrementar la producción de los metabolitos secundarios. Es importante considerar que también se logro evaluar una ruta metabolica que aparentemente no tenía muchos efectos sobre la producción del metabolito secundario. Esta fue la ruta del corismato, que al aumentar el flujo por esta ruta se logro observar un aumento de 2.8 veces en la producción del metabolito secundario. Y que no se había reportado en estudios previos donde la producción de salinosporamida A se han basado en estimular las rutas de SAM y Acil-CoA (Eustáquio et al. 2009; Lechner 2011; J. J. Zhang, Moore, and Tang 2018).

7 Conclusiones

El objetivo de la presente tesis consistió en evaluar estrategias de ingeniería metabólica para aumentar la producción de Salinosporamida A en *Salinispora tropica* CNB440. Con la finalidad de cumplir este objetivo se presentan las siguientes conclusiones.

- Mediante esta investigación se logró definir la sensibilidad de *Salinispora tropica* CNB440 a 3 antibióticos: la cepa es sensible a Kanamicina (100 ug/ml), Apramicina (25 µg/ml) y Tioestreptona (12 µg/ml).
- Se definió una estrategia de cuantificación de salinosporamida A, mediante HPLC, con standard analítico del metabolito y se pudo definir el límite de detección del mismo (1µg/ml).
- Se lográmodificar genéticamente mediante doble recombinación homóloga con pGM1190 la cepa *S. tropica* CNB440, por lo que esta herramienta molecular puede ser utilizada para la transformación de la misma a nivel cromosomal.
- Se observó aumento en la concentración de Salinosporamida A, al truncar la producción del metabolito secundario Sporolides, lo que indica que si hay competencia de precursores entre estos metabolitos secundarios.
- La estrategia de deleción de clúster de genes competitivos es una buena aproximación para incrementar la producción.
- Se pudo obtener predicciones cualitativas mediante el modelo a escala genómica sobre la producción y crecimiento de Salinosporamida A, como lo son los sustratos que mejoran la producción que el caso de los nitratos y aquellos sustratos que limitan el crecimiento de la bacteria, como lo es el alginato.
- La determinación de la producción de Salinosporamida A mediante medios mínimos ayudó a integrar nueva información al modelo a escala genómica iCC908 de *S. tropica* mediante la caja de herramientas MetaboTools, lo que ayudo a obtener un modelo a escala genómica con predicciones cuantitativas más certeras.
- Mediante el uso del modelo a escala genómica se logró predecir dos aminoácidos que aumentan la producción de Salinosporamida A, tirosina y glicina.
- Se obtuvieron genes y reacciones objetivo para la realización de *knockouts* y sobreexpresiones que podrían aumentar la producción de Salinosporamida A, mediante diversas metodologías de predicción

usando el modelo a escala genómica. Esto permitió restringir el número de posibles modificaciones a realizar en el laboratorio.

- Se pudo evaluar la sobrexpresion de los genes Strop_1845 (corismato sintasa), Strop_1846 (shikimate kinasa) y Strop_1039 (aminotransferasa de cadena ramificada) mediante la suplementación de precursores, que aumentaban los flujos metabólicos asociados a las sobrexpresiones. Se encontró nuevamente que tirosina (5mM) aumenta en mayor grado la producción de Salinosporamide A. También se encontó que suplementación con glutamato o fenilalanina incrementaban la producción
- Dos de las estrategias evaluadas *in silico* coincidieron en la ruta que tenía que ser estimulada para el aumento de la producción de Salinosporamida A, que es la ruta de formación de corismato.
- Como trabajo futuro es necesario evaluar el medio de fermentación de S. tropica CNB4401 para identificar si esta pudo expresar alguno de los genes silenciados presentes en su genoma.
- También es necesario, determinar la concentración de Salinosporamida A con el medio de producción mejorado y en las cepas modificadas genéticamente.

8 Bibliografía

Ahmed, Lina et al. 2013. "Salinispora Pacifica Sp. Nov., an Actinomycete from Marine Sediments." *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 103(5): 1069–78.

Anjum, Komal et al. 2017. "Emerging Biopharmaceuticals from Bioactive Peptides Derived from Marine Organisms." *Chemical Biology and Drug Design* 90(1): 12–30. http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2016.11.015.

Aurich, Maike K., Ronan M.T. Fleming, and Ines Thiele. 2016. "MetaboTools: A Comprehensive Toolbox for Analysis of Genome-Scale Metabolic Models." *Frontiers in Physiology* 7(AUG): 327.

Beesoo, Rima, Vidushi Neergheen-Bhujun, Ranjeet Bhagooli, and Theeshan Bahorun. 2014. "Apoptosis Inducing Lead Compounds Isolated from Marine Organisms of Potential Relevance in Cancer Treatment." *Mutation research* 768: 84–97. http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2014.03.005.

Bonet, Bailey et al. 2015. "Direct Capture and Heterologous Expression of Salinispora Natural Product Genes for the Biosynthesis of Enterocin." *Journal of Natural Products* 78(3): 539–42.

Burgard, Anthony P., Priti Pharkya, and Costas D. Maranas. 2003. "OptKnock: A Bilevel Programming Framework for Identifying Gene Knockout Strategies for Microbial Strain Optimization." *Biotechnology and Bioengineering* 84(6): 647–57.

Choi, Hyung Seok, Sang Yup Lee, Tae Yong Kim, and Han Min Woo. 2010. "In Silico Identification of Gene Amplification Targets for Improvement of Lycopene Production." *Applied and Environmental Microbiology* 76(10): 3097–3105.

Cobb, Ryan E., Yunzi Luo, Todd Freestone, and Huimin Zhao. 2013. Synthetic Biology *Drug Discovery and Development via Synthetic Biology*. First Edit. Elsevier Inc. http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394430-6.00010-8.

Contador, C. A., V. Rodríguez, B. A. Andrews, and J. A. Asenjo. 2015. "Genome-Scale Reconstruction of Salinispora Tropica CNB-440 Metabolism to Study Strain-Specific Adaptation." *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 108(5): 1075–90.

Dharmaraj, Selvakumar. 2010. "Marine Streptomyces as a Novel Source of

Bioactive Substances." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26(12): 2123–39.

Difco. 2000. "Difco and BBL Brand Soy Peptones." https://www.bdbiosciences.com/documents/tat_animalfree_peptones.pdf .

Endo, Atsushi, and Samuel J Danishefsky. 2005. "Total Synthesis of Salinosporamide A." (i): 8298–99.

Eustaquio, A. S. et al. 2009. "Biosynthesis of the Salinosporamide A Polyketide Synthase Substrate Chloroethylmalonyl-Coenzyme A from S-Adenosyl-L-Methionine." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(30): 12295–300. http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0901237106.

Eustáquio, Alessandra S et al. 2009. "Biosynthesis of the Salinosporamide A Polyketide Synthase Substrate Chloroethylmalonyl-Coenzyme A from S-Adenosyl-L-Methionine." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(30): 12295–300.

Eustáquio, Alessandra S., and Bradley S. Moore. 2008. "Mutasynthesis of Fluorosalinosporamide, a Potent and Reversible Inhibitor of the Proteasome." *Angewandte Chemie - International Edition* 47(21): 3936–38.

Eustáquio, Alessandra S, Florence Pojer, Joseph P Noel, and Bradley S Moore. 2008. "Discovery and Characterization of a Marine Bacterial SAM-Dependent Chlorinase." *Nature chemical biology* 4(1): 69–74.

Feling, Robert H et al. 2003. "A Cytotoxic Proteasome Inhibitor 10." *Andgewandte Chemie, Int. Edition* (42): 355–57.

Feng, Haiwei et al. 2014. "Identification and Characterization of the Nitrate Assimilation Genes in the Isolate of Streptomyces Griseorubens JSD-1." (3): 1–9.

Fenical, William et al. 2009. "Discovery and Development of the Anticancer Agent Salinosporamide A (NPI-0052)." *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 17(6): 2175–80. http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2008.10.075.

Fenical, William, and Paul R Jensen. 2006. "Developing a New Resource for Drug Discovery: Marine Actinomycete Bacteria." *Nature chemical biology* 2(12): 666–73.

Fernandez, F J, and A Tomasini. 2003. "Microbial Secondary Metabolites

Production and Strain Improvement." 2(July): 322–33.

Gomez-Escribano, Juan Pablo, and Mervyn J. Bibb. 2011. "Engineering Streptomyces Coelicolor for Heterologous Expression of Secondary Metabolite Gene Clusters." *Microbial Biotechnology* 4(2): 207–15.

Groll, Michael, Robert Huber, and Barbara C M Potts. 2006. "Crystal Structures of Salinosporamide A (NPI-0052) and B (NPI-0047) in Complex with the 20S Proteasome Reveal Important Consequences of -Lactone Ring Opening and a Mechanism for Irreversible Binding." (7): 5136–41.

Jensen, Paul R, Bradley S Moore, and William Fenical. 2015. "The Marine Actinomycete Genus Salinispora : A Model Organism for Secondary Metabolite Discovery." *Natural Product Reports* 32: 738–51. http://dx.doi.org/10.1039/C4NP00167B.

Jones, A. M., and M. A. Porter. 1998. "Vegetable Oils in Fermentation: Beneficial Effects of Low-Level Supplementation." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 21(4–5): 203–7.

Kale, Andrew J., Ryan P. McGlinchey, and Bradley S. Moore. 2010. "Characterization of 5-Chloro-5-Deoxy-D-Ribose 1-Dehydrogenase in Chloroethylmalonyl Coenzyme a Biosynthesis: Substrate and Reaction Profiling." *Journal of Biological Chemistry* 285(44): 33710–17.

Kelley, James J. et al. 2015. "MOST: A Software Environment for Constraint-Based Metabolic Modeling and Strain Design." *Bioinformatics* 31(4): 610–11.

Kim, Byoungjin et al. 2015. "Applications of Genome-scale Metabolic Network Model in Metabolic Engineering." *J Ind Microbiol Biotechnol* 42: 339–48.

Komatsu, Mamoru et al. 2010. "Genome-Minimized Streptomyces Host for the Heterologous Expression of Secondary Metabolism." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(6): 2646–51. http://www.pnas.org/content/107/6/2646.abstract.

Kostromins, Andrejs, and Egils Stalidzans. 2012. "BioSystems Paint4Net : COBRA Toolbox Extension for Visualization of Stoichiometric Models of Metabolism." *BioSystems* 109(2): 233–39. http://dx.doi.org/10.1016/j.biosystems.2012.03.002.

Kumar, Ravi Ranjan, and Vasantba J Jadeja. 2016. "Isolation of Actinomycetes : A Complete Approach." *International journal of current microbiology and applied sciences* 5(5): 606–18.

Lakshmanan, Meiyappan, Lokanand Koduru, and Dong-Yup Lee. 2018. "Software Applications for Phenotype Analysis and Strain Design of Cellular Systems." *Emerging Areas in Bioengineering* 2: 771–91.

Lam, Kin S. et al. 2007. "Effects of Halogens on the Production of Salinosporamides by the Obligate Marine Actinomycete Salinispora Tropica." *Journal of Antibiotics* 60(1): 13–19.

Lechner, Anna. 2011. "Regulation and Genetic Engineering of Salinosporamide A Biosynthesis."

———. 2011. "Selective Overproduction of the Proteasome Inhibitor Salinosporamide A via Precursor Pathway Regulation." *Chemistry and Biology* 18(12): 1527–36.

Lechner, Anna, and Molekular- Zellbiologie. "Heidelberg Medizinische Fakultät Mannheim Regulation and Genetic Engineering of Salinosporamide A Biosynthesis." : 360.

Lun, Desmond S et al. 2009. "Large-Scale Identification of Genetic Design Strategies Using Local Search." *Molecular Systems Biology* 5(296): 1–8. http://msb.embopress.org/cgi/doi/10.1038/msb.2009.57.

Macherla, Venkat R. et al. 2005. "Structure-Activity Relationship Studies of Salinosporamide A (NPI-0052), a Novel Marine Derived Proteasome Inhibitor." *Journal of Medicinal Chemistry* 48(11): 3684–87.

Maldonado, Luis A. et al. 2005. "Salinispora Arenicola Gen. Nov., Sp. Nov. and Salinispora Tropica Sp. Nov., Obligate Marine Actinomycetes Belonging to the Family Micromonosporaceae." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55(5): 1759–66.

Manivasagan, Panchanathan et al. 2014. "Marine Actinobacteria: An Important Source of Bioactive Natural Products." *Environmental Toxicology and Pharmacology* 38(1): 172–88. http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2014.05.014.

Matsui, Kunio, Natsuyo Juri, Sumiko Marukawa, and Sabu Kasai. 1979. "Roseoflavin Formation by Streptomyces Davawensis." *Agricultural and Biological Chemistry* 43(10): 2189–90.

Mayer, Alejandro M S, Abimael D. Rodríguez, Roberto G S Berlinck, and Mark T. Hamann. 2009. "Marine Pharmacology in 2005-6: Marine Compounds with Anthelmintic, Antibacterial, Anticoagulant, Antifungal, Anti-Inflammatory, Antimalarial, Antiprotozoal, Antituberculosis, and Antiviral

Activities; Affecting the Cardiovascular, Immune and Nervous Syste." *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1790(5): 283–308. http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.08.008.

McGlinchey, Ryan P. et al. 2008. "Engineered Biosynthesis of Antiprotealide and Other Unnatural Salinosporamide Proteasome Inhibitors." *Journal of the American Chemical Society* 130(25): 7822–23.

Meyers, Paul R et al. 1998. "Novel Method for Rapid Measurement of Growth of Mycobacteria in Detergent-Free Media Novel Method for Rapid Measurement of Growth of Mycobacteria in Detergent-Free Media." (October): 5–8.

Mincer, Tracy J, Paul R Jensen, Christopher a Kauffman, and William Fenical. 2002. "Widespread and Persistent Populations of a Major New Marine Actinomycete Taxon in Ocean Sediments Widespread and Persistent Populations of a Major New Marine Actinomycete Taxon in Ocean Sediments." *Applied and Environmental Microbiology* 68(10): 5005–11.

Miyanaga, Akimasa et al. 2011. "Discovery and Assembly-Line Biosynthesis of the Lymphostin Pyrroloquinoline Alkaloid Family of Mtor Inhibitors in Salinispora Bacteria." *Journal of the American Chemical Society* 133(34): 13311–13.

Mo, SangJoon; Ban, Yeon-Hee; Won Park, Je; Ji Yoo, Young; Joon Yoon, Yeo. 2009. "Enhanced FK506 Production in Streptomyces Clavuligerus CKD1119 by Engineering the Supply of Methylmalonyl-CoA Precursor." *J Ind Microbiol Biotechnol (2009)* (36): 1473–82.

Nett, Markus et al. 2009. "Function-Oriented Biosynthesis of??-Lactone Proteasome Inhibitors in Salinispora Tropica." *Journal of Medicinal Chemistry* 52(19): 6163–67.

Nett, Markus, Haruo Ikeda, and Bradley S Moore. 2009. "Genomic Basis for Natural Product Biosynthetic Diversity in the Actinomycetes." *Natural product reports* 26(11): 1362–84.

Ng, Yi Kai et al. 2013. "Developmental Cycle and Pharmaceutically Relevant Compounds of Salinispora Actinobacteria Isolated from Great Barrier Reef Marine Sponges." *Applied Microbiology and Biotechnology* 97(7): 3097–3108.

O'Brien, Edward J., Jonathan M. Monk, and Bernhard O. Palsson. 2015. "Using Genome-Scale Models to Predict Biological Capabilities." *Cell* 161(5): 971–

87. http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.019.

Orth, Jeffrey D., Ines Thiele, and Bernhard O. Palsson. 2010. "What Is Flux Balance Analysis?" *Nature Biotechnology* 28(3): 245–48. http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1614.

Paul, A. K., and A. K. Banerjee. 1983. "Determination of Optimum Conditions for Antibiotic Production by Streptomyces Galbus." *Folia Microbiologica* 28(5): 397–405.

Penn, Julia et al. 2006. "Heterologous Production of Daptomycin in Streptomyces Lividans." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 33(2): 121–28.

Potts, Barbara C., and Kin S. Lam. 2010. 8 Marine Drugs *Generating a Generation of Proteasome Inhibitors: From Microbial Fermentation to Total Synthesis of Salinosporamide A (Marizomib) and Other Salinosporamides*.

Rachid, Shwan et al. 2011. "Mining the Cinnabaramide Biosynthetic Pathway to Generate Novel Proteasome Inhibitors." *ChemBioChem* 12(6): 922–31.

Ranganathan, Sridhar, Patrick F. Suthers, and Costas D. Maranas. 2010. "OptForce: An Optimization Procedure for Identifying All Genetic Manipulations Leading to Targeted Overproductions." *PLoS Computational Biology* 6(4).

Razmilic, Valeria. 2017. "METABOLISM ANALYSIS OF Streptomyces Leeuwenhoekii C34 WITH A GENOME SCALE MODEL AND IDENTIFICATION OF BIOSYNTHETIC GENES OF SPECIALISED METABOLITES BY GENOME MINING." Universidad de Chile.

Razmilic, Valeria, Jean F. Castro, Barbara Andrews, and Juan A. Asenjo. 2018. "Analysis of Metabolic Networks of Streptomyces Leeuwenhoekii C34 by Means of a Genome Scale Model: Prediction of Modifications That Enhance the Production of Specialized Metabolites." *Biotechnology and Bioengineering* 115(7): 1815–28.

Reed, Katherine A. et al. 2007. "Salinosporamides D-J from the Marine Actinomycete Salinispora Tropica, Bromosalinosporamide, and Thioester Derivatives Are Potent Inhibitors of the 20S Proteasome." *Journal of Natural Products* 70(2): 269–76.

Reeves, Andrew R. et al. 2006. "Effects of Methylmalonyl-CoA Mutase Gene Knockouts on Erythromycin Production in Carbohydrate-Based and Oil-Based Fermentations of Saccharopolyspora Erythraea." *Journal of*

Industrial Microbiology and Biotechnology 33(7): 600–609.

Schellenberger, Jan et al. 2011. "Quantitative Prediction of Cellular Metabolism with Constraint-Based Models: The COBRA Toolbox v2.0." *Nature protocols* 6(9): 1290–1307.

Senger, Ryan et al. 2015. "Designing Metabolic Engineering Strategies with Genome-Scale Metabolic Flux Modeling." *Advances in Genomics and Genetics* Volume 5: 93. http://www.dovepress.com/designing-metabolic-engineering-strategies-with-genome-scale-metabolic-peer-reviewed-fulltext-article-AGG.

Shen, Ben et al. 2015. "Enediynes: Exploration of Microbial Genomics to Discover New Anticancer Drug Leads." *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 25(1): 9–15. http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.11.019.

Shin, Su Kyoung, Delin Xu, Hyung Jin Kwon, and Joo Won Suh. 2006. "S-Adenosylmethionine Activates adpA Transcription and Promotes Streptomycin Biosynthesis in Streptomyces Griseus." *FEMS Microbiology Letters* 259(1): 53–59.

Srinivasulu, B. et al. 2002. "Neomycin Production with Free and Immobilized Cells of Streptomyces Marinensis in an Airlift Reactor." *Process Biochemistry* 38(4): 593–98.

Tsueng, Ginger, and Kin S Lam. 2007. "Stabilization Effect of Resin on the Production of Potent Proteasome Inhibitor NPI-0052 during Submerged Fermentation of Salinispora Tropica." *The Journal of antibiotics* 60(7): 469–72. http://dx.doi.org/10.1038/ja.2007.61.

Tsueng, Ginger, and Kin S. Lam. 2008. "Growth of Salinispora Tropica Strains CNB440, CNB476, and NPS21184 in Nonsaline, Low-Sodium Media." *Applied Microbiology and Biotechnology* 80(5): 873–80.

Tsueng, Ginger, and Kin Sing Lam. 2010. "A Preliminary Investigation on the Growth Requirement for Monovalent Cations, Divalent Cations and Medium Ionic Strength of Marine Actinomycete Salinispora." *Applied Microbiology and Biotechnology* 86(5): 1525–34.

Tsueng, Ginger, and Kin Sing Lam. 2009. "Effect of Cobalt and Vitamin B12 on the Production of Salinosporamides by Salinispora Tropica." *The Journal of antibiotics* 62(4): 213–16. http://dx.doi.org/10.1038/ja.2009.7.

Tsueng, Ginger, Sy Teisan, and Kin S. Lam. 2008. "Defined Salt Formulations for the Growth of Salinispora Tropica Strain NPS21184 and the Production

of Salinosporamide A (NPI-0052) and Related Analogs." *Applied Microbiology and Biotechnology* 78(5): 827–32.

Udwary, Daniel W. et al. 2007. "Genome Sequencing Reveals Complex Secondary Metabolome in the Marine Actinomycete Salinispora Tropica." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(25): 10376–81. http://www.pnas.org/content/104/25/10376%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17563368%5Cnhttp://www.pnas.org/content/104/25/10376.full.pdf.

Zhang, Gaiyun et al. 2014. "Diversity and Novelty of Actinobacteria in Arctic Marine Sediments." *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 105(4): 743–54.

Zhang, Jia Jia, Bradley S. Moore, and Xiaoyu Tang. 2018. "Engineering Salinispora Tropica for Heterologous Expression of Natural Product Biosynthetic Gene Clusters." *Applied Microbiology and Biotechnology* 102(19): 8437–46.

Zomorrodi, Ali R., Patrick F. Suthers, Sridhar Ranganathan, and Costas D. Maranas. 2012. "Mathematical Optimization Applications in Metabolic Networks." *Metabolic Engineering* 14(6): 672–86. http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2012.09.005.

Anexos

Anexo I Reactivos y Buffers

Todas las soluciones fueron autoclavadas para posterior uso en laboratorio.

Soluciones

- NaOH 0.3M (12g de NaOH en 1L de agua destilada)
- NaOH 1M (40 g de NaOH en 1L de agua destilada)
- HCL 5M (153.19 ml de HCl al 37% en 1L de agua destilada)
- Glicerol 20% y 40% (200 y 400 ml en 1L de agua destilada)
- $MgCl_2$ 0.1M (9.52 g de $MgCl_2$ en 1L de agua destilada)
- $CaCl_2$ 0.1M (11.09 g de $CaCl_2$ en 1L de agua destilada)
- Solución de preservación de quimiocompetentes (85% v/v de $CaCl_2$ 0.1M y 15% glicerol)
- Tris-HCL pH7 (121.14 g de Tris en 800 ml de Agua destilada, ajustar solución a pH7 con HCl y llevar a un volumen final de 1L)
- Buffer Fosfato (PBS), pH 7. Diluir los siguientes reactivos en 1L de agua destilada y ajustar a pH 7.

KCl	0.2 g
KH_2PO_4	0.2 g
NaCl	8.0 g
Na_2HPO_4	1.44 g

Reactivos PCR

- dNTP's 10 mM (10µL de dATP 100 mM, 10 µL de dCTP 100mM, 10 µL de dGTP 100 mM y 10 µL de dTTP 100mM, y llevar a un volumen total de 100µL)
- Cebadores 10µM (10µl de Cebador 100mM y llevar a un volumen de 100 µL).
- PCR de colonias (Enzima TagPolimerasa, Buffer 5X Green para enzima Tag Polimerasa)
- PCR de clonación (Enzima Polimerasa Phussion, Buffer 5X phussion GC y DMSO puro)

Reactivos Gibson Assembly

- 5X Isothermal reaction buffer (PEG 8000 0.25g, 500uL de Tris-HCL 1M pH7.5, 50µL de $MgCl_2$ 0.5 M, 50 µL de DTT 0.5 M, 10µL de dATP 100

mM, 10 µL de dCTP 100mM, 10 µL de dGTP 100 mM y 10 µL de dTTP 100mM, 5 µL de NAD+ 50mM, llevar a un volumen total de 1 ml)

- 2X master mix Gibson Assembly (26.67 µL de 5X Isothermal reaction buffer, 0.5 µL T5 Exonuclease, 1.67 µL Phusion DNA Polymerase, 13.33 Taq DNA ligase, llevar a un volume de 100 µL).

Anexo II Ensayos de Biología Molecular

Ensayos de Sensibilidad a antibióticos Salinispora tropica CNB440

La determinación de sensibilidad a antibióticos se realizó en placas de medio A1, los antibióticos de ensayo fueron Apramicina, Kanamicina y Tioestreptona.

1. Se preparan medio A1 agar con Formulación Salina, y se agregan los antibióticos en las diferentes concentraciones.
2. Se inoculan las placas con 250 µL de *S. tropica,* de 3 días de crecimiento, lavado 2 veces con medio A1 sin antibióticos.
3. Crecer a 28°C por 72 horas.
4. Monitorear el crecimiento de la cepa a las 24 horas y 72 horas.
5. Registrar resultados.

Determinación de crecimiento de Salinispora tropica CNB-440

Para la determinación del crecimiento de *Salinispora tropica*, se utilizó un protocolo de determinación de proteínas totales para definir, el crecimiento del cultivo en el tiempo (Lechner, et al, 2011; Meyers, et al., 1998).

1. Se centrifuga 1 ml de la muestra de cultivo (13.800 x g) por 10 min para producir un pellet de células compacto.
2. Se retira el sobrenadante y se lavan con 1 ml de (PBS) pH 7,0. Y se centrifugan como se describe previamente. En este punto los pellets pueden preservarse a -20°C *para* análisis posterior.
3. El pellet es resuspendido en 0.1 ml de NaOH 1 M.
4. Los tubos sellados son puestos en un baño de agua hirviendo (100°C) por 10 min.
5. Las muestras se neutralizan por adición de 0.02 ml de HCl 5 M, se ajusta el volumen a 1 ml añadiendo PBS pH 7.0 (0.88 ml).
6. Las muestras son centrifugadas por 30 min y 0.8 ml de cada sobrenadante es tomado para la determinación de proteínas.
7. Para cada muestra determinar la absorbancia a 230 y 260 nm en celdas de cuarzo.
8. La concentración de proteínas en µg/ml se determina con la Ecuación 1

$$\left[Concentración\ de\ Proteínas\ \left(\frac{\mu g}{ml}\right)\right] = (183xA_{230}) - (75.8xA_{260})$$

Ecuación 1 Determinación de concentración de proteínas

Nota: El ensayo es lineal en el rango de 6 a 225 µg de proteína/ml, y los extractos de cultivos altamente turbios son diluidos en PBS para asegurar que las mediciones estén dentro del rango lineal.

Método de aislamiento de cepa CNB-440

Método modificado de Kumar and Jadeja (2016),

1. Tomar una alícuota de 1 ml de medio de cultivo a aislar.
2. Centrifugación a 4000 rpm por 5 minutos.
3. Añadir 0.1 ml de formulación salina y calentar a 55°C por 30 min.
4. Crecer por 3 horas más en medio A1 con formulación salina, suplementado con Ácido nalidixico 25 µg/ml y ciclohexemida 50 µg/ml.
5. Centrifugar muestra a 4000 rpm por 5 minutos. Quitar el sobrenadante.
6. Secar pellet con antibióticos durante la noche a 27°C.
7. Diluir muestra y plaquear en medio A1.

Extracción de ADN genómico.

Para la extracción de ADN genómico se utilizó el Kit de extracción de ADN genómico de DNAeasy UltraClean Microbial Kit de Qiagen.

Hidratación de Resina

1. Pesar resina, anotar peso.
2. Lavar 3 veces con Metanol grado técnico la resina pesada.
3. Lavar 6 veces con agua destilada.
4. Diluir la resina enjuagada con agua a una concentración final de 1.0 g/ml.
5. Autoclavar la dilución de resina agua destilada, preservar en esterilidad hasta uso en medio de fermentación

Material sin CO

Para la determinación de metabolitos mediante cromatografía, se sugiere la utilización de material libre de compuestos orgánicos. Para esto es necesario utilizar preferentemente viales de vidrio, previamente enjuagados para evitar la presencia de algún contaminante orgánico. Una vez el material limpio, proceder a realizar 2 enjuagues con agua destilada, 2 enjuagues con hexano, 2 enjuagues con acetona y dejar secar en estufa. Con esto se acarrean todos los compuestos orgánicos que permanecieran pegados al material. Nota: Para

asegurar la ausencia de materiales orgánicos se sugiere secar en mufla a 500°C el material envuelto en papel aluminio.

Condiciones de cultivo de las cepas

- *E. coli* para transformación se crece a una temperatura de 37°C a una velocidad de agitación de 650 rpm, por al menos 8 horas, con antibióticos de acuerdo a la resistencia que presente la cepa.
- *S. tropica* se creció a una temperatura de 28°C a una velocidad de agitación de 250 rpm. En un agitador orbital…, los cultivos se mantuvieron en crecimiento durante 4 semanas.
- *S. tropica* conjugada, se creció a una temperatura de 37°C a una velocidad de agitación de 250 rpm. En un agitador orbital…, los cultivos se mantuvieron en crecimiento durante 4 semanas.
- *S. tropica* para producción, se creció a una temperatura de 37°C a una velocidad de agitación de 250 rpm. En un agitador orbital…, los cultivos se mantuvieron en crecimiento durante 5 días, con adición de resina XAD7 a las 24 horas de iniciada la fermentación.

PCR de colonias conjugantes de S. tropica

Para verificar la integración del plásmido de conjugación para cada mutación realizada sobre la Cepa *S. tropica*, se realiza PCR de colonias a las bacterias conjugantes.

1. Bajo un ambiente estéril, picar colonias y resuspender la colonia en 30 µL de Agua estéril.
2. Tomar 10 µL de la solución de colonias en un tubo para centrifuga de 600 µL. Preservar el resto.
3. Calentar las células resuspendidas en Agua a 100°C por 10 min, y utilizar como DNA Templado.
4. Se prepara la mezcla de PCR como se describe:

Tabla 8.1 Mezcla de reactivos para PCR de colonias.

Componente	Volumen µL
ADN	5
dNTP's (10 mM)	0,4
Buffer 5X Green (STD)	4
Cebador (S) 10 µM	1
Cebador (R) 10 µM	1
Mg^{+2} (STD)	1,6
Taq Polimerasa (STD)	0,35
Agua	6,65

5. Programa PCR de 36 ciclos (b,c,d), 1 minuto por Kb que se desee amplificar(X) y temperatura de separación específica del cebador utilizado (Ts) (d):
    a. 95°C durante 5 min.
    b. 95°C durante 30 seg.
    c. 56°C durante 30 seg.
    d. Ts °C durante X min.
    e. Ts °C durante 10 min

PCR para clonación de fragmentos

Para obtener los fragmentos que dirigirán la conjugación para cada mutación realizada sobre la cepa *S. tropica*, se realiza PCR al ADN genómico de la cepa.

La mezcla de PCR es:

Tabla 8.2 Mezcla de reactivos para PCR.

Componente	Volumen µL
ADN (50 a 250 µg)	Vol. variable
dNTP's (10 mM)	1
Buffer 5X phussion GC	10
Cebador (S) 10 µM	2.5
Cebador (R) 10 µM	2.5
DMSO (STD)	1,5
Phussion (STD)	0,5
Agua	Completar 50 µL

Programa PCR de 30 ciclos (b,c,d), 20 segundos por Kb que se desee amplificar(X) y temperatura de separación específica del cebador utilizado (Ts) (d):

    a. 98°C durante 30 seg.
    b. 98°C durante 10 seg.
    c. Ts°C durante 20 seg.
    d. 72 °C durante X seg.
    e. 72 °C durante 5 min

Gibson Assembly

Para la reacción de Gibsson Assembly, se recomienda utilizar un total de 0.02 – 0.5 pmols de fragmentos de ADN.

1. Determinar los picomols contenidos en cada fragmento de ADN.

   pmols=(peso en ng) x 1000/(pares de base x 650 daltons).
2. La concentración del ADN que se hará reaccionar debe ser equimolar para cada fragmento.
3. Preparar la reacción en Hielo
   - Agregar master mix 2X 5 µL
   - Agregar cantidades equimolares de los fragmentos para llegar a un volumen total de 10 µL.
4. Incubar las muestras en un termociclador a 50°C por 60 min.
5. Preservar las muestras en Hielo o a -20°C hasta su transformación.

Preparación de bacterias E. coli quimiocompetentes

1. Correr precultivo de bacterias en LB a 37°C durante la noche
2. Inocular 40 ml de medio LB a una razón de 1/100 con el precultivo (400 µL).
3. Esperar crecimiento de bacterias hasta OD 0.2-0.3 a 600 nm. (90 min aproximadamente).
4. Poner en hielo durante 10 min.
5. Centrifugar 20 min a 3000 rpm a 4°C.
6. Resuspender el pellet en $MgCl_2$ 0.1 M a ¼ del volumen (5 ml)
7. Incubar 5 min en hielo, centrifugar durante 10 min a 4000 rpm a 4°C
8. Resuspender el cultivo en $CaCl_2$ 0.1 M a 1/20 del volumen del cultivo inicial (1 ml).
9. Incubar 20 min en hielo, centrifugar 10 min a 4000 rpm a 4°C.
10. Resuspender el Pellet en 85%v/v $CaCl_2$ 0.1M, 15% glicerol a 1/50 del volumen inicial de cultivo (800 µL).
11. Alicuotar en fracciones de 100 µL, guardar a -80°C.

Transformación de E. coli quimiocompetentes

1. Mezclar 100 uL de quimiocompetentes (ETZ o Top10) con 5 µL de miniprep o producto de Gibson Assembly, dejar en hielo durante 20 min.
2. Poner en baño termoregulado a 42°C por 55 seg-1min.
3. Agregar 900 µL de medio LB
4. Agitar a 37°C x 1h a 650 rpm
5. Plaquear 100 µl en placa LB con antibioticos de selección (Top10 o BL 21, el antibiótico de resistencia integrado en vector, para ETZ cloramphenicol y gen de resistencia integrado al vector).
6. Concentrar el resto por centrifuga 4000 rpm x 1 min y plaquear.

Protocolo de conjugación para Salinispora tropica

Se crecen durante la noche a 37°C y 300 rpm, 10 ml de medio LB con 10 µL de E. coli ET12567/puz8002 que contiene el vector de conjugación. pGM1190 que contiene un gen de resistencia a apramicina. El medio LB es suplementado con kanamicina, apramicina y cloramfenicol para llegar a una concentración final de 50 µg/ml (Eustaquio, et al, 2009).

1. Del cultivo de *E. coli* de la noche, se tomán 10 µL y se re-inocula en medio LB con antibióticos (50 µg/ml de kanamicina, apramicina y cloranfenicol), se deja crecer a 37°C y 300 rpm hasta una densidad óptica de 0.3-0.4 a 600 nm.
2. Se lava 2 veces el cultivo de *E. coli*, con medio LB; se centrifuga el cultivo de E. coli, a 4000G x 5min, se bota el sobrenadante y se resuspende en medio LB sin antibióticos. Después del segundo enjuague el pellet se resuspende en 0.5 ml de medio LB.
3. 1 ml de micelio de la segunda generación de 2 a 3 días de crecimiento de cultivo líquido de medio A1 (fase exponencial tardía), es resuspendido en 1 ml de medio A1.
4. Las bacterías obtenidas en 2, se mezclan con 0.5 ml de bacterias de Salinispora obtenidas en 3. Esta mezcla es inoculada en placas de agar que contienen medio A1.
5. Después de 20-h de incubación a 32-34°C, las placas son cubiertas con 1 mg de ácido nalidixico y 4 mg de apramicina. Los conjugantes son visibles después de una semana.

Obtención de dobles conjugantes y confirmación de transformación.

1. Se evalua la inserción del vector de transformación en el cromosoma de la bacteria, probando a dos temperaturas distintas (37° y 28°) el crecimiento de cada colonia, en placas de agar en medio A1-Apramicina.
2. Bacterias que crecen a 28 y 37°C tienen integrado el vector de transformación.
3. Estás bacterias son replaqueadas en medio A1-Kan, en 3 ocasiones y se crecen a 37°, para buscar eliminar el vector pgm1190 que se degrada a esta temperatura y solo quede integrado al cromosoma la modificación genética y la resistencia a Kanamicina.
4. El último plaqueo es utilizado para obtener esporas de las bacterias. Para después obtener una placa con colonias independientes y seleccionar las dobles conjugantes, que son las que poseen la resistencia a Kanamicina inserta en el cromosoma y la mutación genética deseada.

Suspension de Esporas

Lo siguiente debe realizarse en una campana de flujo laminar u otro ambiente estéril.

1. Añadir 9 ml de agua estéril a la placa (es conveniente mantener alícuotas de 9 ml de agua estéril en viales de 20 ml).
2. Raspar la superficie del cultivo con un asa bacteriológica. Primero con suave presión y gradualmente más vigorosamente, hasta suspender las esporas.
3. Verter la suspensión cruda de nuevo en el vial de agua estéril, utilizar una jeringa estéril o pipeta, y agitar el líquido violentamente o en un mezclador vortex por un minuto para romper las cadenas de esporas.
4. Filtrar la suspensión a través de una tela de algodón no absorbente, usando un tubo de filtrado.
5. Verter la suspensión filtrada en un tubo de centrifuga y agitar por 5 a 10 min a 1000 x g para decantar las esporas.
6. Tan pronto como la centrifuga pare, quitar el sobrenadante.
7. Agitar el tubo en el mezclador vortex por unos segundos para dispersar el pellet en la gota de agua restante en el tubo.
8. Añadir glicerol al 20% estéril (usualmente 1-2 ml para las esporas desde una placa bien esporulada) y brevemente agitar de nuevo, transferir la suspensión a una botella de tapa roscada para congelar a -20°C; viales de 7.5 ml son convenientes para esto.

Anexo III Cepas, Vectores y Cebadores

Cepas

- *E. coli* Top10 Cepa utilizada para clonamiento de rutina.
- *E. coli* ETZ1257/pUZ8002 cepa de metilación deficiente, utilizada para conjugación en *Streptomyces* y *Salinispora*. pUZ 8002 contiene la maquinaria para la conjugación de la bacteria dam13::Tn9 (Chloramphenicol resistance) dcm-6 hsdM hsdR recF143 zjj-201::Tn10 galK2 galT22 ara14 lacY1 xyl-5 leuB6 thi-1 tonA31 rpsL136 hisG4 tsx-78 mtlI glnV44, pUZ8002 (kanamycin resistance).
- *E. coli* ETZ1257/pUZ8002 - pGM1190 Spo1 cepa con vector de conjugación de pGM1190Spo1, para delecionar clúster de genes sporolide con resistencia a kanamicina
- *S. tropica* CNB440 Cepa *wild type.*
- *S. tropica* CNB4401 Cepa mutante con Deleción de clúster de genes Spo, y resistencia a kanamicina

Vectores

- pSET 152 Vector de clonación, conjugativo (oriT from RK2), aac(3)IV (resistencia a apramicina), integrativo en sitio (ΦC31 attP).
- pGM1190 derivado de pG5, autoreplicativo, sensible a temperatura, vector de conjugación.
- pTC 192-Km Fuente de gen de resistencia a kanamicina (*neo*).
- pGM1190 Spo1 Vector de conjugación con sitios de deleción de Spo y resistencia a kanamicina.
- pGM1190 Spo2 Vector de conjugación con sitios de deleción de Spo.
- pGM1190 Slm1 Vector de conjugación con sitios de flanqueo para deleción de clúster salinilactam y resistencia a Kanamicina.
- pGM1190 Slm2 Vector de conjugación con sitios de deleción de salinilactam.
- pGM1190 Lym1 Vector de conjugación con sitios de flanqueo para deleción de clúster linfostina y resistencia a kanamicina.
- pGM1190 Lym2 Vector de conjugación con sitios de deleción de linfostina.

Cebadores

Neo FWD y REV

Nombre	**Secuencia**	**TM °C**	**TM °C Overlap**
pGM1190-Spo1F	5' gagaagggagcggacagcaagctggtccgg 3'	69.8	48.5
Spo1-NeoR	5' gcttggcgtaatcatggtccaggatccaccctg 3'	68.1	48.0
Neo-Spo2F	5' ctcgaattcactggccgtactcagcccggctc 3'	69.5	50.3
Spo2-pGM1190R	5' gcaggcatgcaagcttcataagggtggctggcg 3'	69.7	50.3
Spo1-Spo2R	5' ggctgagtccaggatccaccctg 3'	62.4	48.5
Spo1-Spo2F	5' gatcctggactcagcccggctc 3'	62.3	48.5
Spo1 conf. F	5' agcgaagtcgaacccgggcg 3'	50.5	50.5
Spo2 conf. R	5’ actttcagcacccggaagaaggtac 3’	50.5	
pGM1190-Slm1F	5’ agagaagggagcggacagagggctggttcggc 3’	70.8	49.5
Slm1-NeoR	5' agcttggcgtaatcatggttgtcctccggctcc 3'	68.1	48.9
Neo-Slm2F	5' ctcgaattcactggccgttctacgtctcccgcc 3'	69.4	50.3
Slm2-pGM1190R	5' gcaggcatgcaagcttcaagcagcgaatgcggg 3'	69.4	50.3
Slm1-Slm2R	5' agacgtagatgtcctccggctcc 3'	60.6	50.3
Slm1-Slm2F	5' cggaggacatctacgtctcccgcc 3'	64.2	50.3
Slm1 conf F.	5' cgaagccgccgacgatcagac 3'	51.3	
Slm2 conf R	5’ ttgccgctgtcgcgttgggag 3’	51.5	
pGM1190-Lym1F	5' agagaagggagcggacacgcgcctggccca 3'	71.2	49.5
Lym1-NeoR	5' gcaatccatcttgttcaatcatcggctttctccttgtcgctgg 3'	69.3	49.2
Neo-Lym2F	5' cttcttgacgagttcttctgaatcgccccggcccat 3'	69.0	50.5
Lym2-pGM1190R	5' gcaggcatgcaagcttcaacgagcgcacagctca 3'	69.2	50.3
Lym1-Lym2R	5' ggggcgatcggctttctccttgtc 3'	71.6	51.1
Lym1-Lym2F	5' gaaagccgatcgccccggccc 3'	64.1	51.1
Lym 1 conf F	5’ agattctgacggccaccggact 3’	49.5	
Lym 2 conf R	5’ acgtagcagtgcgatggtgacga 3’	50.3	
Neo Fwd	5’ accatgattacgccaagc 3’	48.0	
Neo Rev	5’ acggccagtgaattcgag 3’	50.3	

Anexo IV Scripts de Matlab

Integración de datos mediante Metabotools

```
%clear
initCobraToolbox
outputPath = pwd;% ouputPath = 'ADD YOUR PATH TO YOUR OUTPUT FOLDER'
model=readCbModel('iCC908.mat');

Medium_composition={'EX_Maltose';'EX_Maltotriose';'EX_NH3';'EX_Calcium';'EX_Fe
2';'EX_Magnesium';'EX_Potassium';'EX_Sodium';'EX_Chloride';'EX_Sulfate';'EX_Or
thophosphate';'EX_ala_DASH_L';'EX_arg_DASH_L';'EX_L_DASH_Asp';'EX_asp_DASH_L';
'EX_cys_DASH_L';'EX_glu_DASH_L';'EX_gln_DASH_L';'EX_Glycine';'EX_his_DASH_L';'
EX_ile_DASH_L';'EX_leu_DASH_L';'EX_lys_DASH_L';'EX_met_DASH_L';'EX_phe_DASH_L'
;'EX_pro_DASH_L';'EX_ser_DASH_L';'EX_thr_DASH_L';'EX_trp_DASH_L';'EX_tyr_DASH_
L';'EX_val_DASH_L';'EX_Biotin';'EX_Folate';'EX_Nicotinate';'EX_Pantothenate';'
EX_Riboflavin';'EX_Thiamin';'EX_4_DASH_Aminobenzoate';'EX_Cobalt';'EX_L_DASH_L
actate';'EX_L_DASH_Malate';'EX_2aeppn';'EX_akg';'EX_4abut';'EX_Acetoacetate';'
EX_Adenosine';'EX_Trehalose';'EX_Betaine';'EX_Cadmium';'EX_Cellobiose';'EX_Chi
tobiose';'EX_Choline';'EX_Citrate';'EX_CO2';'EX_Cob_LPAREN_III_RPAREN_alamin';
'EX_Copper';'EX_Cytidine';'EX_Cytosine';'EX_ala_DASH_D';'EX_D_DASH_Fructose';'
EX_D_DASH_Galactarate';'EX_D_DASH_Galactonate';'EX_D_DASH_Galactose';'EX_D_DAS
H_Glucarate';'EX_D_DASH_Glucose';'EX_D_DASH_Mannose';'EX_met_DASH_D';'EX_D_DAS
H_Ribose';'EX_ser_DASH_D';'EX_D_DASH_Sorbitol';'EX_D_DASH_Xylose';'EX_Deoxyade
nosine';'EX_Deoxycytidine';'EX_Deoxyguanosine';'EX_Deoxyinosine';'EX_Deoxyribo
se';'EX_Deoxyuridine';'EX_Ethanolamine';'EX_Fe_LPAREN_III_RPAREN_dicitrate';'E
X_Fe3';'EX_Ferrichrome';'EX_Formate';'EX_Fumarate';'EX_Glycerol';'EX_Hypoxanth
ine';'EX_Inosine';'EX_L_DASH_Arabinose';'EX_L_DASH_Idonate';'EX_orn_DASH_L';'E
X_Lactose';'EX_Maltohexaose';'EX_Manganese';'EX_Mannitol';'EX_Melibiose';'EX_M
olybdate';'EX_inost';'EX_acgam';'EX_Nickel';'EX_Nitrate';'EX_Nitrite';'EX_ocdc
a';'EX_Pyrophosphate';'EX_Raffinose';'EX_Salicin';'EX_glyc3p';'EX_Stachyose';'
EX_Succinate';'EX_Sucrose';'EX_Thymidine';'EX_Uracil';'EX_Urea';'EX_Uridine';'
EX_Xanthine';'EX_Zinc';'EX_Adenine';'EX_Guanine';'EX_salinosporamideA';'EX_sal
inosporamideB';'EX_5_DASH_ClDA';'EX_5_DASH_CIR';'EX_5_DASH_CIRL';'EX_5_DASH_CI
RI';'EX_butanoate';'EX_sporolideA';'EX_sporolideB';'EX_Acetate';'EX_Sulfite';'
EX_Ascorbate';'EX_Glycerol_2_DASH_phosphate'};

%%Concentración mM en Peptona
met_Conc_mM=[24.539877300613497; 3.1718529766848982; 18.202102049204392;
2.9389474; 0.0021142857142857144; 17.530051; 13.372619; 413.01762; 426.69468;
17.403651; 1.4615141623670633; 5.7400112549240285; 1.4085408796978041;
0.40315512708150747; 2.7109218872186984; 0.077564475470234623;
4.1669893888931906; 0.062436587840474525; 7.6774758983347944;
0.49584366340965441; 1.4316012725344647; 2.1208907741251322;
1.966138722009831; 0.350609756097561; 1.0871042261176791;2.6359143327841843;
1.0794671566375746; 0.85064292779426309; 0.13962730250792116;
0.36771465342893916; 1.9772016543932212;0.0040931603290900904;
0.028092433167195289; 0.33550424314189853; 0.54737034165032161;
0.12647465192900414; 0.045223289994347091; 0.067084730931894418;
0.00087395;...
0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;...
0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;...
```

```
0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0];

%concentracion mM Triptona
%met_Conc_mM=[24.539877300613497; 3.1718529766848982; 20.315894545241029;
2.95017432; 0.0023857142857142853; 17.5449511; 13.4120193; 414.391319;
426.220778; 17.4036511; 1.9206065073181002; 4.0517726505346081;
1.3061015429925091; 0.45574057843996491; 2.7456772960291942;
0.1357378320729106; 5.2513360700178131; 0.078045734800593153;
2.6993865030674846; 0.65626367215983672; 2.0325203252032518;
2.774832096147049; 2.4030584380120157; 0.5640243902439025; 1.4132354939529825;
2.1828665568369026; 1.2402388608176391; 0.98911968348170121;
0.19333011116481388; 0.45351473922902497; 2.6026429940482196;
0.0040931603290900904; 0.028092433167195289; 0.33550424314189853;
0.54737034165032161; 0.12647465192900414; 0.045223289994347091;
0.067084730931894418; 0.00087395;...
%0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;...
%0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;...
%0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0];

%%
%MediumCompProd={'EX_Maltose';'EX_Maltotriose';'EX_NH3';'EX_Calcium';'EX_Fe2';
'EX_Magnesium';'EX_Potassium';'EX_Sodium';'EX_Chloride';'EX_Sulfate';'EX_Ortho
phosphate';'EX_ala_DASH_L';'EX_arg_DASH_L';'EX_L_DASH_Asp';'EX_asp_DASH_L';'EX
_cys_DASH_L';'EX_glu_DASH_L';'EX_gln_DASH_L';'EX_Glycine';'EX_his_DASH_L';'EX_
ile_DASH_L';'EX_leu_DASH_L';'EX_lys_DASH_L';'EX_met_DASH_L';'EX_phe_DASH_L';'E
X_pro_DASH_L';'EX_ser_DASH_L';'EX_thr_DASH_L';'EX_trp_DASH_L';'EX_tyr_DASH_L';
'EX_val_DASH_L';'EX_Biotin';'EX_Folate';'EX_Nicotinate';'EX_Pantothenate';'EX_
Riboflavin';'EX_Thiamin';'EX_4_DASH_Aminobenzoate';'EX_Cobalt';'EX_L_DASH_Lact
ate';'EX_L_DASH_Malate';'EX_2aeppn';'EX_akg';'EX_4abut';'EX_Acetoacetate';'EX_
Adenosine';'EX_Trehalose';'EX_Betaine';'EX_Cadmium';'EX_Cellobiose';'EX_Chitob
iose';'EX_Choline';'EX_Citrate';'EX_CO2';'EX_Cob_LPAREN_III_RPAREN_alamin';'EX
_Copper';'EX_Cytidine';'EX_Cytosine';'EX_ala_DASH_D';'EX_D_DASH_Fructose';'EX_
D_DASH_Galactarate';'EX_D_DASH_Galactonate';'EX_D_DASH_Galactose';'EX_D_DASH_G
lucarate';'EX_D_DASH_Glucose';'EX_D_DASH_Mannose';'EX_met_DASH_D';'EX_D_DASH_R
ibose';'EX_ser_DASH_D';'EX_D_DASH_Sorbitol';'EX_D_DASH_Xylose';'EX_Deoxyadenos
ine';'EX_Deoxycytidine';'EX_Deoxyguanosine';'EX_Deoxyinosine';'EX_Deoxyribose'
;'EX_Deoxyuridine';'EX_Ethanolamine';'EX_Fe_LPAREN_III_RPAREN_dicitrate';'EX_F
e3';'EX_Ferrichrome';'EX_Formate';'EX_Fumarate';'EX_Glycerol';'EX_Hypoxanthine
';'EX_Inosine';'EX_L_DASH_Arabinose';'EX_L_DASH_Idonate';'EX_orn_DASH_L';'EX_L
actose';'EX_Maltohexaose';'EX_Manganese';'EX_Mannitol';'EX_Melibiose';'EX_Moly
bdate';'EX_inost';'EX_acgam';'EX_Nickel';'EX_Nitrate';'EX_Nitrite';'EX_ocdca';
'EX_Pyrophosphate';'EX_Raffinose';'EX_Salicin';'EX_glyc3p';'EX_Stachyose';'EX_
Succinate';'EX_Sucrose';'EX_Thymidine';'EX_Uracil';'EX_Urea';'EX_Uridine';'EX_
Xanthine';'EX_Zinc';'EX_Adenine';'EX_Guanine';'EX_salinosporamideA';'EX_salino
sporamideB';'EX_5_DASH_ClDA';'EX_5_DASH_CIR';'EX_5_DASH_CIRL';'EX_5_DASH_CIRI'
;'EX_butanoate';'EX_sporolideA';'EX_sporolideB';'EX_Acetate';'EX_Sulfite';'EX_
Ascorbate';'EX_Glycerol_2_DASH_phosphate' };

%met_Conc_mMS=[24.539877300613497; 3.1718529766848982;
21.372790793259352;12.9923743; 0.20206002; 0.39333333333333326; 15.6357868;
417.377124; 426.377367; 1.30779003; 1.7226492576603138; 4.5582442318514351;
1.3829310455214803; 0.45574057843996491; 3.7535841515335826;
0.2326934264107039; 5.6695840755944538; 0.093654881760711781;
3.5758106923751094;0.70001458363715918; 2.0501944149876281;
2.9692470837751856; 2.340641335725989; 0.39634146341463417;
```

```
1.5491235222176925; 1.6474464579901154; 1.3780431786862655;
1.0682492581602374; 0.15036786423929968; 0.61285775571489864;
2.5017653586199939;  0.0040931603290900904; 0.028092433167195289;
0.33550424314189853; 0.54737034165032161; 0.12647465192900414;
0.045223289994347091; 0.067084730931894418;0.000218487;...
%0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;...
%0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;...
%0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;...
%0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;...
%0;0;0;0;0;0;0;0;0;0];

%met_Conc_mMH=[24.539877300613497; 3.1718529766848982; 14.091949973577595;
13.1373743; 0.20206002; 0.54166666666666663; 16.4336868; 416.151724;
429.254467; 0.48749003; 1.6889544066547331; 4.4400675295441756;
1.9463473974006018; 0.35056967572305003; 4.4903988183160992;
0.31413612565445026; 6.8313840910851207; 0.062436587840474525;
3.7651183172655567; 0.78459967915998252; 1.9794980558501236;
2.9551078119476846; 2.5809471795271905; 0.56097560975609762;
1.3996466911265115; 2.1210873146622733; 2.1497473587505742;
1.6221562809099899; 0.15251597658557542; 0.74033216890359754;
2.4452738827801874; 0.0040931603290900904; 0.028092433167195289;
0.33550424314189853; 0.54737034165032161; 0.12647465192900414;
0.045223289994347091; 0.067084730931894418;0.000218487;...
%0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;...
%0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;...
%0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;...
%0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;...
%0;0;0;0;0;0;0;0;0;0];


mediumCompounds={'EX_H';'EX_CO2';'EX_H2O';'EX_Oxygen'};
mediumCompounds_lb=-100;
customizedConstraints={'EX_ocdca';'EX_2aeppn';'EX_akg';'EX_4abut';'EX_Betaine'
;'EX_Deoxyadenosine';'EX_Deoxycytidine';'EX_Deoxyguanosine';'EX_Deoxyinosine';
...
'EX_Deoxyribose';'EX_Deoxyuridine';'EX_Ethanolamine';'EX_Hypoxanthine';'EX_5_D
ASH_ClDA';'EX_5_DASH_CIR';'EX_5_DASH_CIRL';'EX_5_DASH_CIRI';'EX_Thymidine';'EX
_Uracil';...
'EX_Adenine';'EX_Guanine';'EX_Cytosine'};
customizedConstraints_ub=[500,500,500,500,500,500,500,500,500,500,500,500,500,
500,500,500,500,500,500,500,500,500,500];
customizedConstraints_lb=[-1,-1,-1,-1,-1,-1,-1,-1,-1,-1,-1,-1,-1,-1,-1,-1,-1,-
1,-1,-1,-1,-1,-1];
cellConc = 1.0;
cellWeight = 0.0002673012;
t = 24;
current_inf = 1000;
set_inf = 500;

[modelMedium, basisMedium]=setMediumConstraints(model, set_inf, current_inf,
Medium_composition, met_Conc_mM, cellConc, t, cellWeight, mediumCompounds,
mediumCompounds_lb, customizedConstraints, customizedConstraints_ub,
customizedConstraints_lb);
model = modelMedium;
%%
```

```
%%Evaluar el modelo para determinar crecimiento y produccion de
salinosporamide A y B
model=changeObjective(model,'EX_salinosporamideA'); %caso del modelo buscar
caso modelo Stropica 'EX_Biomass'
FBAsolution=optimizeCbModel(model,'max');
FBAsolution.f
model=changeObjective(modelMedium,'EX_salinosporamideB'); %caso del
FBAsolution=optimizeCbModel(model,'max')
FBAsolution.f
model=changeObjective(modelMedium,'EX_Biomass');%caso del
FBAsolution=optimizeCbModel(model,'max')
FBAsolution.f


%% evaluación para guardar el modelo contextualizado
%%Integración de matriz de Datos para funcion prepIntegrationQuant(model,
metData, Exchanges, Sample, test_max, test_min, outputPath, tol, variation);


Exchanges={'EX_Biotin';'EX_Calcium';'EX_Chloride';'EX_Cobalt';'EX_Fe2';'EX_Fol
ate';'EX_Glycine';'EX_ala_DASH_L';'EX_arg_DASH_L';'EX_asp_DASH_L';'EX_cys_DASH
_L';'EX_glu_DASH_L';'EX_gln_DASH_L';'EX_his_DASH_L';'EX_ile_DASH_L';'EX_leu_DA
SH_L';'EX_lys_DASH_L';'EX_met_DASH_L';'EX_phe_DASH_L';'EX_pro_DASH_L';'EX_ser_
DASH_L';'EX_thr_DASH_L';'EX_trp_DASH_L';'EX_tyr_DASH_L';'EX_val_DASH_L';'EX_Ma
gnesium';'EX_Maltose';'EX_Maltotriose';'EX_NH3';'EX_Nicotinate';'EX_Orthophosp
hate';'EX_Pantothenate';'EX_Potassium';'EX_Riboflavin';'EX_Sodium';'EX_Sulfate
';'EX_Thiamin';'EX_L_DASH_Asp';'EX_4_DASH_Aminobenzoate';'EX_Biomass';'EX_sali
nosporamideA'};

%% evaluar la transformación de los datos de Salinosporamida A, y crecimiento
en mg/ml para integrarlos en la matriz de abajo!!

%%Integrar los datos de producción de salinosporamide A, B y crecimiento

Trip=[-0.00409316;-2.95017432;-426.220778;-0.00087395;-0.0024;-0.02809243;-
2.6993865;-4.05177265;-1.30610154;-2.7456773;-0.13573783;-5.25133607;-
0.07804573;-0.65626367;-2.03252033;-2.7748321;-2.40305844;-0.56402439;-
1.41323549;-2.18286656;-1.24023886;-0.98911968;-0.19333011;-0.4535;-
2.60264299;-17.5449511;-24.5398773;-3.17185298;-20.3158945;-0.33550424;-
1.9206;-0.54737034;-13.4120193;-0.126474652;-414.39132;-17.4036511;-
0.045222329;-0.45574058;-0.06708473;0.056545;0.00192799];%

Tripb=[-0.00409316;-2.95017432;-426.220778;-0.00087395;-0.0024;-0.02809243;-
2.6993865;-4.05177265;-1.30610154;-2.7456773;-0.13573783;-5.25133607;-
0.07804573;-0.65626367;-2.03252033;-2.7748321;-2.40305844;-0.56402439;-
1.41323549;-2.18286656;-1.24023886;-0.98911968;-0.19333011;-0.4535;-
2.60264299;-17.5449511;-24.5398773;-3.17185298;-20.3158945;-0.33550424;-
1.9206;-0.54737034;-13.4120193;-0.126474652;-414.39132;-17.4036511;-
0.045222329;-0.45574058;-0.06708473;0.080896;0.00921614];

Pep=[-0.00409316;-2.93894743;-426.694678;-0.00087395;-0.00211429;-0.02809243;-
7.6774759;-5.74001125;-1.40854088;-2.71092189;-0.07756448;-4.16698939;-
0.06243659;-0.49584366;-1.43160127;-2.12089077;-1.96613872;-0.35060976;-
1.08710423;-2.63591433;-1.07946716;-0.85064293;-0.1396273;-0.36771465;-
```

```
1.97720165;-17.5300511;-24.5398773;-3.17185298;-18.202102;-0.33550424;-
1.46151416;-0.54737034;-13.3726193;-0.12647465;-413.01762;-17.4036511;-
0.04522329;-0.40315513;-0.06708473;0.03449;0.00127783];

Pepb=[-0.00409316;-2.93894743;-426.694678;-0.00087395;-0.00211429;-
0.02809243;-7.6774759;-5.74001125;-1.40854088;-2.71092189;-0.07756448;-
4.16698939;-0.06243659;-0.49584366;-1.43160127;-2.12089077;-1.96613872;-
0.35060976;-1.08710423;-2.63591433;-1.07946716;-0.85064293;-0.1396273;-
0.36771465;-1.97720165;-17.5300511;-24.5398773;-3.17185298;-18.202102;-
0.33550424;-1.46151416;-0.54737034;-13.3726193;-0.12647465;-413.01762;-
17.4036511;-0.04522329;-0.40315513;-0.06708473;0.061115;0.00139686];

samples={'Trip';'Tripb';'Pep';'Pepb'};

%% es importante que estos datos se guarden como matriz y no como tabla.
metData=[Trip,Tripb,Pep,Pepb];
test_max = 200;
test_min = 0.001;
variation = 5;
tol=0.0005;

%% ahora se corre la función y se genera una tabla con los datos de flujos
metabolicos para las 4 muestras.
prepIntegrationQuant(model, metData, Exchanges, samples, test_max, test_min,
outputPath, tol, variation);
clearvars -EXCEPT model modelMedium samples tol solver outputPath tutorialPath
solverQuant prepIntegrationQuant

nmets=35;
[mapped_exchanges, minMax, mapped_uptake,
mapped_secretion]=checkExchangeProfiles(samples, outputPath, nmets);
save([outputPath filesep 'Result_checkExchangeProfiles']);

%%Utilizar la función setQuantitativeConstraints para integrar los perfiles de
toma y secreción y generar los modelos metabólicos específicos por
%%
%%condición para cada muestra. La función permite la definicion de metabolitos
que pueden no ser consumidos o no secretados. Para este se requiere
%%un solver cplex,
%solverQuant='gurobi';
%changeCobraSolver(solverQuant,'LP');
obj='EX_salinosporamideA';
minGrowth=0.0001;
%%

no_secretion={'EX_Chloride','EX_Oxygen'};
no_uptake={'EX_Zinc'};

medium={'ATPM'};
tol=5e-2;
model=modelMedium;
epsilon=1e-3;
addExtraExch={};
addExtraExch_value=0.0001;
```

```
[ResultsAllCellLines, OverViewResults] = setQuantConstraints(model, samples,
tol, minGrowth, obj, no_secretion, no_uptake, medium, addExtraExch,
addExtraExch_value, outputPath);
%%

clearvars -EXCEPT modelMedium samples ResultsAllCellLines OverViewResults tol
solver mapped_exchanges outputPath tutorialPath

changeCobraSolver('gurobi', 'LP');
[Ex_added_all_unique] = statisticsAddedExchanges(ResultsAllCellLines,
samples);
%%
%clearvars -EXCEPT modelMedium samples ResultsAllCellLines OverViewResults
Ex_added_all_unique tol solver mapped_exchanges outputPath tutorialPath
model=modelMedium;
[Added_all] = mkTableOfAddedExchanges(ResultsAllCellLines, samples,
Ex_added_all_unique);

save([outputPath filesep 'statistics']);

%%
%%clearvars -EXCEPT modelMedium samples ResultsAllCellLines OverViewResults
tol solver mapped_exchanges outputPath tutorialPath
%
cutoff = 0.05;
[genes, ResultsAllCellLines, OverViewResults] =
analyzeSingleGeneDeletion(ResultsAllCellLines, outputPath, samples, cutoff,
OverViewResults);
%clearvars -EXCEPT modelMedium samples ResultsAllCellLines OverViewResults
Ex_added_all_unique genes tol solver mapped_exchanges outputPath tutorialPath

%%
samples_to_test=samples;
fill='NAN';
genes_to_test={'model.genes'};

[FBA_Rxns_KO, ListResults] = checkEffectRxnKO(samples_to_test, fill,
genes_to_test, samples, ResultsAllCellLines);

%%
%%Variaciones para contextualizar el modelo

cuttoff=0.05;
mk_union = 1;
mk_intersect = 1;
mk_reactionDiff = 1;
model=readCbModel('iCC908.mat');
[unionModel, intersectModel,diffRxns,diffExRxns] =
makeSummaryModels(ResultsAllCellLines, samples, modelMedium);

clearvars -EXCEPT modelMedium unionModelsamples ResultsAllCellLines
OverViewResults Ex_added_all_unique genes FBA_Rxns_KO ListResults unionModel
intersectModel  diffRxns diffExRxns tol solver mapped_exchanges outputPath
model tutorialPath
```

```
save([outputPath filesep 'summary']);

%changeCobraSolver(solver, 'QP');
%obj = 'DM_atp_c_';
%carbon_source = {'EX_glc(e)'};
%samples = samples(1:4, 1);
%dir = 1;
%%
%Evaluar modelo unificado

model=unionModel;
model=changeObjective(model,'EX_salinosporamideA');%% cambiar por
'EX_salinosporamideB' o 'EX_Biomass'
FBAsolution=optimizeCbModel(model,'max')
FBAsolution.f

%%
%selectedRxns = {model.rxns{[1:113 ,115:201, 203:298, 301:309, 396:409,
412:414, 416:427, 431:444, 446, 449, 451:463, 467:470, 472:509, 511, 512,
514:543, 545, 547:568, 572:575, 577:581, 583:590, 592:618, 620:632, 634:644,
646:661, 663:666, 668:669, 671:684, 686:695, 697:705, 707:716, 718:720,
722:726, 728:729, 731:742, 744:746, 748:749, 751:755, 760, 762, 764, 766,
771:772, 774:777, 779:785, 787:809, 811:815, 817:818, 821:848, 850, 852:875,
877:878, 881:898, 900:996, 998:999, 1001:1022, 1024:1039, 1041, 1043,
1045:1055, 1059:1064, 1066:1102, 1104:1122, 1125:1137, 1260:1269, 1271:1296,
1394:1395, 1398:1402, 1409:1431, 1433:1435, 1437:1439, 1441, 1445:1446, 1448,
1450, 1453, 1456:1472, 1478:1480, 1485:1488, 1490, 1495:1504, 1507]}};
%selectedRxns={unionModel.rxns{[1:595,625:708,710:743,745:760,762,763,765:778]
}}
selectedRxns={unionModel.rxns{[1:86,88:130,132:195,198:200,263:270,273,275:282
,286:293,297:303,307:328,330,331,333:336,339:375,379,381,382,384:419,421:428,.
..

430:443,445,447,448,450:463,465:471,473:477,479:481,483:486,488:490,492:493,49
5:497,499:507,509,510,512,513,515,516,518,522,524,526,532,533,535:538,540:556,
...

559:563,566:581,583,585:597,601:607,609:630,632,634:640,645:652,656:658,660:68
6,736:745,747:756,826,827,830,831,834:859,862:864,872:885,888,889,895:905]}};
%%
```

Evaluacion de OptKnock,

```
options.targetRxn = 'EX_salinosporamideA';
options.vMax = 1000;
options.numDel = 10;
options.numDelSense = 'L';
constrOpt.rxnList = {'EX_Biomass','ATPM'};
constrOpt.values = [0.630,3];
constrOpt.sense = 'G';
optKnockSol = OptKnock(model, selectedRxns, options);
%%
%Evaluar las reacciones obtenidas
```

```
model=changeObjective(model,'EX_salinosporamideB')
model=changeRxnBounds(model, 'r_0308', 0, 'b');
FBAsolution=optimizeCbModel(model,'max');
growthRates1=FBAsolution.f
%model=changeRxnBounds(model, 'r_0308', -500, 'l');
model=changeRxnBounds(model, 'r_0308', 500, 'u');

 model=changeRxnBounds(model, 'r_0417', 0, 'b');
 FBAsolution=optimizeCbModel(model,'max');
 growthRates2=FBAsolution.f
 model=changeRxnBounds(model, 'r_0417', -500, 'l');
 model=changeRxnBounds(model, 'r_0417', 500, 'u');

 model=changeRxnBounds(model, 'r_0638', 0, 'b');
 FBAsolution=optimizeCbModel(model,'max');
 growthRates3=FBAsolution.f
 %model=changeRxnBounds(model, 'r_0638', -500, 'l');
 model=changeRxnBounds(model, 'r_0638', 500, 'u');

 model=changeRxnBounds(model, 'r_0834', 0, 'b');
 FBAsolution=optimizeCbModel(model,'max');
 growthRates4=FBAsolution.f
 %model=changeRxnBounds(model, 'r_0834', -500, 'l');
 model=changeRxnBounds(model, 'r_0834', 500, 'u');

 model=changeRxnBounds(model, 'r_0864', 0, 'b');
 FBAsolution=optimizeCbModel(model,'max');
 growthRates5=FBAsolution.f
 %model=changeRxnBounds(model, 'r_0864', -500, 'l');
 model=changeRxnBounds(model, 'r_0864', 500, 'u');

 %model=changeRxnBounds(model, 'r_1081', 0, 'b');
 %FBAsolution=optimizeCbModel(model,'max');
 %growthRates6=FBAsolution.f
 %model=changeRxnBounds(model, 'r_1081', -500, 'l');
 %model=changeRxnBounds(model, 'r_1081', 500, 'u');

 %model=changeRxnBounds(model, 'r_0305', 0, 'b');
 %FBAsolution=optimizeCbModel(model,'max');
 %growthRates7=FBAsolution.f
 %model=changeRxnBounds(model, 'r_0305', -500, 'l');
 %model=changeRxnBounds(model, 'r_0305', 500, 'u');

 %model=changeRxnBounds(model, 'r_0305', 0, 'b');
 %FBAsolution=optimizeCbModel(model,'max');
 %growthRates8=FBAsolution.f
 %model=changeRxnBounds(model, 'r_0305', -500, 'l');
 %model=changeRxnBounds(model, 'r_0305', 500, 'u');

 %model=changeRxnBounds(model, 'r_0305', 0, 'b');
 %FBAsolution=optimizeCbModel(model,'max');
 %growthRates9=FBAsolution.f
 %model=changeRxnBounds(model, 'r_0305', -500, 'l');
 %model=changeRxnBounds(model, 'r_0305', 500, 'u');
```

```
%model=changeRxnBounds(model, 'r_0305', 0, 'b');
%FBAsolution=optimizeCbModel(model,'max');
%growthRates10=FBAsolution.f
%model=changeRxnBounds(model, 'r_0305', -500, 'l');
%model=changeRxnBounds(model, 'r_0305', 500, 'u');
```

Evaluacion de OptGene,

```
[x, population, scores, optGeneSol] = optGene(model,
'EX_salinosporamideA','EX_Biomass', selectedRxns);
```

Evaluacion de GDLS

```
%%
[gdlsSolution, bilevelMILPproblem, gdlsSolutionStructs] = GDLS(model,
'EX_salinosporamideA', 'minGrowth', 2.5, 'selectedRxns', selectedRxns,
'maxKO', 10, 'nbhdsz', 3);
```

Script para uso de OptForce

```
%obtener modelo contextualizado, determinar formacion de biomasa y
%metabolito
outputPath = pwd;% ouputPath = 'ADD YOUR PATH TO YOUR OUTPUT FOLDER'
model=readCbModel('modelMedium.mat');

%%
model=changeObjective(model,'EX_Biomass');%caso del
growthRate=optimizeCbModel(model);
%%
fprintf('the maximum growth rate is %1.2f', growthRate.f);
model=changeRxnBounds(model, 'EX_Biomass',0.29,'b');
model=changeObjective(model, 'EX_salinosporamideA');
maxSalA=optimizeCbModel(model);
%%
fprintf('The maximum production rate of Salinosporamide A is %1.2f',
maxSalA.f);
constrWT=struct('rxnList', {{'EX_Biomass','EX_salinosporamideA'}},'rxnValues',
[0.29, 0.09], 'rxnBoundType', 'bb')
%%
constrMT=struct('rxnList', {{'EX_Biomass','EX_salinosporamideA'}},
'rxnValues', [0.0, 8.93], 'rxnBoundType', 'bb')
%%
[minFluxesW,maxFluxesW,minFluxesM,maxFluxesM,~,~]=FVAOptForce(model,constrWT,c
onstrMT);
%%
runID='TestOptForce2n';
%constrOpt=struct('rxnList',{{'EX_Maltose','EX_Maltotriose','EX_NH3','EX_Calci
um','EX_Fe2','EX_Magnesium','EX_Potassium','EX_Sodium','EX_Chloride','EX_Sulfa
te','EX_Orthophosphate','EX_ala_DASH_L','EX_arg_DASH_L','EX_L_DASH_Asp','EX_as
p_DASH_L','EX_cys_DASH_L','EX_glu_DASH_L','EX_gln_DASH_L','EX_Glycine','EX_his
_DASH_L','EX_ile_DASH_L','EX_leu_DASH_L','EX_lys_DASH_L','EX_met_DASH_L','EX_p
he_DASH_L','EX_pro_DASH_L','EX_ser_DASH_L','EX_thr_DASH_L','EX_trp_DASH_L','EX
_tyr_DASH_L','EX_val_DASH_L','EX_Biotin','EX_Folate','EX_Nicotinate','EX_Panto
```

```
thenate','EX_Riboflavin','EX_Thiamin','EX_4_DASH_Aminobenzoate','EX_Cobalt','r
_0326','EX_Biomass','EX_salinosporamideA'}},'values',[-24.539877300613497, -
3.1718529766848982, -21.372790793259352, -12.9923743, -0.20206002, -
0.39333333333333326, -15.6357868, -417.377124, -426.377367, -1.30779003, -
1.7226492576603138, -4.5582442318514351, -1.3829310455214803, -
0.45574057843996491, -3.7535841515335826, -0.2326934264107039, -
5.6695840755944538, -0.093654881760711781, -3.5758106923751094, -
0.70001458363715918, -2.0501944149876281, -2.9692470837751856, -
2.340641335725989, -0.39634146341463417, -1.5491235222176925, -
1.6474464579901154, -1.3780431786862655, -1.0682492581602374, -
0.15036786423929968, -0.61285775571489864, -2.5017653586199939, -
0.0040931603290900904, -0.028092433167195289, -0.33550424314189853, -
0.54737034165032161, -0.12647465192900414, -0.045223289994347091, -
0.067084730931894418,-0.000218487,40, 0, 3.45]);
constrOpt=struct('rxnList',{{'EX_Maltose','EX_Maltotriose','EX_NH3','EX_Calciu
m'}},'values',[-24.539877300613497, -3.1718529766848982, -21.372790793259352,
-12.9923743]);
[mustLSet, pos_mustL] = findMustL(model, minFluxesW, maxFluxesW, 'constrOpt',
constrOpt, 'runID', runID, 'outputFolder',
'OutputsFindMustL','outputFileName', 'MustL' , 'printExcel', 1, 'printText',
1,'printReport', 1, 'keepInputs', 1, 'verbose', 0);
disp(mustLSet)
%%
[mustUSet, pos_mustU] = findMustU(model, minFluxesW, maxFluxesW, 'constrOpt',
constrOpt,'runID', runID, 'outputFolder', 'OutputsFindMustU','outputFileName',
'MustU' , 'printExcel', 1, 'printText', 1,'printReport', 1, 'keepInputs', 1,
'verbose', 0);
disp(mustUSet)
%%
exchangeRxns = model.rxns(cellfun(@isempty, strfind(model.rxns, 'EX_')) == 0);
excludedRxns = unique([mustUSet; mustLSet; exchangeRxns]);
[mustUU, pos_mustUU, mustUU_linear, pos_mustUU_linear] = ...
findMustUU(model, minFluxesW, maxFluxesW, 'constrOpt', constrOpt, ...
'excludedRxns', excludedRxns,'runID', runID, ...
'outputFolder', 'OutputsFindMustUU', 'outputFileName', 'MustUU', ...
'printExcel', 1, 'printText', 1, 'printReport', 1, 'keepInputs', 1, ...
'verbose', 1);
%%
disp(mustUU);
[mustLL, pos_mustLL, mustLL_linear, pos_mustLL_linear] = ...
findMustLL(model, minFluxesW, maxFluxesW, 'constrOpt', constrOpt, ...
'excludedRxns', excludedRxns,'runID', runID, ...
'outputFolder', 'OutputsFindMustLL', 'outputFileName', 'MustLL', ...
'printExcel', 1, 'printText', 1, 'printReport', 1, 'keepInputs', 1, ...
'verbose', 1);
disp(mustLL);
[mustUL, pos_mustUL, mustUL_linear, pos_mustUL_linear] = ...
findMustUL(model, minFluxesW, maxFluxesW, 'constrOpt', constrOpt, ...
'excludedRxns', excludedRxns,'runID', runID, ...
'outputFolder', 'OutputsFindMustUL', 'outputFileName', 'MustUL', ...
'printExcel', 1, 'printText', 1, 'printReport', 1, 'keepInputs', 1, ...
'verbose', 1);
disp(mustUL);
%%
mustU = unique(union(mustUSet, mustUU));
```

```
mustL = unique(union(mustLSet, mustLL));
%%
targetRxn = 'EX_salinosporamideA';
biomassRxn = 'EX_Biomass';
k = 2;
nSets = 1;
constrOpt = struct('rxnList', {{'EX_Oxygen','EX_Biomass'}}, 'values', [-100,
0.003]);
[optForceSets, posOptForceSets, typeRegOptForceSets, flux_optForceSets] = ...
optForce(model, targetRxn, biomassRxn, mustU, mustL, ...
minFluxesW, maxFluxesW, minFluxesM, maxFluxesM, ...
'k', k, 'nSets', nSets, 'constrOpt', constrOpt, ...
'runID', runID, 'outputFolder', 'OutputsOptForce', ...
'outputFileName', 'OptForce', 'printExcel', 1, 'printText', 1, ...
'printReport', 1, 'keepInputs', 1, 'verbose', 1);
disp(optForceSets)
```

Genes esenciales

'Strop2798'	**'Strop2727'**	**Strop0794'**	**'Strop1389'**	**'Strop3467'**	**'Strop2711'**
'Strop2797'	'Strop1110'	'Strop3902'	'Strop3861'	'Strop1798'	'Strop2721'
'Strop1352'	'Strop0930'	'Strop3489'	'Strop4280'	'Strop3286'	's0008'
'Strop1235'	'Strop0931'	'Strop3139'	'Strop1106'	'Strop3145'	's0009'
'Strop1863'	'Strop1845'	'Strop1861'	'Strop3876'	'Strop4022'	
'Strop0978'	'Strop0154'	'Strop4023'	'Strop1039'	'Strop2980'	
'Strop1233'	'Strop0134'	'Strop1379'	'Strop3531'	'Strop1026'	
'Strop1234'	'Strop1388'	'Strop0226'	'Strop1446'	'Strop1028'	
'Strop1207'	'Strop0152'	'Strop1890'	'Strop1888'	's0006'	
'Strop1383'	'Strop0150'	'Strop3474'	'Strop1286'	'Strop1034'	
'Strop1854'	'Strop0151'	'Strop1282'	'Strop3004'	'Strop1040'	
'Strop1857'	'Strop3492'	'Strop4278'	'Strop3752'	's0007'	
'Strop4243'	'Strop2505'	'Strop1846'	'Strop3753'	'Strop1023'	
'Strop4245'	'Strop0025'	'Strop0437'	'Strop1891'	'Strop1024'	
'Strop3726'	'Strop2504'	'Strop1018'	'Strop4279'	'Strop1019'	
'Strop1350'	'Strop2503'	'Strop3024'	'Strop2763'	'Strop1021'	
'Strop1489'	'Strop0788'	'Strop1853'	'Strop1859'	'Strop2725'	
'Strop3806'	'Strop1889'	'Strop0442'	'Strop0125'	'Strop2731'	
'Strop3807'	'Strop3703'	'Strop3829'	'Strop1326'	'Strop2733'	
'Strop4563'	'Strop1701'	'Strop3818'	'Strop3828'	'Strop2728'	
'Strop0155'	'Strop3091'	'Strop4261'	'Strop4067'	'Strop2724'	
'Strop3521'	'Strop1298'	'Strop3862'	'Strop0966'	'Strop2702'	
'Strop4296'	'Strop3869'	'Strop3340'	'Strop1831'	'Strop2700'	
'Strop4307'	'Strop3870'	'Strop0879'	'Strop0328'	'Strop2699'	
'Strop3528'	'Strop3633'	'Strop1266'	'Strop1920'	'Strop2704'	
'Strop4260'	'Strop3631'	'Strop3306'	'Strop3833'	'Strop2705'	
'Strop4387'	'Strop3630'	'Strop0273'	'Strop3932'	'Strop2701'	
'Strop1848'	'Strop3636'	'Strop2054'	'Strop1381'	'Strop2706'	
'Strop3530'	'Strop3632'	'Strop0133'	'Strop1862'	'Strop2696'	
'Strop3522'	'Strop3635'	'Strop3813'	'Strop3895'	'Strop2697'	
'Strop2713'	'Strop3634'	'Strop3812'	'Strop3933'	'Strop2694'	
'Strop3379'	'Strop3628'	'Strop3606'	'Strop0213'	'Strop2695'	
'Strop2723'	'Strop0783'	'Strop3001'	'Strop0003'	'Strop2698'	

Reacciones esenciales

'B0001'	**'r_0105'**	**'r_0241'**	**'r_0388'**	**'r_0666'**	**'r_0916'**	**'r_1383'**
'B0002'	'r_0107'	'r_0242'	'r_0389'	'r_0668'	'r_0917'	'r_1384'
'r_0006'	'r_0109'	'r_0243'	'r_0391'	'r_0676'	'r_0919'	'r_1385'
'r_0007'	'r_0112'	'r_0244'	'r_0392'	'r_0677'	'r_0920'	'r_1386'
'r_0010'	'r_0113'	'r_0245'	'r_0402'	'r_0704'	'r_0940'	'r_1387'
'r_0011'	'r_0114'	'r_0246'	'r_0405'	'r_0707'	'r_0943'	'r_1388'
'r_0012'	'r_0115'	'r_0248'	'r_0406'	'r_0712'	'r_0945'	'r_1389'
'r_0013'	'r_0120'	'r_0253'	'r_0410'	'r_0717'	'r_0946'	'r_1390'
'r_0014'	'r_0122'	'r_0261'	'r_0416'	'r_0722'	'r_0947'	'r_1391'
'r_0015'	'r_0131'	'r_0266'	'r_0417'	'r_0723'	'r_0966'	'r_1395'
'r_0016'	'r_0136'	'r_0273'	'r_0418'	'r_0727'	'r_0967'	'r_1397'
'r_0017'	'r_0138'	'r_0274'	'r_0440'	'r_0747'	'r_0983'	'r_1398'
'r_0018'	'r_0139'	'r_0276'	'r_0448'	'r_0756'	'r_0984'	'r_1399'
'r_0019'	'r_0144'	'r_0280'	'r_0450'	'r_0761'	'r_0987'	'r_1400'
'r_0020'	'r_0145'	'r_0288'	'r_0457'	'r_0773'	'r_0994'	'r_1401'
'r_0021'	'r_0151'	'r_0299'	'r_0459'	'r_0811'	'r_1035'	'r_1402'
'r_0022'	'r_0153'	'r_0305'	'r_0472'	'r_0813'	'r_1051'	'r_1403'
'r_0023'	'r_0154'	'r_0306'	'r_0479'	'r_0815'	'r_1052'	'r_1404'
'r_0029'	'r_0155'	'r_0314'	'r_0490'	'r_0825'	'r_1053'	'r_1405'
'r_0033'	'r_0160'	'r_0327'	'r_0500'	'r_0832'	'r_1054'	'r_1406'
'r_0034'	'r_0161'	'r_0331'	'r_0506'	'r_0844'	'r_1074'	'r_1423'
'r_0040'	'r_0168'	'r_0332'	'r_0517'	'r_0847'	'r_1091'	'r_1424'
'r_0041'	'r_0169'	'r_0339'	'r_0536'	'r_0852'	'r_1110'	'r_1425'
'r_0046'	'r_0172'	'r_0341'	'r_0556'	'r_0858'	'r_1120'	'r_1426'
'r_0049'	'r_0177'	'r_0351'	'r_0558'	'r_0859'	'r_1121'	'r_1427'
'r_0053'	'r_0178'	'r_0354'	'r_0583'	'r_0864'	'r_1126'	'r_1428'
'r_0054'	'r_0183'	'r_0358'	'r_0586'	'r_0867'	'r_1139'	'r_1429'
'r_0068'	'r_0185'	'r_0363'	'r_0601'	'r_0868'	'r_1140'	'r_1430'
'r_0069'	'r_0191'	'r_0366'	'r_0608'	'r_0869'	'r_1141'	'r_1431'
'r_0078'	'r_0192'	'r_0370'	'r_0615'	'r_0870'	'r_1144'	'r_1432'
'r_0088'	'r_0214'	'r_0371'	'r_0632'	'r_0871'	'r_1151'	'r_1433'
'r_0089'	'r_0218'	'r_0374'	'r_0633'	'r_0873'	'r_1171'	'r_1434'
'r_0091'	'r_0219'	'r_0376'	'r_0641'	'r_0880'	'r_1176'	'r_1435'
'r_0092'	'r_0226'	'r_0379'	'r_0644'	'r_0889'	'r_1183'	
'r_0093'	'r_0228'	'r_0382'	'r_0663'	'r_0910'	'r_1381'	
'r_0101'	'r_0232'	'r_0386'	'r_0664'	'r_0915'	'r_1382'	

Reacciones consideradas en modeloUnion

'r_0001'	'r_0053'	'r_0109'	'r_0183'	'r_0253'	'r_0312'	'r_0371'	'r_0431'	'r_0495'
'r_0001'	'r_0053'	'r_0109'	'r_0183'	'r_0253'	'r_0312'	'r_0371'	'r_0431'	'r_0495'
'r_0001'	'r_0053'	'r_0109'	'r_0183'	'r_0253'	'r_0312'	'r_0371'	'r_0431'	'r_0495'
'r_0001'	'r_0053'	'r_0109'	'r_0183'	'r_0253'	'r_0312'	'r_0371'	'r_0431'	'r_0495'
'r_0001'	'r_0053'	'r_0109'	'r_0183'	'r_0253'	'r_0312'	'r_0371'	'r_0431'	'r_0495'
'r_0001'	'r_0053'	'r_0109'	'r_0183'	'r_0253'	'r_0312'	'r_0371'	'r_0431'	'r_0495'
'r_0001'	'r_0053'	'r_0109'	'r_0183'	'r_0253'	'r_0312'	'r_0371'	'r_0431'	'r_0495'
'r_0001'	'r_0053'	'r_0109'	'r_0183'	'r_0253'	'r_0312'	'r_0371'	'r_0431'	'r_0495'
'r_0001'	'r_0053'	'r_0109'	'r_0183'	'r_0253'	'r_0312'	'r_0371'	'r_0431'	'r_0495'
'r_0001'	'r_0053'	'r_0109'	'r_0183'	'r_0253'	'r_0312'	'r_0371'	'r_0431'	'r_0495'
'r_0001'	'r_0053'	'r_0109'	'r_0183'	'r_0253'	'r_0312'	'r_0371'	'r_0431'	'r_0495'
'r_0001'	'r_0053'	'r_0109'	'r_0183'	'r_0253'	'r_0312'	'r_0371'	'r_0431'	'r_0495'
'r_0001'	'r_0053'	'r_0109'	'r_0183'	'r_0253'	'r_0312'	'r_0371'	'r_0431'	'r_0495'
'r_0001'	'r_0053'	'r_0109'	'r_0183'	'r_0253'	'r_0312'	'r_0371'	'r_0431'	'r_0495'
'r_0001'	'r_0053'	'r_0109'	'r_0183'	'r_0253'	'r_0312'	'r_0371'	'r_0431'	'r_0495'
'r_0001'	'r_0053'	'r_0109'	'r_0183'	'r_0253'	'r_0312'	'r_0371'	'r_0431'	'r_0495'
'r_0001'	'r_0053'	'r_0109'	'r_0183'	'r_0253'	'r_0312'	'r_0371'	'r_0431'	'r_0495'
'r_0001'	'r_0053'	'r_0109'	'r_0183'	'r_0253'	'r_0312'	'r_0371'	'r_0431'	'r_0495'
'r_0001'	'r_0053'	'r_0109'	'r_0183'	'r_0253'	'r_0312'	'r_0371'	'r_0431'	'r_0495'
'r_0001'	'r_0053'	'r_0109'	'r_0183'	'r_0253'	'r_0312'	'r_0371'	'r_0431'	'r_0495'
'r_0001'	'r_0053'	'r_0109'	'r_0183'	'r_0253'	'r_0312'	'r_0371'	'r_0431'	'r_0495'
'r_0001'	'r_0053'	'r_0109'	'r_0183'	'r_0253'	'r_0312'	'r_0371'	'r_0431'	'r_0495'
'r_0001'	'r_0053'	'r_0109'	'r_0183'	'r_0253'	'r_0312'	'r_0371'	'r_0431'	'r_0495'
'r_0001'	'r_0053'	'r_0109'	'r_0183'	'r_0253'	'r_0312'	'r_0371'	'r_0431'	'r_0495'
'r_0001'	'r_0053'	'r_0109'	'r_0183'	'r_0253'	'r_0312'	'r_0371'	'r_0431'	'r_0495'
'r_0001'	'r_0053'	'r_0109'	'r_0183'	'r_0253'	'r_0312'	'r_0371'	'r_0431'	'r_0495'
'r_0001'	'r_0053'	'r_0109'	'r_0183'	'r_0253'	'r_0312'	'r_0371'	'r_0431'	'r_0495'
'r_0001'	'r_0053'	'r_0109'	'r_0183'	'r_0253'	'r_0312'	'r_0371'	'r_0431'	'r_0495'
'r_0001'	'r_0053'	'r_0109'	'r_0183'	'r_0253'	'r_0312'	'r_0371'	'r_0431'	'r_0495'
'r_0001'	'r_0053'	'r_0109'	'r_0183'	'r_0253'	'r_0312'	'r_0371'	'r_0431'	'r_0495'
'r_0001'	'r_0053'	'r_0109'	'r_0183'	'r_0253'	'r_0312'	'r_0371'	'r_0431'	'r_0495'
'r_0001'	'r_0053'	'r_0109'	'r_0183'	'r_0253'	'r_0312'	'r_0371'	'r_0431'	'r_0495'
'r_0001'	'r_0053'	'r_0109'	'r_0183'	'r_0253'	'r_0312'	'r_0371'	'r_0431'	'r_0495'
'r_0001'	'r_0053'	'r_0109'	'r_0183'	'r_0253'	'r_0312'	'r_0371'	'r_0431'	'r_0495'
'r_0001'	'r_0053'	'r_0109'	'r_0183'	'r_0253'	'r_0312'	'r_0371'	'r_0431'	'r_0495'
'r_0001'	'r_0053'	'r_0109'	'r_0183'	'r_0253'	'r_0312'	'r_0371'	'r_0431'	'r_0495'
'r_0001'	'r_0053'	'r_0109'	'r_0183'	'r_0253'	'r_0312'	'r_0371'	'r_0431'	'r_0495'
'r_0001'	'r_0053'	'r_0109'	'r_0183'	'r_0253'	'r_0312'	'r_0371'	'r_0431'	'r_0495'
'r_0001'	'r_0053'	'r_0109'	'r_0183'	'r_0253'	'r_0312'	'r_0371'	'r_0431'	'r_0495'

'r_0560'	'r_0628'	'r_0685'	'r_0739'	'r_0800'	'r_0864'	r_0921'	r_1015'	'r_1161'
'r_0560'	'r_0628'	'r_0685'	'r_0739'	'r_0800'	'r_0864'	r_0921'	r_1015'	'r_1161'
'r_0560'	'r_0628'	'r_0685'	'r_0739'	'r_0800'	'r_0864'	r_0921'	r_1015'	'r_1161'
'r_0560'	'r_0628'	'r_0685'	'r_0739'	'r_0800'	'r_0864'	r_0921'	r_1015'	'r_1161'
'r_0560'	'r_0628'	'r_0685'	'r_0739'	'r_0800'	'r_0864'	r_0921'	r_1015'	'r_1161'
'r_0560'	'r_0628'	'r_0685'	'r_0739'	'r_0800'	'r_0864'	r_0921'	r_1015'	'r_1161'
'r_0560'	'r_0628'	'r_0685'	'r_0739'	'r_0800'	'r_0864'	r_0921'	r_1015'	'r_1161'
'r_0560'	'r_0628'	'r_0685'	'r_0739'	'r_0800'	'r_0864'	r_0921'	r_1015'	'r_1161'
'r_0560'	'r_0628'	'r_0685'	'r_0739'	'r_0800'	'r_0864'	r_0921'	r_1015'	'r_1161'
'r_0560'	'r_0628'	'r_0685'	'r_0739'	'r_0800'	'r_0864'	r_0921'	r_1015'	'r_1161'
'r_0560'	'r_0628'	'r_0685'	'r_0739'	'r_0800'	'r_0864'	r_0921'	r_1015'	'r_1161'
'r_0560'	'r_0628'	'r_0685'	'r_0739'	'r_0800'	'r_0864'	r_0921'	r_1015'	'r_1161'
'r_0560'	'r_0628'	'r_0685'	'r_0739'	'r_0800'	'r_0864'	r_0921'	r_1015'	'r_1161'
'r_0560'	'r_0628'	'r_0685'	'r_0739'	'r_0800'	'r_0864'	r_0921'	r_1015'	'r_1161'
'r_0560'	'r_0628'	'r_0685'	'r_0739'	'r_0800'	'r_0864'	r_0921'	r_1015'	'r_1161'
'r_0560'	'r_0628'	'r_0685'	'r_0739'	'r_0800'	'r_0864'	r_0921'	r_1015'	'r_1161'
'r_0560'	'r_0628'	'r_0685'	'r_0739'	'r_0800'	'r_0864'	r_0921'	r_1015'	'r_1161'
'r_0560'	'r_0628'	'r_0685'	'r_0739'	'r_0800'	'r_0864'	r_0921'	r_1015'	'r_1161'
'r_0560'	'r_0628'	'r_0685'	'r_0739'	'r_0800'	'r_0864'	r_0921'	r_1015'	'r_1161'
'r_0560'	'r_0628'	'r_0685'	'r_0739'	'r_0800'	'r_0864'	r_0921'	r_1015'	'r_1161'
'r_0560'	'r_0628'	'r_0685'	'r_0739'	'r_0800'	'r_0864'	r_0921'	r_1015'	'r_1161'
'r_0560'	'r_0628'	'r_0685'	'r_0739'	'r_0800'	'r_0864'	r_0921'	r_1015'	'r_1161'
'r_0560'	'r_0628'	'r_0685'	'r_0739'	'r_0800'	'r_0864'	r_0921'	r_1015'	'r_1161'
'r_0560'	'r_0628'	'r_0685'	'r_0739'	'r_0800'	'r_0864'	r_0921'	r_1015'	'r_1161'
'r_0560'	'r_0628'	'r_0685'	'r_0739'	'r_0800'	'r_0864'	r_0921'	r_1015'	'r_1161'
'r_0560'	'r_0628'	'r_0685'	'r_0739'	'r_0800'	'r_0864'	r_0921'	r_1015'	'r_1161'
'r_0560'	'r_0628'	'r_0685'	'r_0739'	'r_0800'	'r_0864'	r_0921'	r_1015'	'r_1161'
'r_0560'	'r_0628'	'r_0685'	'r_0739'	'r_0800'	'r_0864'	r_0921'	r_1015'	'r_1161'
'r_0560'	'r_0628'	'r_0685'	'r_0739'	'r_0800'	'r_0864'	r_0921'	r_1015'	'r_1161'
'r_0560'	'r_0628'	'r_0685'	'r_0739'	'r_0800'	'r_0864'	r_0921'	r_1015'	'r_1161'
'r_0560'	'r_0628'	'r_0685'	'r_0739'	'r_0800'	'r_0864'	r_0921'	r_1015'	'r_1161'
'r_0560'	'r_0628'	'r_0685'	'r_0739'	'r_0800'	'r_0864'	r_0921'	r_1015'	'r_1161'
'r_0560'	'r_0628'	'r_0685'	'r_0739'	'r_0800'	'r_0864'	r_0921'	r_1015'	'r_1161'
'r_0560'	'r_0628'	'r_0685'	'r_0739'	'r_0800'	'r_0864'	r_0921'	r_1015'	'r_1161'
'r_0560'	'r_0628'	'r_0685'	'r_0739'	'r_0800'	'r_0864'	r_0921'	r_1015'	'r_1161'
'r_0560'	'r_0628'	'r_0685'	'r_0739'	'r_0800'	'r_0864'	r_0921'	r_1015'	'r_1161'
'r_0560'	'r_0628'	'r_0685'	'r_0739'	'r_0800'	'r_0864'	r_0921'	r_1015'	'r_1161'
'r_0560'	'r_0628'	'r_0685'	'r_0739'	'r_0800'	'r_0864'	r_0921'	r_1015'	'r_1161'
'r_0560'	'r_0628'	'r_0685'	'r_0739'	'r_0800'	'r_0864'	r_0921'	r_1015'	'r_1161'

'B0009'	'EX_Nitrite'	'r_1273'	'r_1331'	'r_1388'	'r_1434'
'B0010'	'EX_Orthophosphate'	'r_1274'	'r_1332'	'r_1389'	'r_1435'
'B0011'	'EX_Oxygen'	'r_1275'	'r_1334'	'r_1390'	'r_1438'
'B0012'	'EX_Pantothenate'	'r_1276'	'r_1335'	'r_1391'	'B0014'
'EX_Trehalose'	'EX_Potassium'	'r_1277'	'r_1336'	'r_1392'	'r_1441'
'EX_Chloride'	'EX_Riboflavin'	'r_1278'	'r_1337'	'r_1393'	'r_1443'
'EX_Citrate'	'EX_glyc3p'	'r_1279'	'r_1338'	'r_1394'	'EX_Sulfite'
'EX_CO2'	'EX_Sulfate'	'r_1280'	'r_1339'	'r_1395'	'r_1444'
'EX_ala_DASH_D'	'EX_Urea'	'r_1283'	'r_1340'	'r_1396'	'r_1450'
'EX_D_DASH_Fructose'	'r_1225'	'r_1287'	'r_1341'	'r_1397'	'r_1451'
'EX_D_DASH_Galactose'	'r_1226'	'r_1290'	'r_1343'	'r_1398'	'r_1454'
'EX_D_DASH_Sorbitol'	'r_1227'	'r_1292'	'r_1344'	'r_1399'	'r_1455'
'EX_Folate'	'r_1228'	'r_1294'	'r_1345'	'r_1400'	'r_1456'
'EX_Formate'	'r_1229'	'r_1295'	'r_1346'	'r_1401'	'r_1457'
'EX_Glycerol'	'r_1230'	'r_1303'	'r_1348'	'r_1402'	'r_1458'
'EX_Glycine'	'r_1231'	'r_1304'	'r_1349'	'r_1403'	'r_1459'
'EX_Biomass'	'r_1232'	'r_1305'	'r_1351'	'r_1404'	'r_1460'
'EX_ala_DASH_L'	'r_1233'	'r_1306'	'r_1353'	'r_1405'	'r_1461'
'EX_arg_DASH_L'	'r_1235'	'r_1307'	'r_1355'	'r_1406'	'r_1453'
'EX_asp_DASH_L'	'B0013'	'r_1308'	'r_1356'	'r_1407'	'r_1462'
'EX_cys_DASH_L'	'r_1238'	'r_1310'	'r_1357'	'r_1408'	'r_1464'
'EX_glu_DASH_L'	'r_1239'	'r_1311'	'r_1359'	'r_1409'	
'EX_gln_DASH_L'	'r_1240'	'r_1313'	'r_1360'	'r_1410'	
'EX_his_DASH_L'	'r_1241'	'r_1314'	'r_1362'	'r_1411'	
'EX_ile_DASH_L'	'r_1245'	'r_1315'	'r_1364'	'r_0519'	
'EX_leu_DASH_L'	'r_1246'	'r_1316'	'r_1365'	'r_1420'	
'EX_met_DASH_L'	'r_1247'	'r_1317'	'r_1366'	'r_1421'	
'EX_orn_DASH_L'	'r_1248'	'r_1318'	'r_1367'	'r_1422'	
'EX_phe_DASH_L'	'r_1249'	'r_1319'	'r_1369'	'r_1423'	
'EX_pro_DASH_L'	'r_1250'	'r_1320'	'r_1372'	'r_1424'	
'EX_ser_DASH_L'	'r_1263'	'r_1322'	'r_1373'	'r_1425'	
'EX_thr_DASH_L'	'r_1264'	'r_1323'	'r_1378'	'r_1426'	
'EX_trp_DASH_L'	'r_1266'	'r_1324'	'r_1381'	'r_1427'	
'EX_tyr_DASH_L'	'r_1269'	'r_1325'	'r_1382'	'r_1428'	
'EX_val_DASH_L'	'r_1270'	'r_1326'	'r_1383'	'r_1429'	
'EX_Lumichrome'	'r_1271'	'r_1327'	'r_1384'	'r_1430'	
'EX_Maltose'	'EX_sporolideA'	'r_1328'	'r_1385'	'r_1431'	
'EX_NH3'	'EX_L_DASH_Asp'	'r_1329'	'r_1386'	'r_1432'	
'EX_Nicotinate'	'EX_4_DASH_Aminobenzoate'	'r_1330'	'r_1387'	'r_1433'	

'EX_salinosporamideA' 'EX_B' 'r_1272'

```
%%
```

Script para uso de Paint4net

```
%Dibujar el mapa
%% definir las reacciones involucradas en el mapa
selectedRxns =
{model.rxns{[10:23,27,29,35:39,41,42,44,45,48,56,58:63,65,66,70:78,86:88,101:1
04,106,107,109:114,120,122,136,139:143,148,150,151,153,164,166,168:170,173,174
,184:187,189,197,199:202,208,211,221,225,227,230,231,235:239,241,243:246,251:2
60,262,264,265,267:276,278:282,285,286,289,291,292,294,295,299,300,303,310,311
,313,315,319,322:326,335,342,345,346,350:353,359:362,375:378,384,385,390,398,4
00,402,410,411,413:417,421:426,428:433,442,445,447,448,452,457,460:463,465,466
,471,487,490,497:500,510,512,513,519,521,524,531:536,538,539,541,543,547,552:5
54,569:571,574,576,582:585,591,603,605,606,611,612,614:625,629,633,636:639,642
:648,650:652,656,658,659,662,664,667:670,672:674,679,681,682,685,689:693,695,6
96,698,702:704,706,707,712,717,721,725:727,730:732,743,747,750,751,756:759,761
:765,767:770,773,776,778,781,786,787,799:802,810,816,819,820,823,838:846,849:8
51,854:857,860,865,871,8874:876,879,880,886,887,890,899,907,908,910,915,916,92
3,925,990:994,997,1000,1003,1022,1023,1029,1040:1042,1044,1049,1050,1052,1056:
1058,1060:1067,1074,1075,1078,1079,1103,1104,1115:1254,1270,1278,1286,1287,129
7:1398,1403:1455,1480:1484,1495:1503,1505,1506]}};
%%
% se modela el mapa y se dibuja. Para cada grupo de reacciones ingresadas

[Involved_mets1, Dead_ends1]=draw_by_rxn(model, RxnsTCA,'true','struc');
[Involved_mets2, Dead_ends2]=draw_by_rxn(model, RxnsSal,'true','struc');
[Involved_mets3, Dead_ends3]=draw_by_rxn(model, rxnsBiomass,'true','struc');
[Involved_mets4, Dead_ends4]=draw_by_rxn(model, rxnsPurine,'true','struc');
[Involved_mets5, Dead_ends5]=draw_by_rxn(model, rxnsAlanine,'true','struc');
[Involved_mets6, Dead_ends6]=draw_by_rxn(model, rxnsFolate,'true','struc');
[Involved_mets7, Dead_ends7]=draw_by_rxn(model, rxnsArgPro,'true','struc');
[Involved_mets8, Dead_ends8]=draw_by_rxn(model, rxnsGlu,'true','struc');
[Involved_mets9, Dead_ends9]=draw_by_rxn(model, rxnsTyr,'true','struc');
[Involved_mets10, Dead_ends10]=draw_by_rxn(model, rxnsSulfur,'true','struc');
[Involved_mets11, Dead_ends11]=draw_by_rxn(model, rxnsBut,'true','struc');
[Involved_mets12, Dead_ends12]=draw_by_rxn(model, rxnsTerp,'true','struc');
[Involved_mets13, Dead_ends13]=draw_by_rxn(model, rxnsIno,'true','struc');
[Involved_mets14, Dead_ends14]=draw_by_rxn(model, rxnsPyr,'true','struc');
[Involved_mets15, Dead_ends15]=draw_by_rxn(model, rxnsGlyc,'true','struc');
[Involved_mets16, Dead_ends16]=draw_by_rxn(model,
rxnsFattyAcid,'true','struc');
[Involved_mets17, Dead_ends17]=draw_by_rxn(model, rxnsBiotin,'true','struc');
```