



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA, BIOTECNOLOGÍA
Y MATERIALES

SOBREEXPRESIÓN DE GENES EN
STREPTOMYCES LEEUWENHOEKII C34 PARA
AUMENTAR LA PRODUCCIÓN DE AGENTES
TERAPÉUTICOS

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGISTER EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA,
MENCIÓN QUÍMICA

MARTÍN CLEMENTE ALFONSO BONILLA ZÚÑIGA

PROFESORA GUÍA: BARBARA ANDREWS FARROW
PROFESOR CO-GUÍA: JUAN ASENJO DE LEUZE DE LANCIZOLLE

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
IRENE MARTÍNEZ BASTERRECHEA
MARÍA ORIANA SALAZAR AGUIRRE

SANTIAGO DE CHILE
2022

RESUMEN DE LA TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE:
Magister en Ciencias de la Ingeniería, Mención Química
POR: Martín Clemente Alfonso Bonilla Zúñiga
FECHA: 2022
PROFESORA GUIA: Barbara Andrews Farrow

SOBREEXPRESIÓN DE GENES EN STREPTOMYCES LEEUWENHOEKII C34 PARA AUMENTAR LA PRODUCCIÓN DE AGENTES TERAPÉUTICOS

Para prevenir que las enfermedades causadas por infecciones bacterianas se vuelvan intratables, debido a la generación de resistencia bacteriana contra los antibióticos, los científicos buscan nuevos metabolitos especializados producidos por microorganismos geográfica y taxonómicamente aislados, que habitan en ambientes extremos. Uno de esos microorganismos es *Streptomyces leeuwenhoekii* C34 del desierto de Atacama, que produce chaxamicinas y chaxalactinas. Dichos metabolitos especializados poseen bioactividad contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, y que inhiben la actividad ATPasa de la proteína Hsp90, siendo posibles agentes antitumorales.

Con el fin de aumentar la producción de estos metabolitos especializados en *S. leeuwenhoekii* C34, se utilizó el modelo de escala genómica del microorganismo, iVR1007, para predecir genes cuya sobreexpresión o delección podría lograr dicho propósito. En este proyecto se estudia el efecto de sobreexpresar los genes *Sle39830* y *Sle27500* que, en conjunto, codifican para las cadenas alfa y beta de la enzima propanoil-CoA carboxilasa. Esta enzima cataliza la reacción de producción de (S)-2-metilmalonil-CoA a partir de propanoil-CoA, el cual es un precursor clave para la producción de chaxamicinas. Se comparó la bioactividad contra *M. luteus* y el análisis de perfil metabólico de ambas cepas para determinar la efectividad de la sobreexpresión de genes realizada.

Los resultados indican que la sobreexpresión de los dos genes mencionados es insuficiente para aumentar la producción de metabolitos especializados, ya que no implica una mayor producción de chaxamicinas y chaxalactinas que la cepa nativa. Adicionalmente, se plantea la necesidad de sobreexpresar conjuntamente los genes asociados a la producción de los otros precursores clave, AHBA y malonil-CoA, para provocar un aumento en la producción de chaxamicinas y chaxalactinas.

Un estudio de las rutas metabólicas de *S. leeuwenhoekii* C34 reveló que la reacción potenciada por la sobreexpresión de los genes *sle39830* y *sle27500* está presente en varias rutas metabólicas y tiene un efecto directo sobre el TCA, por lo que se cuenta con una posible explicación a la merma del efecto del aumento de (S)-2-metilmalonil-CoA sobre la producción de chaxamicinas y chaxalactinas.

Se proponen variadas estrategias, de forma no excluyente, para aumentar la producción de metabolitos especializados, tales como delecciones complementarias, ingeniería ribosomal, o el co-cultivo con otros microorganismos.

*Dedicado a mi familia, de la que estoy feliz de
formar parte.*

Agradecimientos

Mis más sinceros agradecimientos a mis profesores, Juan Asenjo y Barbara Andrews, y a mis guías, Valeria Razmilic y Anett Rubio, quienes apoyaron el desarrollo de este trabajo, siempre con la mejor disposición.

Agradezco de forma especial, a Stephanie Brain, Juan Amado, Sebastián Rodríguez, Jorge Canteros, y todos los que, sin estar involucrados directamente en este proyecto, me ayudaron a resolver cualquier duda que se pudiera presentar.

Finalmente, agradezco a mi familia y amigos por su apoyo, y por hacer más amena esta etapa de mi vida.

Tabla de contenido

INTRODUCCIÓN	1
ANTIBIOGRAMA.....	4
MODELOS DE ESCALA GENÓMICA	5
ESTUDIO DE PERFIL METABÓLICO.....	6
IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS ESPECIALIZADOS PRODUCIDOS POR <i>S. LEEUWENHOEKII</i> C34.....	6
PRESENTACIÓN DEL PROYECTO	7
OBJETIVOS	8
2. MATERIALES Y METODOLOGÍA	9
2.1. MATERIALES.....	9
2.2. METODOLOGÍA	9
<i>Etapa preliminar: Identificación y selección de genes para sobreexpresión de metabolitos intermediarios.....</i>	<i>9</i>
<i>Primera etapa: Construcción de reservorios biológicos para los plásmidos recombinantes</i>	<i>13</i>
<i>Segunda etapa: Conjugación de S. leeuwenhoekii C34 con Sle39830 y Sle27500</i>	<i>17</i>
<i>Etapa Final: Comparación de la producción de metabolitos especializados entre S. leeuwenhoekii C34 y S. leeuwenhoekii C34C2.</i>	<i>20</i>
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
SELECCIÓN DE GENES PARA AUMENTAR LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS INTERMEDIARIOS.....	22
GENERACIÓN DE UN RESERVORIO BIOLÓGICO DE LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANTES	22
CONJUGACIÓN DE <i>S. LEEUWENHOEKII</i> C34 CON <i>SLE39830</i> Y <i>SLE27500</i>	24
<i>Transformación de E. coli ET12567/pUZ8002</i>	<i>24</i>
<i>Conjugación de S. leeuwenhoekii C34 con E. coli ET12567/PUZ8002 sle39830-pIJ10257 y E. coli ET12567/PUZ8002 Sle27500-pIJ12551</i>	<i>24</i>
COMPARACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS ESPECIALIZADOS ENTRE <i>S. LEEUWENHOEKII</i> C34 Y <i>S. LEEUWENHOEKII</i> C34 C2.....	26
<i>Análisis de la actividad antibiótica contra M. luteus obtenida para cada cepa de S. leeuwenhoekii.....</i>	<i>26</i>
<i>Comparación del crecimiento de los cultivos de cada cepa de S. leeuwenhoekii.....</i>	<i>28</i>
<i>Comparación de diferencias en abundancia de metabolitos especializados mediante el análisis de perfiles metabólicos</i>	<i>31</i>
<i>Factores que afectan la producción de proteínas recombinantes</i>	<i>44</i>
<i>Análisis de las rutas metabólicas relacionadas con el precursor clave (S)-2-methylmalonyl-CoA</i>	<i>46</i>
<i>Posibles estrategias para impulsar la producción de metabolitos especializados en S. leeuwenhoekii C34 C2</i>	<i>49</i>
4. CONCLUSIONES.....	54
5. BIBLIOGRAFÍA.....	56
6. ANEXOS	66
A. RUTA METABÓLICA DE PRODUCCIÓN DE CHAXAMICINAS Y CHAXALACTINAS	66
B. PERFILES METABÓLICOS Y PATRONES DE FRAGMENTACIÓN PARA METABOLITOS ESPECIALIZADOS DE <i>S. LEEUWENHOEKII</i> C34 EN DISTINTOS MEDIOS.....	68
1. <i>Perfiles metabólicos.....</i>	<i>68</i>
2. <i>Patrones de fragmentación</i>	<i>69</i>
C. EQUIPOS Y REACTIVOS.....	71
1. <i>Amplificación y purificación de DNA.....</i>	<i>71</i>

2.	<i>Gibson Assembly</i>	71
3.	<i>Digestiones</i>	72
4.	<i>Transformaciones</i>	72
5.	<i>Conjugaciones</i>	73
6.	<i>Cultivos de S. leeuwenhoekii C34</i>	73
7.	<i>Extracción de proteínas</i>	74
8.	<i>Bioensayos</i>	74
9.	<i>Peso seco</i>	74
D.	MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	75
1.	<i>Medios líquidos</i>	75
2.	<i>Medios Sólidos</i>	75
3.	<i>Antibióticos</i>	76
E.	CEPAS BACTERIANAS, PLÁSMIDOS Y PARTIDORES.	77
F.	PROTOCOLOS	82
1.	<i>Amplificación de genes</i>	82
2.	<i>Purificación de DNA</i>	82
3.	<i>Extracción y purificación de plásmido</i>	83
4.	<i>Digestión de genes y plásmidos con enzimas de restricción</i>	83
5.	<i>Ligación</i>	83
6.	<i>Gibson assembly</i>	84
7.	<i>Generación de bacterias (E. coli DH5α / E. coli ET12567/pUZ8002) quimiocompetentes con cloruro de calcio (CaCl₂)</i>	85
8.	<i>Transformación bacteriana</i>	85
9.	<i>PCR de Colonias</i>	86
10.	<i>Stock en glicerol</i>	86
11.	<i>Conjugación bacteriana</i>	86
12.	<i>Cultivo en medio líquido de S. leeuwenhoekii C34</i>	87
13.	<i>Extracción de DNA genómico</i>	88
14.	<i>Extracción de proteínas</i>	89
15.	<i>Medición de peso seco</i>	89
16.	<i>Bioensayos</i>	90
G.	EJEMPLOS DE CÁLCULO	91
1.	<i>Cálculo de DNA para la ligación</i>	91
2.	<i>Prueba de hipótesis para diferencias de medias para muestras pequeñas</i>	91
H.	RESULTADOS DE LA SECUENCIACIÓN	94
1.	<i>Secuenciación de Sle39830-pIJ10257</i>	94
2.	<i>Secuenciación de Sle27500-pIJ12551</i>	95
I.	INFORMACIÓN ADICIONAL SOBRE EL ANÁLISIS DE PERFILES METABÓLICOS.....	97
1.	<i>Datos estadísticos y pruebas de hipótesis</i>	97

Índice de Tablas

TABLA 1: MEDIOS DE PRODUCCIÓN PARA CHAXAMICINAS Y CHAXALACTINAS	4
TABLA 2: DIGESTIONES REALIZADAS PARA COMPROBAR EL ÉXITO DE LAS TRANSFORMACIONES BACTERIANAS..	17
TABLA 3: CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE CHAXAMICINA A, B, C Y D PARA E. COLI Y S. AUREUS.....	43
TABLA 4: VALORES DE CARGA/MASA Y TIEMPOS DE RETENCIÓN OBTENIDOS PARA CHAXAMICINAS Y CHAXALACTINAS	69
TABLA 17: COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO LB PARA UN LITRO DE AGUA DESTILADA.	75
TABLA 18: COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO MISP2 PARA UN LITRO DE AGUA DESTILADA.....	75
TABLA 19: COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO AGAR LB POR LITRO DE AGUA DESTILADA.....	75
TABLA 20: COMPOSICIÓN DEL MEDIO AGAR SFM POR LITRO DE AGUA DESTILADA.....	76
TABLA 21: ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO	76
TABLA 5: LISTA Y DESCRIPCIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO.	77
TABLA 6: LISTA Y SECUENCIAS DE LOS PARTIDORES UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO.	78
TABLA 7: LISTA Y DESCRIPCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO	79
TABLA 8: COMPONENTES DE LA PCR PARA 30 μ L.	82
TABLA 9: ENZIMAS Y BUFFERS UTILIZADOS PARA DIGERIR EL GEN SLE39830 Y EL PLÁSMIDO PIJ10257 PARA SU POSTERIOR LIGACIÓN, Y LA ENZIMA UTILIZADA PARA LINEALIZAR EL PLÁSMIDO PIJ12551 ANTES REALIZAR GIBSON ASSEMBLY.	83
TABLA 10: COMPOSICIÓN DE LA MEZCLA PARA LIGACIÓN DE GENES Y PLÁSMIDOS.....	84
TABLA 11: COMPOSICIÓN PARA PREPARAR 1 [ML] DE 5X ISO BUFFER.....	84
TABLA 12: COMPOSICIÓN REQUERIDA PARA PREPARAR 100 [μ L] DE 2X MASTERMIX.	84
TABLA 13: CANTIDAD DE ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS EN LA COBERTURA DE LAS PLACAS DE CONJUGACIÓN.....	87
TABLA 14: DATOS ESTADÍSTICOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE LOS CULTIVOS PARA LA PRUEBA DE HIPÓTESIS PARA DIFERENCIAS DE MEDIAS.....	91
TABLA 15: RESULTADOS DE LA PRUEBA DE HIPÓTESIS PARA DIFERENCIAS DE MEDIAS DE CRECIMIENTOS PROMEDIO PARA S. LEEUWENHOEKII C34 Y S. LEEUWENHOEKII C34 C2	93
TABLA 16: RESULTADOS DE LA PRUEBA DE HIPÓTESIS PARA DIFERENCIAS DE MEDIAS PARA EL HALO DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO PRODUCIDO POR S. LEEUWENHOEKII C34 Y S. LEEUWENHOEKII C34 C2, NORMALIZADO POR LA BIOMASA.	93
TABLA 22: PROMEDIO DE ABUNDANCIA PARA CHAXAMICINAS A-D, JUNTO CON LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LOS DATOS (σ), PARA LAS MUESTRAS PROVENIENTES DEL SOBRENADANTE Y EXTRACTO METANÓLICO DEL PELLET, DE LOS CULTIVOS DE S. LEEUWENHOEKII C34 C2 Y S. LEEUWENHOEKII C34.....	97
TABLA 23: PROMEDIO DE ABUNDANCIA PARA CHAXALACTINAS A-C PARA LAS MUESTRAS PROVENIENTES DEL SOBRENADANTE Y EXTRACTO METANÓLICO DEL PELLET, DE LOS CULTIVOS DE S. LEEUWENHOEKII C34 C2 Y S. LEEUWENHOEKII C34.	97
TABLA 24: PARÁMETROS ESTADÍSTICOS Y LOS RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE HIPÓTESIS PARA LAS DIFERENCIAS DE MEDIAS DE LAS ABUNDANCIAS DE CHAXAMICINAS EN LAS MUESTRAS DE SOBRENADANTE DE S. LEEUWENHOEKII C34 Y S. LEEUWENHOEKII C34 C2.	98
TABLA 25: PARÁMETROS ESTADÍSTICOS Y LOS RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE HIPÓTESIS PARA LAS DIFERENCIAS DE MEDIAS DE LAS ABUNDANCIAS DE CHAXAMICINAS EN LAS MUESTRAS DE EXTRACTO METANÓLICO DEL PELLET (FRACCIÓN INTRACELULAR) DEL MEDIO DE CULTIVO DE S. LEEUWENHOEKII C34 Y S. LEEUWENHOEKII C34 C2.....	98
TABLA 26: PARÁMETROS ESTADÍSTICOS Y LOS RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE HIPÓTESIS PARA LAS DIFERENCIAS DE MEDIAS DE LAS ABUNDANCIAS DE CHAXALACTINAS EN LAS MUESTRAS DE SOBRENADANTE DEL MEDIO DE CULTIVO DE S. LEEUWENHOEKII C34 Y S. LEEUWENHOEKII C34 C2.	99
TABLA 27: PARÁMETROS ESTADÍSTICOS Y LOS RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE HIPÓTESIS PARA LAS DIFERENCIAS DE MEDIAS DE LAS ABUNDANCIAS DE CHAXALACTINAS EN LAS MUESTRAS DE EXTRACTO METANÓLICO DEL PELLET DEL MEDIO DE CULTIVO DE S. LEEUWENHOEKII C34 Y S. LEEUWENHOEKII C34 C2.....	99

Índice de Gráficos

GRÁFICO 1: BIOACTIVIDAD CONTRA M. LUTEUS PRODUCIDA POR S. LEEUWENHOEKII C34 C2 Y S. LEEUWENHOEKII C34.....	27
GRÁFICO 2: BIOMASA OBTENIDA PARA S. LEEUWENHOEKII C34 C2 Y S. LEEUWENHOEKII C34.	28
GRÁFICO 3: DIÁMETRO PROMEDIO DEL HALO DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DE M. LUTEUS, NORMALIZADO POR LA CONCENTRACIÓN DE BIOMASA.....	30
GRÁFICO 4: ABUNDANCIA DE CHAXAMICINAS A, B, C Y D, EN LAS MUESTRAS DE SOBRENADANTE Y EXTRACTO METANÓLICO DEL PELLET CELULAR PARA S. LEEUWENHOEKII C34 C2 Y S. LEEUWENHOEKII C34	36
GRÁFICO 5: ABUNDANCIA DE CHAXALACTINAS A, B Y C, EN LAS MUESTRAS DE SOBRENADANTE Y EXTRACTO METANÓLICO DEL PELLET CELULAR PARA S. LEEUWENHOEKII C34 C2 Y S. LEEUWENHOEKII C34	41

Índice de Figuras

FIGURA 1: ESTRUCTURAS DE LAS CHAXAMICINAS A, B, C Y D, Y CHAXALACTINAS A, B Y C.....	3
FIGURA 2: EJEMPLO DE ANTIBIOGRAMA DE DISCOS	5
FIGURA 3: VERSIÓN SIMPLIFICADA DEL MAPA METABÓLICO DE LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS ESPECIALIZADOS EN S. LEEUWENHOEKII C34.....	10
FIGURA 4: EXTRACTO DE LA RUTA METABÓLICA ASOCIADA A LA PRODUCCIÓN DE CHAXALACTINA A EN S. LEEUWENHOEKII C34... ..	11
FIGURA 5: FRAGMENTO DE LA RUTA METABÓLICA ASOCIADA A LA PRODUCCIÓN DE CHAXAMICINA A EN S. LEEUWENHOEKII C34. ..	11
FIGURA 6: ESTRATEGIA GENERAL UTILIZADA EN ESTE TRABAJO.	12
FIGURA 7: ESTRATEGIA UTILIZADA PARA GENERAR EL RESERVORIO BIOLÓGICO DE LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANTES SLE27500 - PIJ12551 Y SLE39830 - PIJ10257, MEDIANTE LA TRANSFORMACIÓN DE E. COLI DH5A.	13
FIGURA 8: INSERCIÓN DEL GEN SLE39830 EN EL PLÁSMIDO PIJ10257.	14
FIGURA 9: INSERCIÓN DEL GEN SLE27500 EN EL PLÁSMIDO PIJ10257.	15
FIGURA 10: ESTRATEGIA UTILIZADA PARA OBTENER S. LEEUWENHOEKII C34 CONJUGANTE.	18
FIGURA 11: COMPARACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS ESPECIALIZADOS EN S. LEEUWENHOEKII C34 Y S. LEEUWENHOEKII C34C2, MEDIANTE BIOENSAYOS Y PERFILES METABÓLICOS.	20
FIGURA 12: ELECTROFORESIS DEL PCR DE COLONIAS DE E. COLI DH5A TRANSFORMADA CON SLE39830-PIJ10257, DEL PCR DE COLONIAS DE E. COLI DH5A TRANSFORMADA CON SLE27500-PIJ12551.....	23
FIGURA 13: ELECTROFORESIS DEL PCR DE COLONIAS DE LAS POTENCIALES S. LEEUWENHOEKII C34 CONJUGADAS CON E. COLI ET12567/PUZ8002 SLE39830-PIJ10257.....	24
FIGURA 14: ELECTROFORESIS DEL PCR DE UNA DE LAS POTENCIALES S. LEEUWENHOEKII C34 C2 CONJUGADAS CON E. COLI ET12567/PUZ8002 SLE27500-PIJ12551.....	25
FIGURA 15: EICs DE CHAXAMICINAS A, B Y C, PARA LAS MUESTRAS DE EXTRACTO METANÓLICO DEL PELLET DEL MEDIO DE CULTIVO DE S. LEEUWENHOEKII C34 Y S. LEEUWENHOEKII C34 C2.....	32
FIGURA 16: EICs DE LA CHAXAMICINA D, PARA LAS MUESTRAS DE EXTRACTO METANÓLICO DEL PELLET DEL MEDIO DE CULTIVO DE S. LEEUWENHOEKII C34 Y S. LEEUWENHOEKII C34 C2	33
FIGURA 17: EICs DE CHAXAMICINAS A, B Y C, PARA LAS MUESTRAS DE SOBRENADANTE DEL MEDIO DE CULTIVO DE S. LEEUWENHOEKII C34 Y S. LEEUWENHOEKII C34 C2	34
FIGURA 18: EICs DE LA CHAXAMICINA D PARA LAS MUESTRAS DE SOBRENADANTE DEL MEDIO DE CULTIVO DE S. LEEUWENHOEKII C34 Y S. LEEUWENHOEKII C34 C2	35
FIGURA 19: FRAGMENTO DEL MECANISMO DE BIOSÍNTESIS PROPUESTO PARA LAS CHAXAMICINAS	37
FIGURA 20: EICs DE LAS POTENCIALES CHAXALACTINAS A, B Y C CON ADUCTOS DE ÁCIDO FÓRMICO, PARA LAS MUESTRAS DE EXTRACTO METANÓLICO DEL PELLET DEL MEDIO DE CULTIVO DE S. LEEUWENHOEKII C34 Y S. LEEUWENHOEKII C34 C2). .	39
FIGURA 21: EICs DE LAS POTENCIALES CHAXALACTINAS A, B Y C CON ADUCTOS DE ÁCIDO FÓRMICO, PARA LAS MUESTRAS DE SOBRENADANTE DEL MEDIO DE CULTIVO DE S. LEEUWENHOEKII C34 Y S. LEEUWENHOEKII C34 C2	40
FIGURA 22: FRAGMENTO DEL MECANISMO DE PRODUCCIÓN DE CHAXALACTINAS, OBTENIDO DE CASTRO ET AL., 2018	42
FIGURA 23: EN LA PARTE SUPERIOR SE INCLUYE UN MAPA DEL CLUSTER DE GENES INVOLUCRADOS EN LA PRODUCCIÓN DE CHAXAMICINAS. EN LA PARTE INFERIOR, SE MUESTRA EL MECANISMO PARA LA BIOSÍNTESIS DE CHAXAMICINAS A-D.....	66
FIGURA 24: CLUSTER DE GENES ASOCIADOS A LA PRODUCCIÓN DE CHAXALACTINAS, JUNTO CON EL MECANISMO PARA SU BIOSÍNTESIS.	67
FIGURA 25: PERFILES OBTENIDOS DE LCMS DEL PATRÓN DE METABOLITOS DE S. LEEUWENHOEKII C34 EN DISTINTOS MEDIOS ...	68
FIGURA 26: PATRONES DE FRAGMENTACIÓN DE LAS CHAXAMICINAS A, B, C Y D, GENERADOS A PARTIR DE IONIZACIÓN NEGATIVA	69
FIGURA 27: PATRONES DE FRAGMENTACIÓN DE LAS CHAXAMICINAS A, B, C Y D OBTENIDOS A PARTIR DEL ANÁLISIS HPLC MS/MS DE LAS MUESTRAS TRABAJADAS EN ESTE PROYECTO.	70
FIGURA 28: MAPA DEL PLÁSMIDO SLE39830-PIJ10257.....	80
FIGURA 29: MAPA DEL PLÁSMIDO SLE27500-PIJ12551.. ..	81

FIGURA 30: RESULTADO DE LA SECUENCIACIÓN DEL DNA PLASMIDIAL DE E. COLI DH5A SLe39830-PIJ10257 AMPLIFICADA CON EL PARTIDOR FORWARD BZ01F, Y LA SECUENCIA DEL FRAGMENTO CORRESPONDIENTE DEL GEN SLe39830 OBTENIDA DESDE BENCHLING	94
FIGURA 31: RESULTADO DE LA SECUENCIACIÓN DEL DNA PLASMIDIAL DE E. COLI DH5A SLe39830-PIJ10257 AMPLIFICADA CON EL PARTIDOR REVERSE BZ01R, Y LA SECUENCIA DEL FRAGMENTO CORRESPONDIENTE DEL GEN SLe39830 OBTENIDA DESDE BENCHLING	95
FIGURA 32: RESULTADO DE LA SECUENCIACIÓN DEL DNA PLASMIDIAL DE E. COLI DH5A SLe27500-PIJ12551 AMPLIFICADA CON EL PARTIDOR FORWARD GBA04 ,Y LA SECUENCIA DEL FRAGMENTO CORRESPONDIENTE DEL GEN SLe27500 OBTENIDA DESDE BENCHLING	95
FIGURA 33: RESULTADO DE LA SECUENCIACIÓN DEL DNA PLASMIDIAL DE E. COLI DH5A SLe27500-PIJ12551 AMPLIFICADA CON EL PARTIDOR REVERSE GBA03 Y LA SECUENCIA DEL FRAGMENTO CORRESPONDIENTE DEL GEN SLe27500 OBTENIDA DESDE BENCHLING.	96

1. Introducción

El ser humano ha tenido que interactuar con todo tipo de microorganismos desde tiempos inmemoriales, generando relaciones de naturalezas muy distintas. En algunos casos éstas han sido beneficiosas como la flora intestinal [1][2], en otros, resultan ser perjudiciales, como las diversas infecciones ocasionadas por la proliferación de microorganismos patógenos en el cuerpo, que causan todo tipo de enfermedades [3][4].

Muchas enfermedades de origen microbiológico pueden ser controladas gracias a la acción de antibióticos, es decir, sustancias capaces de eliminar selectivamente microorganismos patógenos.

En 1909, el doctor y bioquímico alemán *Paul Ehrlich* descubrió que cierto pigmento de anilina teñía de forma selectiva ciertas bacterias, lo que le dio la idea de utilizar dichas sustancias para tratar enfermedades causadas por bacterias [5][6], logrando utilizar exitosamente la arsfenamina para combatir la sífilis. En 1928, el doctor, microbiólogo y farmacólogo escocés Alexander Fleming vio contaminados sus cultivos de *Staphylococcus* por el hongo *Penicillium notatum*, y observó que *Staphylococcus* no crecía en las cercanías de las colonias de *P. notatum*. Posteriormente, logró purificar el compuesto conocido hoy en día como penicilina [6].

Según la *world health organization* [7] y otras fuentes [8][9], los términos antibacterial y antibiótico son sinónimos mientras que antimicrobial se refiere al conjunto de sustancias que elimina los distintos tipos de microorganismos. Sin embargo, la etimología de la palabra sugiere que antibiótico originalmente se refería a sustancias capaces de eliminar todo tipo de microorganismos, siendo sinónimo de antimicrobial y no de antibacterial [10].

Desafortunadamente, los microorganismos pueden adquirir resistencia a los antibióticos, volviéndose gradualmente inmunes a sustancias que originalmente eran capaces de eliminarlos [11]. Normalmente, la adquisición de esta característica se lleva a cabo a través de mutaciones en el genoma de las bacterias, que tienen lugar durante el transcurso de varias generaciones. Sin embargo, dicho proceso se ve acelerado por el uso innecesario o indebido de los antibióticos, además de la capacidad de transferencia de genes por parte de las bacterias resistentes expuestas a antibióticos hacia las bacterias no resistentes [12]. Todos estos factores provocan que los antibióticos conocidos pierdan su efectividad contra las bacterias que antes eran capaces de neutralizar. Esto representa un gran riesgo para la salud humana y la seguridad de los alimentos, ya que el número de infecciones para las que los antibióticos ven reducida su actividad está en aumento [13].

Por lo anterior, los científicos han recurrido a ambientes geográficamente aislados con condiciones extremas de salinidad, temperatura, humedad y radiación UV, con el fin encontrar microorganismos capaces de producir metabolitos especializados que aún no hayan sido utilizados, y que posean bioactividad contra bacterias patógenas. Tal es el caso del filo actinomicetas, bacterias gram-positivas aeróbicas y anaeróbicas [14] que se caracterizan por formar hifas ramificadas. Las actinomicetas que se encuentran en ambientes aislados se han caracterizado por poseer un gran potencial para producir

compuestos bioactivos inexplorados [15] y son la principal fuente de antibióticos clínicamente relevantes, que suelen ser muy complejos para ser sintetizados a través de combinaciones de reacciones químicas [16].

Entre las actinomicetas se encuentran los órdenes *actinobacteria*, *actinoplanetes*, *maduromycetes*, *micropolysporas*, *multilocular*, *nocardioform*, *streptomyces* y *thermomonosporas*. Sus hábitats incluyen el suelo, el agua, nódulos de raíces de plantas y materia orgánica en descomposición[17]. Son conocidas por su capacidad de producir compuestos bioactivos, entre los cuales destacan los antibióticos eritromicina, streptomycin, vancomicina, actinomicina, daptomicina, streptotricina y tetraciclina [16].

Dentro de las actinomicetas se encuentra el género *Streptomyces*, compuesto por bacterias aeróbicas, quimioorganotróficas, filamentosas y gram positivas, que contienen un alto contenido de GC (guanina y citosina) en sus genomas (70 %) [18]. Las actinomicetas son responsables del 32,1 % de la producción de sustancias bioactivas, representando un 45,6 % de los antifúngicos y antibacterianos registrados en la ABL¹ en 2001 [19].

Dentro del género *Streptomyces* se encuentra *Streptomyces leeuwenhoekii* C34, una bacteria extremófila que fue aislada desde una muestra de suelo proveniente de la laguna de Chaxa, ubicada en el desierto de Atacama [13], y descrita como nueva especie en 2014. Su línea filogenética se encuentra alejada de otras especies de su género, como lo respalda la técnica análisis de secuencia de multi-locus (MLSA por sus siglas en inglés) realizada usando 5 genes conservados (*atpD* (ATP synthase F1, beta subunit), *gyrB* (DNA gyrase B subunit), *rpoB* (RNA polymerase beta subunit), *recA* (recombinase A) and *trpB* (*tryptophan synthetase*, beta subunit)), y posee características químico taxonómicas distintas a las de otras especies del género *Streptomyces* [20].

S. leeuwenhoekii C34 se caracteriza por producir los metabolitos especializados chaxamicinas y chaxalactinas [20], los cuales poseen bioactividad contra *Staphylococcus aureus* y *E.coli*. El primero es responsable de enfermedades como septicemia, endocarditis infecciosa, infecciones del tejido suave y piel (por ejemplo, impétigo, foliculitis, furúnculos, carbúnculos, celulitis y síndrome de la piel escaldada, entre otras), osteomielitis, artritis séptica, infecciones en prótesis, infecciones pulmonares (por ejemplo, neumonía y empiema), gastroenteritis, meningitis, síndrome de shock tóxico, e infección del tracto urinario [21]. *E. coli* puede producir diarrea sangrienta, y en ocasiones insuficiencia renal e incluso la muerte.

Las chaxamicinas son policétidos estructuralmente similares a las ansamicinas. Actualmente se han descubierto cuatro tipos de chaxamicinas llamadas chaxamicinas A, B, C y D. Se ha reportado que estas moléculas poseen actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922, y adicionalmente, tienen la capacidad de inhibir la actividad ATPasa de la proteína Hsp90[22], por lo que tienen potencial para ser usadas en terapias anti tumorales [23].

¹ Antibiotic Literature Database.

A continuación, se aprecia la estructura de las chaxamicinas y chaxalactinas:

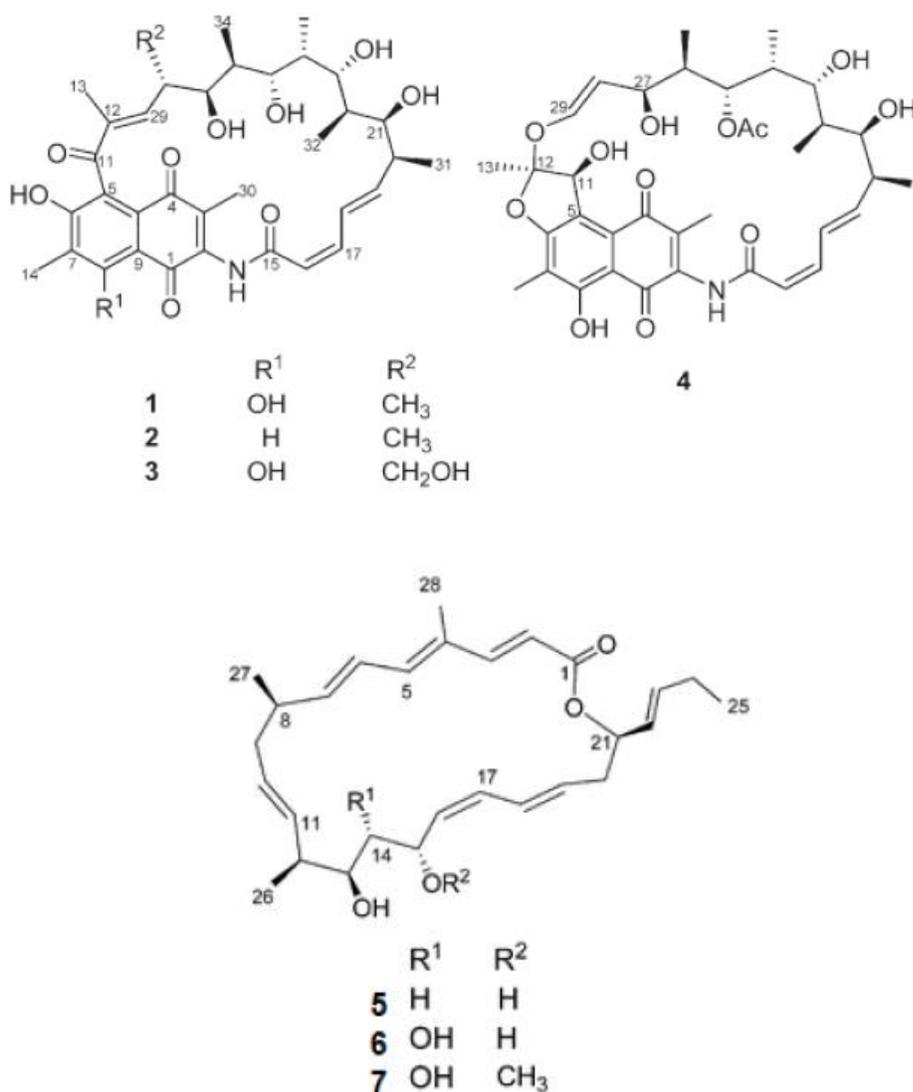


Figura 1: Estructuras de las chaxamicinas A, B, C y D (compuestos 1, 2, 3 y 4, respectivamente), y chaxalactinas A, B y C (compuestos 5, 6 y 7, respectivamente), obtenidas de Rateb et al., 2011 [24].

Arriba a la izquierda se ve la estructura común para chaxamicinas A, B y C (o compuestos 1, 2 y 3) teniendo en cuenta las variaciones en R₁ y R₂ que se especifican bajo la molécula. Arriba a la derecha se encuentra el compuesto 4 (o chaxamicina D). Abajo se encuentra la estructura común para chaxalactinas A, B y C (o compuestos 5, 6 y 7, respectivamente) [24].

Se ha estudiado la producción de metabolitos especializados de *S. leeuwenhoekii* C34 en distintos medios de cultivo. En la Tabla 1 se muestran los resultados relevantes para la producción de chaxamicinas y chaxalactinas [25]. Cabe mencionar que se encontraron numerosos y diferentes metabolitos especializados distintos de las chaxamicinas y chaxalactinas, pero no se mencionan en este documento por no ser relevantes para el proyecto.

Tabla 1: Medios de producción para chaxamicinas y chaxalactinas [25].

Compuesto	Medios
Chaxamicina A	Glucosa y extracto de levadura (GYE), harina de soya y manitol (SFM), papas y dextrosa (PD).
Chaxamicina B	Proyecto internacional de <i>Streptomyces</i> (ISP) 2, extracto de malta y peptona (MEP), medios de Fries modificados (1 y 2).
Chaxamicina C	Medio ISP2 modificado (glicerol en vez de glucosa).
Chaxamicina D	Medio ISP2 modificado (glicerol en vez de glucosa).
Chaxalactinas A-C	Medio definido n° 3, utilizando glicerol como fuente de carbono.

Se encontró que la chaxamicina A fue el metabólico más producido en todos los medios, por lo que esta molécula puede ser útil como un marcador para esta especie [25].

Adicionalmente, se determinó que el medio de cultivo utilizado no solo determina la cantidad producida de ciertos metabolitos, sino que también activa rutas metabólicas que provocan la producción de compuestos pertenecientes a variadas naturalezas químicas. Al cultivar la bacteria en medio ISP2, se obtuvieron los compuestos 1 y 2 (ver Figura 1), mientras que al realizar el cultivo en el medio modificado, reemplazando la glucosa por glicerol, se obtuvieron los compuestos 1, 3 y 4 [24].

Antibiograma

Es una técnica utilizada para determinar la sensibilidad de un microorganismo a un antibiótico. Consiste en inocular una placa de Petri con el microorganismo en cuestión, y poner en contacto con la superficie expuesta y húmeda del medio de cultivo un disco de papel de filtro impregnado con el antibiótico que se quiere probar, el cual difundirá hacia el medio. Se deja incubar de 18 a 24 horas y luego se mide el halo de inhibición de crecimiento del microorganismo, o HIC, alrededor del disco de papel.

El tamaño del HIC está dado por la concentración mínima inhibitoria (CMI) del antibiótico para un microorganismo determinado, que se encuentra en la frontera entre crecimiento y no crecimiento del microorganismo. Todos los puntos dentro del HIC poseen una concentración de antibiótico mayor que la CMI, por lo que dentro del HIC se inhibe el crecimiento del microorganismo. Mientras mayor sea la concentración del antibiótico en la solución, se podrá encontrar concentraciones mayores a la CMI más lejos del origen, y, en consecuencia, el HIC será más grande.

Dependiendo del tamaño del HIC, la sensibilidad del microorganismo frente al antibiótico se clasifica como sensible (S), intermedia (I), o resistente (R) según los criterios de la *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI por sus siglas en inglés)² [26][27].

² Hasta 2005 CLSI era conocida como *National Comitee for Clinical Laboratory Standard*.

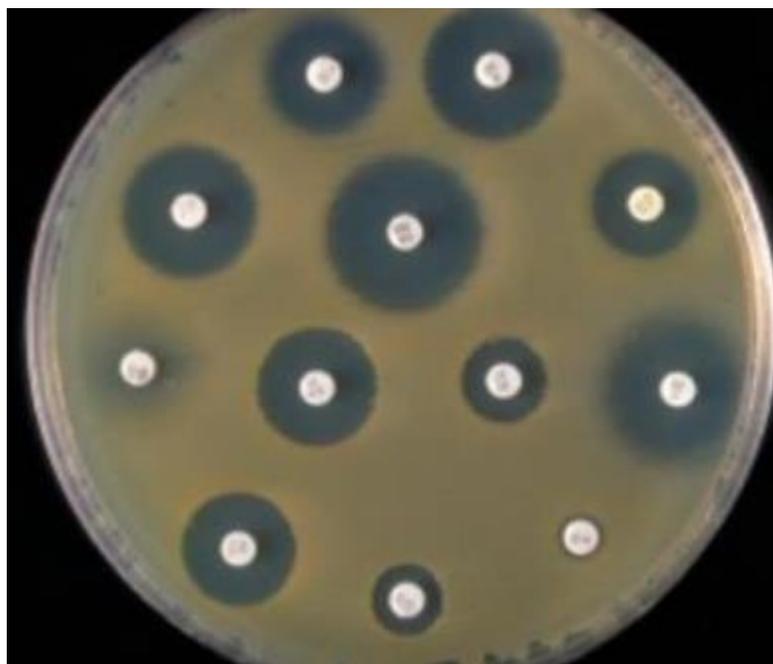


Figura 2: Ejemplo de antibiograma de discos [28].

Una alternativa al antibiograma de discos mostrado en la Figura 2 [28] es el antibiograma de pozos. En esta técnica se hacen pozos cilíndricos en el agar seco y se introduce la solución con antibiótico al interior del pozo, que luego difundirá a través del agar. Esta variación ha sido utilizada anteriormente para la optimización de las condiciones de cultivo en otras cepas de *Streptomyces* para crecimiento y producción de antibióticos [29][30].

Modelos de escala genómica

Los modelos de escala genómica, o GSM por sus siglas en inglés (*Genome Scale Model*), están compuestos de una red de reacciones construidas en base a la relación gen-enzima-reacción. Dicha red de reacciones químicas que ocurren en el interior del microorganismo se reconstruye utilizando información del genoma del organismo en estudio, junto con información detallada sobre las reacciones proveniente de literatura que incluye anotación funcional del genoma, estequiometría, composición de la biomasa y requerimientos energéticos [31].

Las simulaciones en los GSM pueden realizarse utilizando el paquete *COBRApy* del software Python³. En ellas, se utiliza el análisis de balance de flujos (FBA) para calcular los flujos de cada metabolito a través de una red metabólica perteneciente a un modelo de escala genómica, para lograr un objetivo en particular (por ejemplo, maximizar o minimizar el flujo a través de una determinada reacción) mediante el comando *model.optimize*. Funciona imponiendo restricciones basadas en la estequiometría de cada reacción y en las restricciones adicionales que puede poner el usuario, limitando la

³ <https://www.python.org/>

producción y consumo de reactivos en una cierta reacción mediante los comandos *lower_bound* y *upper_bound* [32][33].

Existen GSMs para *Streptomyces* [34][35], algunos de los cuales se han utilizado anteriormente para estudiar cambios en la producción de metabolitos especializados [36], y para llevar a cabo análisis de variabilidad de flujo (FVA)⁴ para modelar la entrada de un proceso productivo de antibióticos [37].

El modelo de escala genómica iVR1007 para *S. leeuwenhoekii* C34 fue desarrollado por Razmilic [38] para estudiar las rutas de síntesis de distintos metabolitos especializados, y para determinar los genes de interés para aumentar la producción de dichos metabolitos. En este modelo se incluyen 1.722 reacciones, 1,463 metabolitos y 1.007 genes, además de las rutas metabólicas para la síntesis chaxamicinas, chaxalactinas y desferrioxaminas, entre otros. Fue validado utilizando datos experimentales de crecimiento bajo 166 fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo, con un 83,7% de exactitud. Es importante notar que el modelo iVR1007 no incluye restricciones relacionadas con elementos de regulación de genes ni reacciones.

Estudio de perfil metabólico

En los sistemas biológicos, el estudio de perfiles metabólicos es la identificación y cuantificación, a través de resonancia magnética nuclear (NRM, por sus siglas en inglés) o espectrometría de masas en cromatografía líquida, de metabolitos específicos de bajo peso molecular, sus intermediarios asociados enfocándose en tipos de compuestos (lípidos polares, isoprenoides, carbohidratos, amino ácidos), o en compuestos pertenecientes a una ruta metabólica en particular [39]. Ésta técnica ha sido utilizada en microorganismos para el estudio de variaciones inherentes en metabolismos de subpoblaciones de una especie, variaciones frente a modificaciones genéticas y estímulos fisiológicos, pato-fisiológicos y/o de desarrollo [40].

En humanos, se ha utilizado en distintos tipos de muestras biológicas (orina, suero, extractos de tejido) con el fin de estudiar biomarcadores y mecanismos biológicos para apoyar investigaciones en toxicología y patología en estudios preclínicos de desarrollo de medicamentos [39]. También se ha utilizado para estudiar el impacto de la dieta, actividad física y contextura física sobre el metabolismo con el fin de prevenir el cáncer [41].

Identificación de metabolitos especializados producidos por *S. leeuwenhoekii* C34

En 2011, se estudiaron los perfiles metabólicos de *S. leeuwenhoekii* C34 para la producción de metabolitos especializados en distintos medios de cultivo, utilizando el método OSMAC⁵. Éste método ha sido ampliamente utilizado para el descubrimiento de

⁴ FVA: Herramienta computacional utilizada comúnmente en modelos de escala genómica para determinar un rango de valores para el flujo de metabolitos en cada reacción que hace que el problema planteado tenga solución [128].

⁵OSMAC: "*One strain, many compounds*". Se cultiva un microorganismo en distintos medios, variando factores relevantes (pH, composición, oxigenación, temperatura, entre otros) para activar varias rutas metabólicas para la producción de metabolitos especializados[129].

nuevos antibióticos [25]. En dicho estudio, se logró identificar chaxamicinas A-D, chaxalactinas A-C, deferroxamina E, higromicina A y dihidrohigromicina A. Los resultados de LC MS recopilados para chaxamicinas y chaxalactinas se encuentran en el anexo B en forma de gráficos, junto con una los tiempos de retención en la columna cromatográfica, sus valores de carga/masa (m/z) [25][42]. También se incluyen los patrones de fragmentación de las chaxamicinas, pero no se cuenta con los de las chaxalactinas.

Presentación del proyecto

Esta investigación es parte del proyecto de V. Razmilic y A. Rubio para aumentar la producción de chaxamicinas y chaxalactinas en *S. leeuwenhoekii* C34, mediante la sobreexpresión o delección de genes predichos por el modelo de escala genómica del microorganismo, construido por Razmilic[38], con el objetivo de aumentar la producción de intermediarios para los metabolitos especializados.

En este estudio, se realiza la selección de genes para potenciar o silenciar una reacción relacionada con la ruta metabólica de producción de metabolitos especializados, basándose en las predicciones del modelo de escala genómica mencionado. Luego de llevar a cabo la modificación genética seleccionada, se compara la producción de metabolitos especializados entre *S. leeuwenhoekii* C34 *wildtype* y modificada, para evaluar la efectividad de la sobreexpresión o delección realizada.

Objetivos

El principal objetivo de este trabajo es determinar la efectividad de realizar una modificación genética, seleccionada de las predichas por el modelo iVR1007, para aumentar la producción de chaxamicinas y chaxalactinas en *S. leeuwenhoekii* C34. Para ello, se deben lograr los siguientes objetivos específicos:

- 1) Seleccionar una reacción de la ruta metabólica de producción de metabolitos especializados, tal que la sobreexpresión o delección de los genes asociados a ella, pueda ocasionar un potencial aumento de la producción de chaxamicinas y chaxalactinas, mediante el análisis de la ruta metabólica de producción de metabolitos especializados y las predicciones realizadas por el modelo iVR1007.
- 2) Obtener un reservorio biológico de los genes seleccionados, insertos en plásmidos recombinantes, mediante la transformación de *E. coli* DH5 α con dichos vectores.
- 3) Obtener una cepa de *S. leeuwenhoekii* C34 con un número aumentado de copias de los genes seleccionados, mediante la conjugación de *S. leeuwenhoekii* C34 con los plásmidos recombinantes mencionados en el objetivo 2.
- 4) Evaluar la efectividad de la modificación genética realizada para aumentar la producción de metabolitos especializados, mediante la comparación de la producción de chaxamicinas y chaxalactinas entre las cepas de *S. leeuwenhoekii* C34 *wildtype* y modificada.

2. Materiales y Metodología

2.1. Materiales

Una lista detallada de las cepas bacterianas, plásmidos y partidores utilizados en este trabajo, se encuentra en el anexo C; los materiales, equipos y reactivos utilizados se pueden encontrar en el anexo C; y los medios y condiciones de cultivo se encuentran en el anexo D.

2.2. Metodología

Etapa preliminar: *Identificación y selección de genes para sobreexpresión de metabolitos intermediarios*

Con el objetivo de aumentar la producción de chaxamicinas y chaxalactinas en *S. leeuwenhoekii* C34, es necesario determinar qué genes pueden ser útiles para ese propósito. Para ello, se estudió el mapa metabólico de *S. leeuwenhoekii* C34 para la producción de dichos metabolitos especializados, mostrado en la Figura 3, en el que se muestran los genes candidatos para ser sobreexpresados, predichos por el modelo iVR1007, para la producción de chaxamicinas y chaxalactinas. En la Figura 4 y Figura 5 se puede encontrar fragmentos más detallados de las rutas metabólicas de producción de chaxalactinas y chaxamicinas, respectivamente. Finalmente, se seleccionaron metabolitos intermediarios que no estuvieran siendo estudiados por otros investigadores para la producción de estos compuestos, y se analizaron las rutas metabólicas de *S. leeuwenhoekii* C34 presentes en la base de datos de KEGG para la producción de dichos metabolitos.

A continuación, se muestra el mapa metabólico correspondiente a la producción de chaxamicina A y chaxalactina A, proveniente del modelo de escala genómica iVR1007, de *S. leeuwenhoekii* C34 [38]. Los precursores clave, (S)-2-metilmalonil-CoA, malonil-CoA y 3-Amino-5-hidroxibenzoato (AHBA), se muestran como círculos rojos. Los genes asociados a cada reacción se muestran en verde si son candidatos para ser sobreexpresados, y en rojo si son candidatos para ser silenciados.

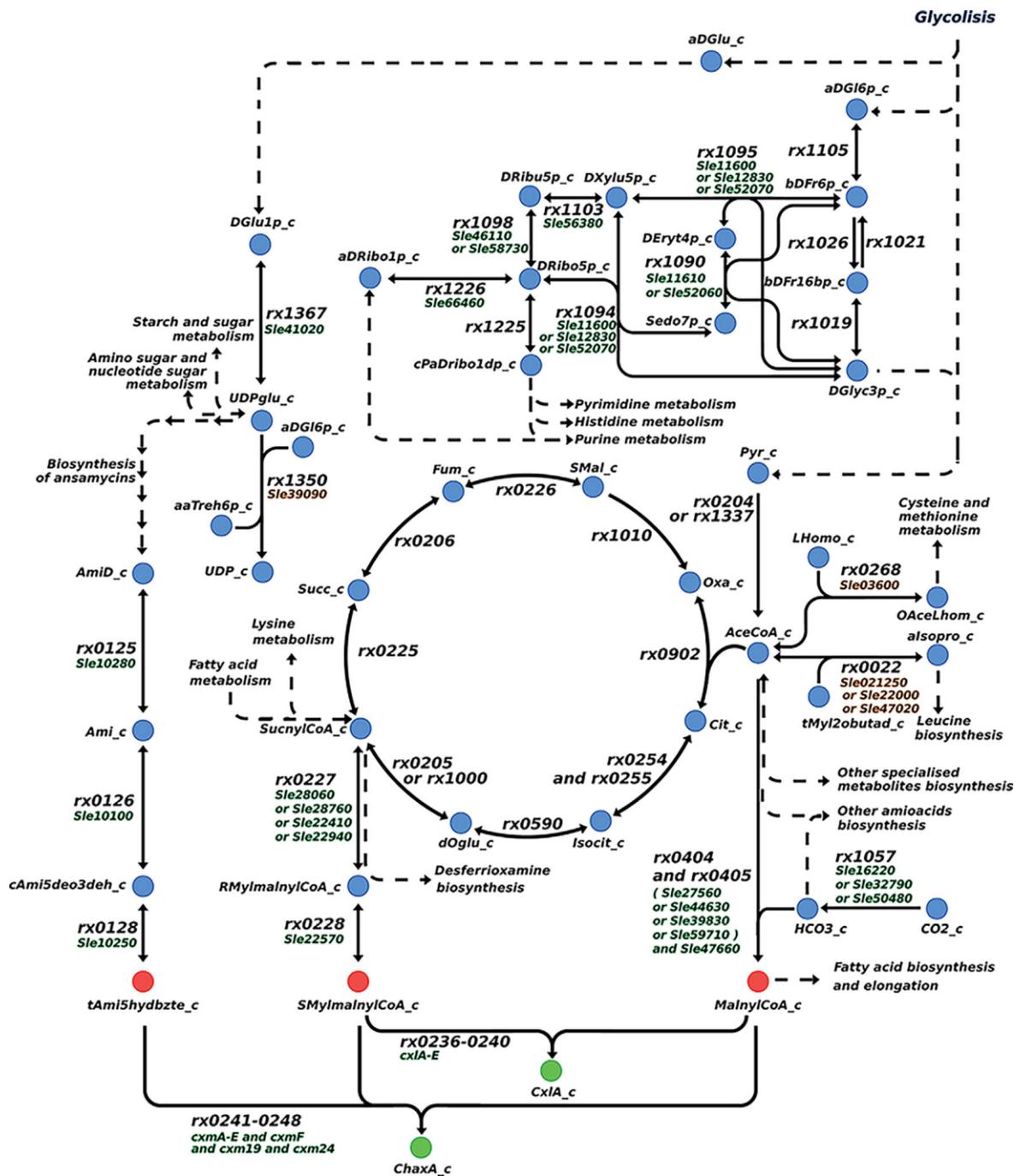


Figura 3: Versión simplificada del mapa metabólico de la producción de metabolitos especializados en *S. leeuwenhoekii* C34, obtenido de Razmilic et al., 2018 [38]. Se incluyen los genes que podrían ser sobreexpresados (en verde) o silenciados (en rojo) para aumentar la producción de chaxalactinas y chaxamicinas, de acuerdo con las predicciones del modelo iVR1007.

A continuación, se muestran fragmentos de rutas metabólicas asociada a la producción de metabolitos especializados en *S. leeuwenhoekii* C34, centrados en la producción de chaxamicina A y chaxalactina A.

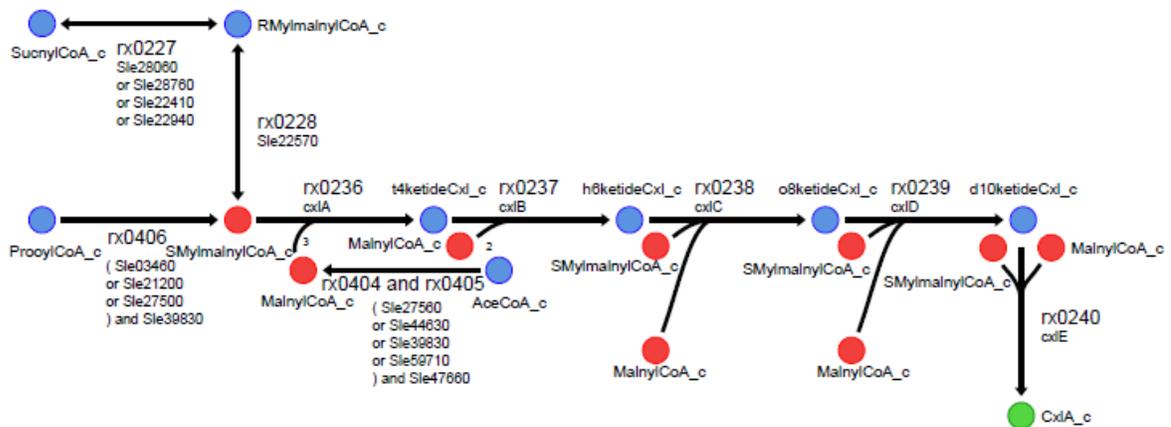


Figura 4: Extracto de la ruta metabólica asociada a la producción de chaxalactina A en *S. leeuwenhoekii* C34, obtenida de Razmilic et al., 2017 [38].

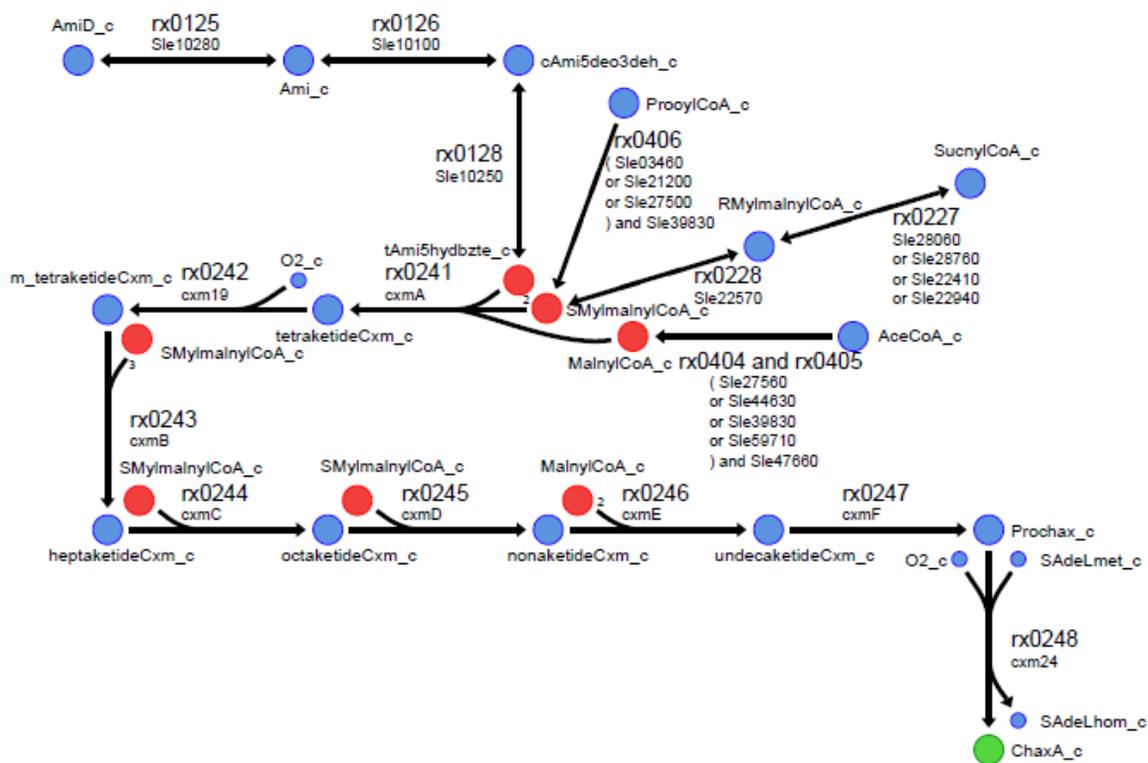
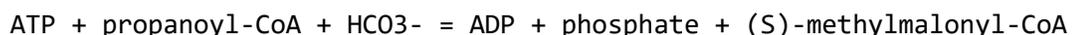


Figura 5: Fragmento de la ruta metabólica asociada a la producción de chaxamicina A en *S. leeuwenhoekii* C34, obtenida de Razmilic et al., 2017 [43].

Dentro de los genes candidatos se encuentran *Sle39830* y *Sle27500*, que codifican, respectivamente, para la producción de las cadenas alfa y beta de la enzima propanoil-CoA carboxilasa [44][45], la cual cataliza la reacción de producción de (S)-2-metilmalonil-CoA a partir de propanoil-CoA mostrada a continuación.



Como se puede observar en la Figura 4 y la Figura 5, el compuesto propanoil-CoA (ProoylCoA_c) es utilizado en la ruta metabólica de producción de chaxamicinas y chaxalactinas para formar el compuesto (S)-2-metilmalonil-CoA (smylmalnylcoa_C), el cual es uno de los precursores clave para la producción de chaxamicinas y chaxalactinas.

Se decidió trabajar con la reacción de producción de (S)-2-metilmalonil-Co A a partir de propanoil-CoA, ya que, teóricamente, propiciar esta reacción debería provocar un aumento en la producción total de chaxamicinas y chaxalactinas, según se aprecia en la Figura 5, y en la Figura 3.

Al finalizar la etapa preliminar de selección de los genes a sobreexpresar, este proyecto consta de 3 etapas principales, que se ilustran en la Figura 6.

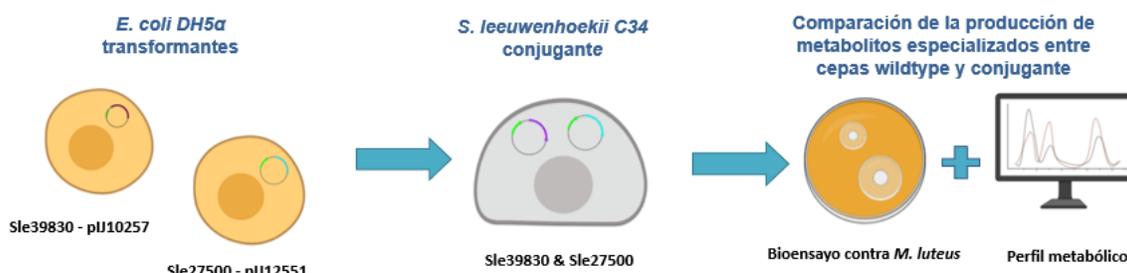


Figura 6: Estrategia general utilizada en este trabajo.

En la primera etapa se generaron reservorios biológicos de los plásmidos recombinantes Sle27500 – pIJ12551 y Sle39830 – pIJ10257 en *E. coli* DH5 α , para facilitar su obtención para la etapa siguiente. En la segunda etapa se obtiene una cepa conjugante de *S. leeuwenhoekii* C34 que contiene los plásmidos recombinantes de ambos genes, y en la tercera etapa se analizan las diferencias en la producción de metabolitos especializados entre *S. leeuwenhoekii* C34 y *S. leeuwenhoekii* C34 C2, según se describe en la Tabla 10 del anexo E.

Primera etapa: Construcción de reservorios biológicos para los plásmidos recombinantes

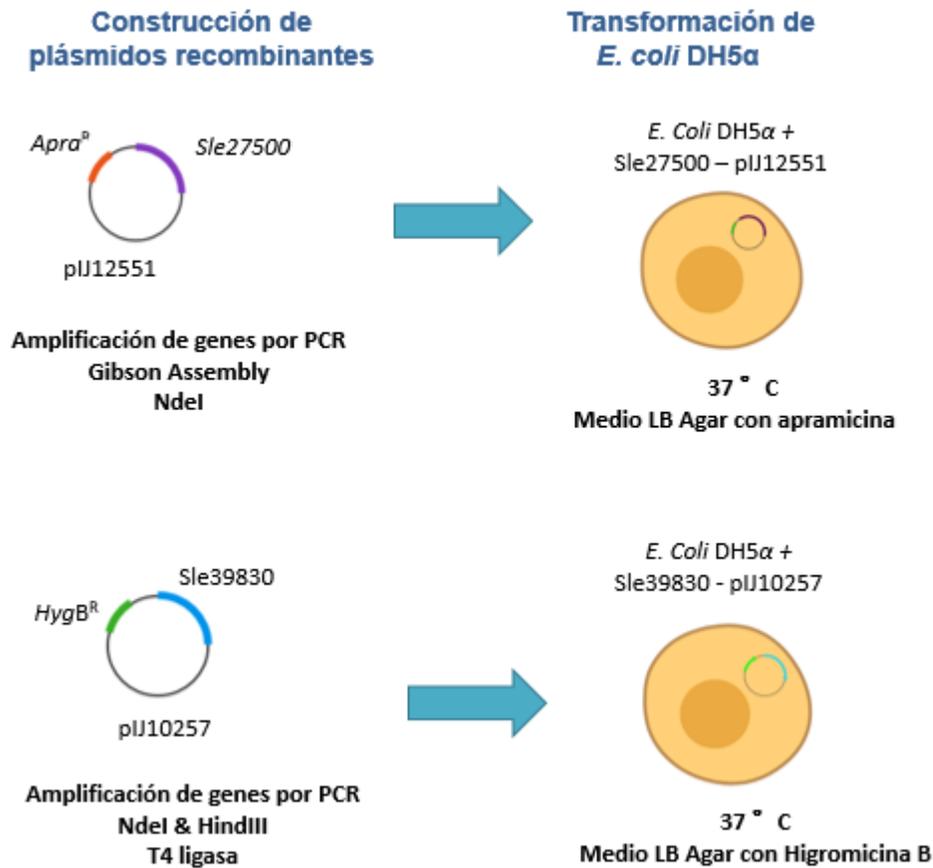


Figura 7: Estrategia utilizada para generar el reservorio biológico de los plásmidos recombinantes *Sle27500* - pIJ12551 y *Sle39830* - pIJ10257, mediante la transformación de *E. coli* DH5α.

Para llevar a cabo la primera etapa, cuya estrategia es ilustrada en la Figura 7, es necesario realizar los pasos detallados a continuación:

Construcción de los plásmidos recombinantes

Diseño de partidores.

Para diseñar los partidores requeridos en la amplificación de *Sle39830*, se tomaron las primeras 20 bases, aproximadamente, desde cada extremo, y se añaden las bases necesarias (según la herramienta *Cleavage Close to the End of DNA Fragments* de *New England Biolabs* (NEB)⁶) para que las enzimas de restricción seleccionadas, HindIII y NdeI, puedan digerir los extremos con el objetivo de permitir la ligación del gen con el plásmido pIJ10257. Se tuvo cuidado con que las enzimas de restricción elegidas no cortaran dentro del gen.

⁶<https://www.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/cleavage-close-to-the-end-of-dna-fragments>

Además, se comprobó que la temperatura de hibridación (T_m) de los partidores *forward* y *reverse* de cada gen sean similares. Este factor se puede manejar mediante el % GC de los partidores, y se puede calcular con la herramienta *Tm calculator* de NEB⁷.

También se debió comprobar que los partidores no forman dímeros consigo mismos ni entre ellos, para lo que se utilizó la herramienta *Multiple Primer Analyzer* de *ThermoFisher scientific*⁸; y finalmente, se simuló el producto de PCR utilizando los partidores diseñados con la plataforma *benchling*⁹.

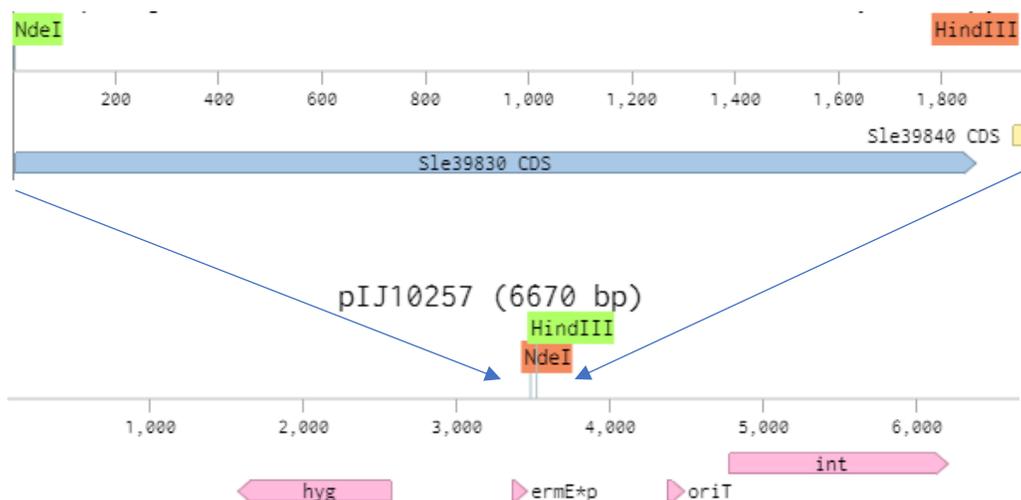


Figura 8: Inserción del gen *Sle39830*, previamente digerido con las enzimas de restricción *NdeI* y *HindIII*, en el plásmido *pIJ10257* previamente digerido con las mismas enzimas.

En la Figura 8, se presenta el diagrama de la inserción del gen *sle39830* rio bajo del promotor *ermE**, en el plásmido *pIJ10257*. Se incluyen los sitios de corte de las enzimas *NdeI* y *HindIII* utilizadas para hacer posible la construcción del plásmido recombinante.

Para el caso del plásmido recombinante *Sle27500 – pIJ12551*, se utilizó el método Gibson assembly debido a que no se cuenta con las enzimas de restricción adecuadas para la digestión eficiente del vector y del gen. Para ello, el plásmido fue linealizado con la enzima *NdeI* y los partidores fueron diseñados para lograr extremos coincidentes entre el plásmido y el inserto. Los partidores diseñados, que se encuentran en la Tabla 11 del anexo 3.2, cuentan con 20 bases del extremo del plásmido y 20 bases del gen.

⁷ <https://tmcalculator.neb.com/#!/main>

⁸ <https://www.thermofisher.com/cl/es/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html>

⁹ <https://benchling.com/>

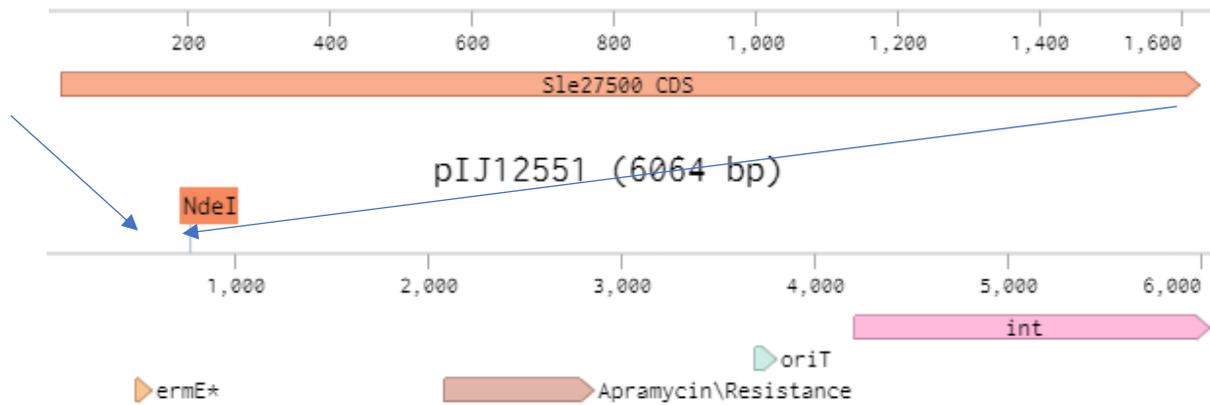


Figura 9: Inserción del gen *Sle27500*, previamente digerido con la enzima de restricción *NdeI*, en el plásmido *pIJ10257* previamente linealizado con la misma enzima, mediante Gibson assembly.

En la Figura 9, se muestra el diagrama de la inserción del gen *sle27500* río abajo del promotor *ermE**, en el plásmido *pIJ12551*. Se incluyen los sitios de corte de la enzima *NdeI*, utilizadas para hacer posible la inserción del gen en el sitio deseado. En ambos casos, los genes fueron insertados río abajo del promotor *ermE**, que es constitutivo para *S. leeuwenhoekii* C34, lo que debiera provocar la expresión continua de los genes *Sle39830* y *Sle27500*. En el anexo 3, se puede encontrar un diagrama de cada plásmido recombinante con su respectivo gen insertado.

Amplificación de genes de interés.

Para obtener un stock de los genes de interés, se realizó la PCR utilizando los pares de partidores diseñados para cada gen según se muestra en la Tabla 11, y el DNA genómico de *S. leeuwenhoekii* C34 como templado de acuerdo con el protocolo 1 del anexo F. Primero, se realizó un gradiente de temperatura, en torno a la T_m calculada, en 10 [μL] para encontrar la temperatura óptima. Luego, se llevó a cabo una PCR definitiva con un mayor volumen a la T_m encontrada. Pueden ser 60 u 80 [μL].

Purificación del producto de PCR

Al finalizar el PCR se purificó el DNA mediante electroforesis en gel de agarosa 1%, utilizando el marcador de peso molecular de 1 kb para identificar los fragmentos de DNA de 1,6 kb para *Sle27500* y 1,86 kb para *Sle39830*, y una corriente de 90 [v] durante aproximadamente 1 hora.

Al terminar la electroforesis, se visualizó el gel utilizando radiación UV en Bio-Rad Gen Doc™ EZ Imager. Luego, se cortó la franja correspondiente al fragmento de interés y se extrajo el DNA del gel siguiendo el protocolo 2 del anexo F, utilizando el kit *GeneJet Gel Extraction Kit* de *thermo scientific*.

Una vez terminada la extracción, se cuantificó el DNA utilizando el espectrofotómetro y agua destilada como blanco. Finalmente, se guardó el DNA a -20 °C.

Extracción y purificación de plásmidos.

Se debe contar con un stock de plásmidos *pIJ12551* y *pIJ10257* para poder realizar las transformaciones. Para ello, éstos fueron extraídos según el protocolo 3 del anexo F,

utilizando el kit *GeneJet Plasmid Miniprep Kit* de *thermo scientific*, a partir de un cultivo *overnight* de *E. coli* DH5 α que contenía cada plásmido.

Una vez extraídos los plásmidos, se debió cuantificar su DNA utilizando el espectrofotómetro y agua destilada como blanco. Finalmente, se guardó el DNA a -20 °C.

Digestión de genes y plásmidos con enzimas de restricción.

Una vez que se contó con una cantidad suficiente del gen *Sle39830* y del plásmido pIJ10257, se digirieron ambos con las enzimas de restricción NdeI y HindIII para su posterior ligación. Este proceso se realizó de acuerdo con el protocolo 4 del anexo F.

Antes de la ligación, se comprobó que las digestiones se llevaron a cabo exitosamente. Para ello, se debió realizar electroforesis con 60 [ng] aprox. de cada fragmento de DNA y observar si se obtuvieron los fragmentos de los tamaños esperados.

Habiendo obtenido los fragmentos esperados en ambos casos, se purificó el DNA de los genes de interés. Si el plásmido presenta digestión parcial, también debe ser purificado a través de electroforesis y extracción a partir de gel. Ambas muestras se deben cuantificar utilizando el espectrofotómetro.

Ligación de genes y plásmidos

Utilizando las muestras de plásmido y gen digeridos y purificados, se calculó la cantidad de cada muestra de acuerdo con la cantidad de DNA de cada fragmento a utilizar en la ligación, según se muestra en el ejemplo de cálculo 1. Luego, se ligaron ambos de acuerdo con el protocolo 5 del anexo F.

Gibson Assembly

Contando con el plásmido pIJ12551 linealizado con la enzima NdeI y con el gen *Sle27500* previamente amplificado con los partidores BZ03g_F y BZ03g_R diseñados para Gibson, cuyas secuencias se muestran en la Tabla 11, se realizó el protocolo 6 del anexo F.

Transformación de *E. coli* DH5 α con ambos plásmidos recombinantes

Generación de bacterias quimio competentes

Para poder llevar a cabo la transformación de *E. coli* DH5 α y *E. coli* ET12567/pUZ8002 con los plásmidos recombinantes, se debe facilitar su incorporación mediante la permeabilización de la membrana de la bacteria, convirtiéndola en quimio competente. Para ello, se hizo un cultivo *overnight* de *E. coli* DH5 α y se realizó el protocolo 7 del anexo F.

Transformación de *E. coli* DH5 α con ambos plásmidos recombinantes por separado

Para contar con una reserva del plásmido recombinante, se realizaron las transformaciones de *E. coli* DH5 α con cada plásmido recombinante, por separado. Para ello, se utilizaron las bacterias quimio competentes preparadas previamente y una alícuota de cada plásmido recombinante (*Sle27500* – pIJ12551 o *Sle39830* - pIJ01257), según el protocolo 8 del anexo F, de manera que éstos queden incorporados a las bacterias.

Las bacterias potencialmente transformadas se hicieron crecer en placas de LB suplementadas con 80 [µg/ml] de higromicina B para *Sle39830* - pIJ10257 y 50 [µg/ml] de apramicina para *Sle27500* – pIJ12551, para seleccionar las *E. coli* DH5α que incorporaron los plásmidos correspondientes. Debido a que la higromicina B es sensible a la luz, se trabajó en oscuridad.

Al finalizar el protocolo 8, se cuenta con placas con bacterias potencialmente transformantes seleccionadas mediante resistencia a antibióticos. A continuación, se hizo una PCR de colonias seleccionando por lo menos 30 colonias potencialmente transformantes correspondientes a cada gen, de acuerdo con el protocolo 9 del anexo F. Se utilizaron los partidores genéricos correspondientes a cada plásmido, es decir, las duplas [GBA02, GBA05] y [GBA03, GBA04] para pIJ10257 y pIJ12551, respectivamente. Las colonias cuyos PCR mostraron las franjas deseadas, pertenecientes a los genes de interés, fueron cultivadas en medio LB y almacenadas en stock de glicerol al 20%, según el protocolo 10 del anexo F.

Al finalizar la transformación de *E. coli* DH5α, fue necesario comprobar que se incorporaron los plásmidos recombinantes correctamente. Para ello, se debió realizar un cultivo *overnight* de 3 clones de cada cepa potencialmente transformada, y se extrajeron sus plásmidos siguiendo el protocolo 3 del anexo F. Luego, se realizaron digestiones de comprobación con enzimas de restricción, como se muestra en la Tabla 2, al DNA plasmidial extraído de las potenciales transformantes, y se evaluó si los fragmentos obtenidos tienen los tamaños esperados.

Tabla 2: Digestiones realizadas para comprobar el éxito de las transformaciones bacterianas. Se muestran de izquierda a derecha los plásmidos recombinantes, las enzimas y buffers utilizados, y el tamaño de los fragmentos que debiera obtenerse con cada digestión.

DNA	Enzimas	Buffer	Tamaño de fragmentos
<i>Sle39830</i> - pIJ10257	HindIII + NdeI	R	1,97 kb + 6,63 kb
<i>Sle39830</i> - pIJ10257	NdeI + EcoRV	R	3,46 kb + 5,14 kb
<i>Sle27500</i> - pIJ12551	XhoI	Cutsmart	1,85 kb + 5,82 kb
<i>Sle27500</i> - pIJ12551	BamHI	3.1	5,72 kb + 1,95 kb

Finalmente, se mandó a secuenciar el DNA plasmidial de los casos exitosos, para comprobar que los genes se hubieran insertado correctamente en los plásmidos.

Segunda etapa: Conjugación de *S. leeuwenhoekii* C34 con *Sle39830* y *Sle27500*

Se debió incorporar los plásmidos recombinantes a *E. coli* ET12567/pUZ8002, ya que dicha cepa posee el plásmido pUZ8002 que facilita la posterior conjugación con *S. leeuwenhoekii* C34. La estrategia utilizada para dicho propósito se ilustra en la Figura 10.

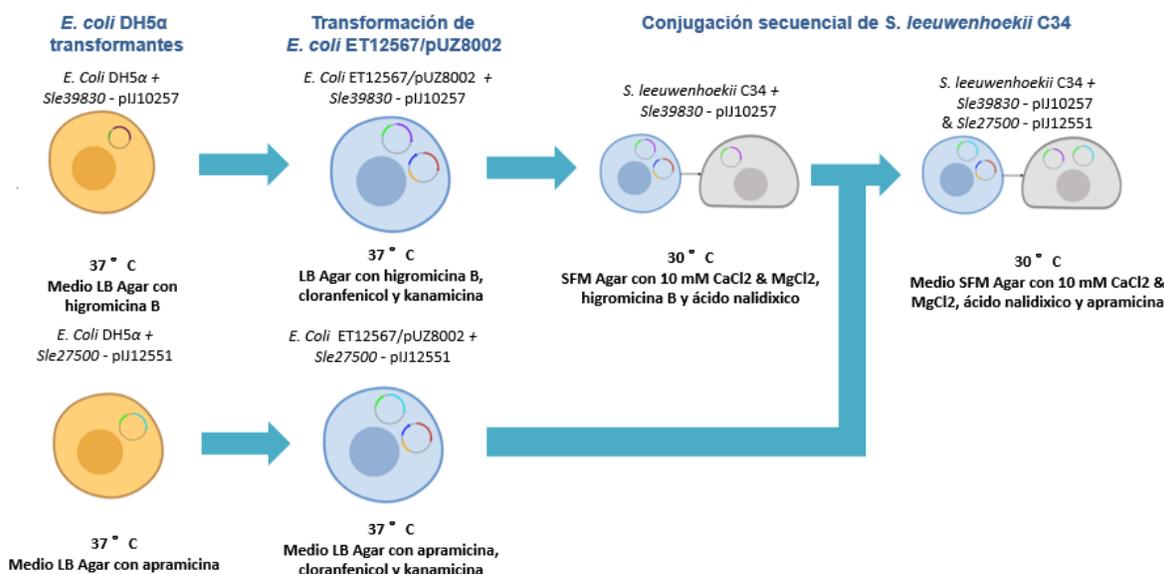


Figura 10: Estrategia utilizada para obtener *S. leeuwenhoekii* C34 conjugante. De izquierda a derecha: Transformación de *E. coli* DH5α, transformación de *E. coli* ET12567/PUZ8002, y conjugación secuencial de *S. leeuwenhoekii* C34 con *Sle39830* y *Sle27500*.

Transformaciones de *E. coli* ET12567/pUZ8002

Se realizó un cultivo overnight con las *E. coli* DH5α transformantes correspondientes a cada gen y se extraen sus plásmidos. Luego de purificarlos y cuantificar su DNA, se realizó la transformación de alícuotas distintas de *E. coli* ET12567/PUZ8002 con cada cepa respectivamente, según el protocolo 8 del anexo F. Las transformantes potenciales fueron cultivadas en el medio LB suplementado con el antibiótico relevante en cada caso, y además, con 50 [µg/ml] de cloranfenicol y kanamicina en ambos casos.

Al finalizar la transformación, se realizó un PCR de colonias tomando 30 colonias por cepa de forma análoga al de la transformación de *E. coli* DH5α, para seleccionar las potenciales transformantes. Dado que *E. coli* ET12567/PUZ8002 cuenta con el plásmido que asiste la conjugación de *S. leeuwenhoekii* C34 además del insertado durante la transformación, no se recomienda extraer DNA plasmidial para intentar secuenciarlo con el propósito de confirmar la transformación, ya que como se cuenta con 2 DNAs plasmidiales, al intentar amplificar por PCR a partir de esa muestra es probable obtener fragmentos no deseados que pueden causar interferencia en la secuenciación.

Conjugación secuencial de *S. leeuwenhoekii* C34.

Una vez comprobado el éxito de la transformación de *E. coli* ET12567/PUZ8002, se cuenta con una cepa de dicho microorganismo que ha incorporado el plásmido recombinante *Sle27500* – pIJ12551 y una cepa que ha incorporado el plásmido recombinante *Sle39830* – pIJ10257.

Como se mencionó anteriormente, estos genes trabajan en conjunto para regular la producción de (S)-2-metilmalonil-CoA a partir de propanoil-CoA. En esta etapa se debe incorporar ambos genes a un mismo espécimen de *S. leeuwenhoekii* C34, por lo que se conjugó *S. leeuwenhoekii* C34 secuencialmente con ambos genes.

Para ello, primero se conjugó *S. leeuwenhoekii* C34 con la cepa de *E. coli* ET12567/PUZ8002 transformada con *Sle39830* siguiendo el protocolo 11 del anexo F. Llamaremos *S. leeuwenhoekii* C34 C1 a esta cepa conjugante.

Se comprobó el éxito de la conjugación por selección con antibióticos y pcr de colonias. No resulta viable realizar extracción de DNA plasmidial, ya que se cuenta con más de un plásmido.

Finalmente, se conjugó *S. leeuwenhoekii* C34 C1 (que posee incorporado el vector *Sle39830* - pIJ10257) con la cepa de *E. coli* ET12567/PUZ8002 transformada con *Sle27500*, obteniendo la nueva cepa *S. leeuwenhoekii* C34 C2 (conjugada con ambos plásmidos).

Nuevamente, se requirió confirmar el éxito de la conjugación mediante selección con antibióticos y PCR de colonias. Sin embargo, debido a la dureza de las colonias de *S. leeuwenhoekii* C34 C2, no fue posible obtener su DNA para el PCR pinchándolas con un mondadientes. Por ello, fue necesario extraer el DNA genómico de la cepa conjugante utilizando el kit *DNeasy® Ultraclean® Microbial* de QIAGEN según se muestra en el protocolo 13 del anexo F, y realizar un PCR utilizando los partidores GBA03 y GBA04. Los partidores GBA tienen su sitio de anclaje en secuencias que están en el plásmido rio arriba del sitio de inserción del gen de interés, pero dichas secuencias no se encuentran en el genoma nativo de *S. leeuwenhoekii* C34. Por ello, si se obtiene un producto de PCR a partir del DNA genómico de la cepa conjugante, es porque las copias de los genes se integraron en el genoma de *S. leeuwenhoekii* C34.

Etapa Final: Comparación de la producción de metabolitos especializados entre *S. leeuwenhoekii* C34 y *S. leeuwenhoekii* C34C2.

Una vez terminada la etapa de modificaciones genéticas, se debió comprobar la efectividad de éstas mediante la comparación del tamaño de los halos de inhibición de crecimiento en los bioensayos contra *M. luteus*, y la comparación de los perfiles metabólicos de la cepa conjugante vs la cepa *wildtype*, como se ilustra en la Figura 11.

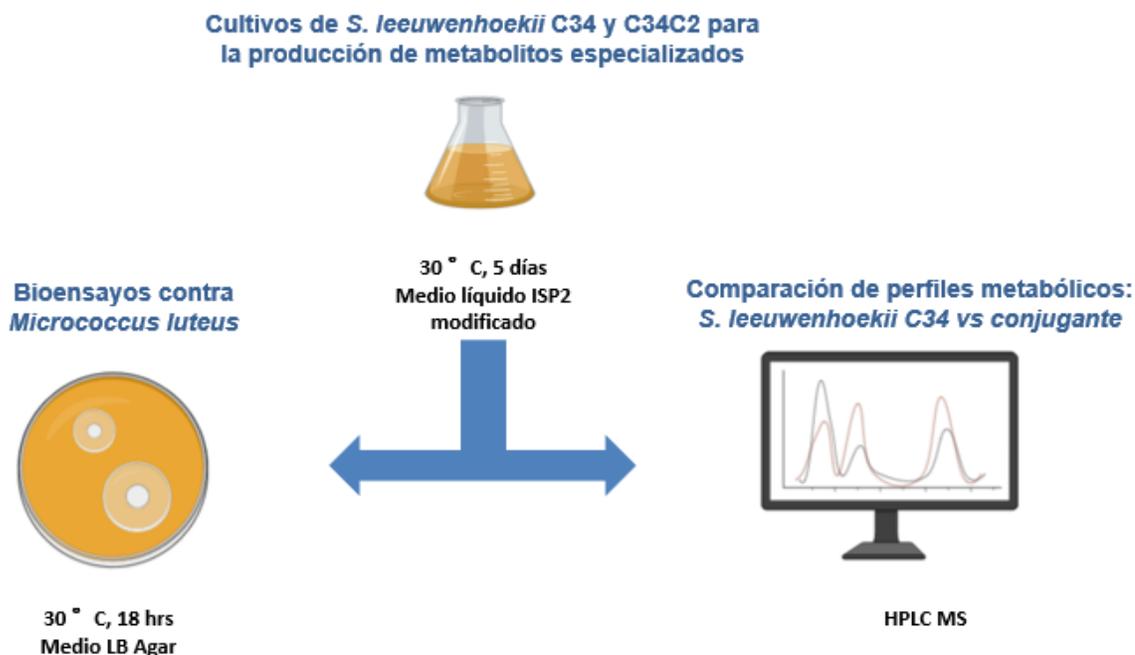


Figura 11: Comparación de la producción de metabolitos especializados en *S. leeuwenhoekii* C34 (*wildtype*) y *S. leeuwenhoekii* C34C2 (*conjugante*), mediante bioensayos y perfiles metabólicos.

Producción de Metabolitos especializados

Cultivo de S. leeuwenhoekii C34.

Se cultivaron paralelamente las cepas de *S. leeuwenhoekii* C34 y C34C2 en medio mISP2 durante 5 días según se indica en el protocolo 12 del anexo F.

Las comparaciones realizadas entre las cepas *wildtype* y conjugante, de bioactividad contra *M. luteus* y de la abundancia de metabolitos especializados en los perfiles metabólicos, se realizaron de forma cualitativa, ya que no se cuenta con muestras puras de chaxamicinas y chaxalactinas para realizar una curva de calibración que permita la cuantificación para ambos métodos.

Bioensayos contra Micrococcus luteus.

Al finalizar el tiempo de cultivo, se extrajeron las proteínas extracelulares presentes en el medio de cultivo agotado mediante el protocolo 13 del anexo F, y se registró el peso seco de cada cultivo de acuerdo con el protocolo 15 del anexo F. Luego, utilizando las muestras de sobrenadante de los cultivos en medio líquido de *S. leeuwenhoekii* C34 y *S. leeuwenhoekii* C34 C2, se realizaron antibiogramas contra *M. luteus* en medio sólido LB

agar según se indica en el protocolo 16 del anexo F. Se midió el halo de inhibición de crecimiento alrededor de los pozos rellenos con 50 [μL] de sobrenadante proveniente de cada cultivo. Como control positivo se utilizó una dilución a 100 μg/ml de carbencilina, y como control negativo, medio LB. Se analizó el tamaño de los halos de inhibición de crecimiento (HIC) normalizados por la densidad de biomasa, *bm* [gDW/L], es decir, los gramos de biomasa producida por litro de cultivo. A este parámetro se llamará RN, y puede ser calculado según la siguiente ecuación:

$$RN = \frac{HIC}{bm} [\text{cm} \cdot \text{gDW} - 1 \cdot \text{L} - 1]$$

Análisis de perfiles metabólicos.

Los extractos de proteínas extracelulares e intracelulares obtenidos a partir del medio de cultivo de ambas cepas de *S. leeuwenhoekii* C34 se enviaron al laboratorio de la unidad de secuenciación y técnicas ómicas (USTO) de la Pontificia Universidad Católica de Chile¹⁰ para su análisis mediante HPLC MS/MS, utilizando un espectrómetro Compact QTOF MS + Elute UHPLC en ionización negativa. Para ello, se separan los componentes del medio de cultivo según sus tiempos de retención en la columna cromatográfica. Luego, se obtienen las relaciones de *m/z* de los compuestos encontrados en las distintas fracciones, que posteriormente son fragmentados para lograr una identificación más certera mediante sus patrones de fragmentación. Los patrones de fragmentación obtenidos para los potenciales compuestos de interés son comparados con los patrones de fragmentación encontrados en otros estudios, correspondientes a dichos metabolitos, los que se muestran en el anexo B.

En la etapa de cromatografía, la separación se realizó con una columna Kinetex 1.7u C18 de 2.1mmx100mm. Para la metabolómica, se utilizaron como solventes la solución A (agua + 0.1% ácido fórmico) y la solución B (acetonitrilo + 0.1% ácido fórmico), a un flujo de 400 μL/min.

Para la identificación de las chaxamicinas y chaxalactinas, se utilizaron los valores de las razones *m/z* de las chaxamicinas y chaxalactinas, expuestos en la Tabla 4 del anexo B, junto con los patrones de fragmentación de los compuestos para asegurar su identidad[24][25], expuestos en la Figura 26. Para el análisis de datos se utilizó el software *Compass DataAnalysis 4.4* de Bruker¹¹.

Finalmente, se comparó la abundancia de dichos compuestos en las muestras provenientes de ambas cepas para determinar el efecto de la sobreexpresión de genes realizadas, sobre la producción de chaxamicinas y chaxalactinas.

¹⁰ Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile.
<https://biologia.uc.cl/quienes-somos/plataformas/secuenciacion-y-tecnologias-omicas/>

¹¹ <https://bruker-compass-dataanalysis.updatestar.com/en>

3. Resultados y Discusión

Selección de genes para aumentar la producción de metabolitos intermediarios

Los genes *sle39830* y *sle27500* fueron seleccionados para ser sobreexpresados con el propósito de provocar un aumento en la producción de chaxamicinas y chaxalactinas. Como se mencionó anteriormente, *sle39830* y *sle27500* codifican, respectivamente, para las cadenas alfa y beta de la enzima propanoil-CoA carboxilasa, que cataliza la reacción de producción del precursor clave (S)-2-metilmalonil-CoA.

Generación de un reservorio biológico de los plásmidos recombinantes

Los genes *sle39830* y *sle27500* fueron amplificados exitosamente mediante PCR, utilizando los partidores mostrados en el anexo 3 2: BZ01_F y BZ01_R, y BZ03g_F y BZ03g_R, respectivamente diseñados para *sle39830* y *sle27500*. Luego, *sle39830* fue ligado al plásmido pIJ10257, previamente linealizado, utilizando T4 ligasa. *Sle27500* fue insertado en pIJ12551 mediante Gibson assembly. De esta forma, se obtuvieron los plásmidos recombinantes *sle39830*-pIJ10257 y *sle27500*-pIJ12551.

El ensamblaje exitoso de ambos plásmidos recombinantes fue confirmado mediante PCR, obteniendo amplificaciones con los tamaños esperados para cada caso. Adicionalmente, la digestión de los plásmidos recombinantes con distintos pares de enzimas de restricción produjo fragmentos de los tamaños esperados, mostrados anteriormente en la Tabla 2.

A continuación, con cada plásmido recombinante se transformó un set de *E. coli* DH5 α quimio competentes. Aprovechando los genes de resistencia a antibióticos de cada plásmido recombinante, las cepas potencialmente transformadas fueron incubadas en presencia de 80 [μ g/ml] de higromicina B en el caso de *sle39830*-pIJ10257, teniendo la precaución de no exponer los cultivos a luz por la sensibilidad del antibiótico, y en presencia de 50 [μ g/ml] de apramicina para *sle27500*-pIJ12551 para seleccionar las bacterias que habían incorporado los genes de interés. Luego, se realizó PCR de colonias utilizando los partidores GBA, que alinean en el plásmido afuera del sitio de clonamiento múltiple según se muestra en la Tabla 6, para identificar las bacterias que habían incorporado cada gen correspondiente según se muestra en la Figura 12.

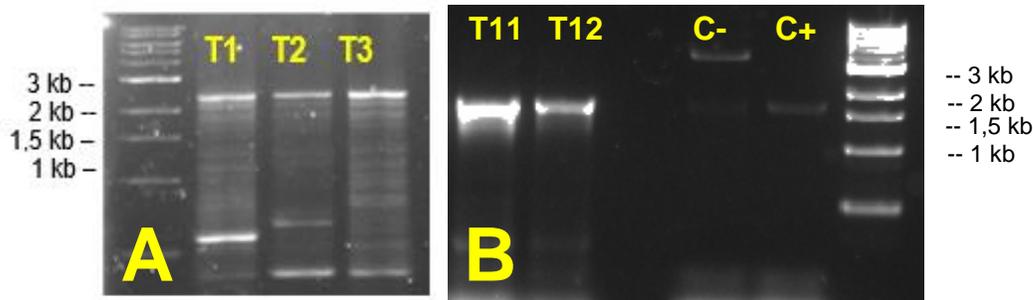


Figura 12: Electroforesis del PCR de colonias de *E. coli* DH5 α transformada con *sle39830-pIJ10257*(A), con el marcador de peso molecular de 1kb a la izquierda y 3 potenciales transformantes en el resto de los carriles (T1, T2 y T3). En B, se muestra el PCR de colonias de *E. coli* DH5 α transformada con *Sle27500-pIJ12551* (B), con dos posibles transformantes en los carriles de la izquierda (T11 y T12), el control negativo (C-) y positivo (C+), y el marcador de peso molecular de 1kb a la derecha.

En la Figura 12 A se muestra en electroforesis el PCR de colonias de *E. coli* DH5 α *sle39830-pIJ10257* y en la imagen B se muestra el PCR de colonias de *E. coli* DH5 α *sle27500-pIJ12551*. Dado que se utilizaron los partidores GBA, se esperaba obtener un fragmento de 2,3 kb y 2,08 kb, respectivamente.

En la Figura 12 B, se observa que carril del control negativo del PCR de colonias de *E. coli* DH5 α , transformada con *Sle27500-pIJ12551*, presenta bandas que podrían deberse a contaminación del tubo con DNA externo, ya que no poseen el tamaño del fragmento que deberían amplificar los partidores utilizados ni está presente en los carriles de las otras reacciones de PCR. Se decidió continuar con los pasos siguientes de confirmación y ver si las bandas encontradas para las potenciales transformantes correspondían efectivamente al gen de interés, ya que los carriles con producto de PCR de las posibles colonias transformantes presentaban la banda deseada. Si las confirmaciones por digestiones alternativas y secuenciación no entregaban un resultado positivo, habría que repetir la transformación.

Finalmente, se extrajo DNA plasmidial de un clon de cada cepa y, tras confirmar con las digestiones de comprobación de la Tabla 2, se mandó a secuenciar el DNA para confirmar que las potenciales transformantes habían incorporado el plásmido recombinante correspondiente correctamente.

Los resultados de la secuenciación fueron analizados utilizando el software *Staden package* [46][47], y pueden encontrarse los más relevantes en el anexo H. Con este análisis se determinó que las secuencias entregadas por la secuenciación corresponden a las secuencias esperadas para ambos plásmidos recombinantes.

Una vez confirmadas ambas transformaciones, se cuenta con una cepa de *E. coli* DH5 α que ha incorporado *sle39830-pIJ10257*, y una que ha incorporado *sle27500-pIJ12551*, denominadas *E. coli* DH5 α p1 y *E. coli* DH5 α p3 respectivamente.

Conjugación de *S. leeuwenhoekii* C34 con *Sle39830* y *Sle27500*

Transformación de *E. coli* ET12567/pUZ8002

Se extrajo DNA plasmidial de las cepas transformantes denominadas *E. coli* DH5 α p1 y *E. coli* DH5 α p3, y se realizó la transformación de un set de *E. coli* ET12567/pUZ8002 quimiocompetentes con el DNA plasmidial de cada plásmido recombinante. Las bacterias potencialmente transformantes se incubaron en presencia de cloranfenicol, kanamicina y el antibiótico relevante para cada vector, según se describe en la sección de metodología. Luego, se realizó PCR de colonias a 30 clones de cada cepa, y las que fueron confirmadas como transformantes por presentar las bandas de los tamaños esperados en la electroforesis fueron preservadas en stock de glicerol.

Al igual que para las transformaciones de *E. coli* DH5 α , se obtuvieron los fragmentos correspondientes a amplificar con los partidores GBA, de 2,3 kb y 2 kb para *E. coli* ET12567/PUZ8002 transformada con *sle39830*-pIJ10257, y para *E. coli* ET12567/PUZ8002 transformada con *Sle27500*-pIJ12551, respectivamente.

Conjugación de *S. leeuwenhoekii* C34 con *E. coli* ET12567/PUZ8002 *sle39830*-pIJ10257 y *E. coli* ET12567/PUZ8002 *Sle27500*-pIJ12551

Se realizó la conjugación de *S. leeuwenhoekii* C34 con *E. coli* ET12567/PUZ8002 *sle39830*-pIJ10257 según indica el protocolo 11 del anexo F, incubando las bacterias resultantes en agar SFM con una cubierta de ácido nalidíxico e higromicina B, y luego confirmando por PCR de colonias utilizando los partidores GBA 2 y 5, es decir, específicos para el plásmido pIJ10257. Tras obtener confirmación de la conjugación se realizó un stock de esporas en glicerol de la cepa conjugante denominada *S. leeuwenhoekii* C34 C1, y se realizó un conteo de esporas.

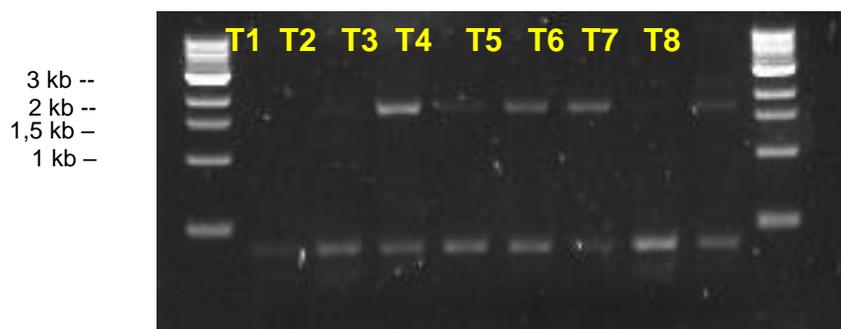


Figura 13: Electroforesis del PCR de colonias de las potenciales *S. leeuwenhoekii* C34 conjugadas con *E. coli* ET12567/PUZ8002 *Sle39830*-pIJ10257. Los controles fueron corridos en otro gel junto con el resto de los PCR de colonias, pero la foto no se encuentra disponible. Todos los canales contienen producto del PCR de distintas colonias (T1-18).

En la Figura 13 se ven nuevamente en la electroforesis las bandas esperadas de 2,3 kb obtenidas en el PCR de colonias de las potenciales *S. leeuwenhoekii* C34 conjugantes, utilizando los partidores GBA. Cabe mencionar que no se cuenta con una foto de los controles, ya que estos fueron corridos en otro gel junto con el resto de los PCR de colonias, pero la foto no se encuentra disponible. Debido a que no todas las colonias presentan la banda deseada como se aprecia en el segundo carril desde la izquierda, se

descarta que la amplificación se deba a contaminación en los reactivos de PCR, ya que para realizar el PCR de colonias se hace un mastermix con los reactivos, luego se divide en partes iguales de 10 [μL], y finalmente se agrega el DNA. Es decir, si hubiera contaminación, todos los carriles deberían presentar bandas.

A continuación, se realiza la conjugación de *S. leeuwenhoekii* C34 C1 con *E. coli* ET12567/PUZ8002 p3 según el protocolo 11 del anexo F. Las bacterias resultantes se hacen crecer en ácido nalidíxico y apramicina para seleccionar las posibles conjugantes, y luego se hizo PCR de colonias utilizando los partidores GBA 3 y 4 específicos para el plásmido pJ12551. Se realizó un stock de esporas de un clon de las conjugantes confirmadas para su preservación, y se realizó un conteo de esporas. Las *S. leeuwenhoekii* C34 C1 que fueron conjugadas con *E. coli* ET12567/PUZ8002 Sle27500-pJ12551 se llamaron *S. leeuwenhoekii* C34 C2.

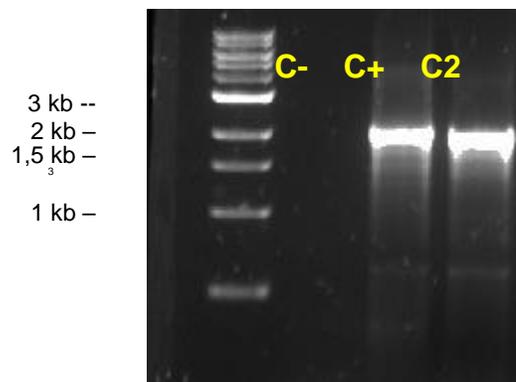


Figura 14: Electroforesis del PCR de una de las potenciales *S. leeuwenhoekii* C34 C2 conjugadas con *E. coli* ET12567/PUZ8002 Sle27500-pJ12551. En el carril de la izquierda se encuentra el marcador de peso molecular 1 kb, luego, el control negativo (C-), el control positivo (C+, producto de PCR del plásmido recombinante sle27500-pJ12551), y finalmente, la amplificación de Sle27500 a partir del gDNA de *S. leeuwenhoekii* C34 C2 utilizando los partidores GBA.

En la Figura 14 se observa el resultado de la electroforesis del PCR realizado a partir del DNA genómico de *S. leeuwenhoekii* C34 C2 utilizando los partidores GBA 3 y 4. Se intentó repetidas veces realizar el PCR de colonias, pero no fue posible picar las colonias con mondadientes, ya que éstas resultaron ser inusualmente duras. Por lo anterior, fue necesario utilizar el kit *DNeasy® Ultraclean® Microbial Kit* de QIAGEN para extraer el DNA genómico del microorganismo y poder hacer la comprobación.

Es sumamente importante utilizar los partidores GBA para los PCR de colonias en *S. leeuwenhoekii* C34 y no los desarrollados en este trabajo, ya que como se explicó anteriormente, los primeros poseen su sitio de anclaje río arriba del sitio de inserción de los genes de interés en el plásmido, y las secuencias de dichos sitios de anclaje no existen en el genoma nativo de *S. leeuwenhoekii* C34. Debido a esto, si se realiza un PCR a partir del genoma de *S. leeuwenhoekii* C34 C2 utilizando los partidores GBA, el único producto de PCR posible corresponde a las copias de los genes de interés provenientes de los plásmidos utilizados en este trabajo. Es decir, si se utilizan los partidores GBA para realizar un PCR a partir del DNA genómico de *S. leeuwenhoekii* C34 C2 y se obtiene un producto de PCR del tamaño esperado, se confirma el éxito de la

inserción de las copias de los genes de interés, junto con el promotor constitutivo ermE*, en el genoma de *S. leeuwenhoekii* C34. Los partidores BZ, desarrollados en este trabajo, amplificarían los genes *sle39830* y *sle27500* desde sus copias originales en el genoma de la bacteria, por lo que no sirven para comprobar la inserción de las copias nuevas de dichos genes.

Comparación de la producción de metabolitos especializados entre *S. leeuwenhoekii* C34 y *S. leeuwenhoekii* C34 C2.

Se realizaron cultivos en triplicado de *S. leeuwenhoekii* C34 y *S. leeuwenhoekii* C34 C2 en medio mISP2, como se indica en el protocolo 12 del anexo F, para poder comparar el efecto de la sobreexpresión realizada, sobre la producción de chaxamicinas y chaxalactinas. Se centrifugó cada cultivo para obtener muestras de sobrenadante, para realizar los antibiogramas contra *M. luteus* y para el análisis de perfil metabólico extracelular. Adicionalmente, se realizó un extracto metanólico de los *pellets* para el análisis de perfil metabólico intracelular. Para más detalles sobre la extracción de metabolitos extracelulares e intracelulares para el análisis de perfil metabólico, consultar el protocolo 13 del anexo F.

Análisis de la actividad antibiótica contra *M. luteus* obtenida para cada cepa de *S. leeuwenhoekii*

Utilizando las muestras de sobrenadante de los cultivos en medio líquido de *S. leeuwenhoekii* C34 y *S. leeuwenhoekii* C34 C2, se realizaron antibiogramas contra *M. luteus* en medio sólido LB agar según se indica en el protocolo 16 del anexo F, y se registró el diámetro del halo de inhibición de crecimiento de *M. luteus*.

Como se puede observar en el Gráfico 1, se obtuvieron halos de inhibición de crecimiento similares para ambas cepas, con valores promedio de 3,3 y 3,45 [cm] para *S. leeuwenhoekii* C34 C2 y *S. leeuwenhoekii* C34, respectivamente.

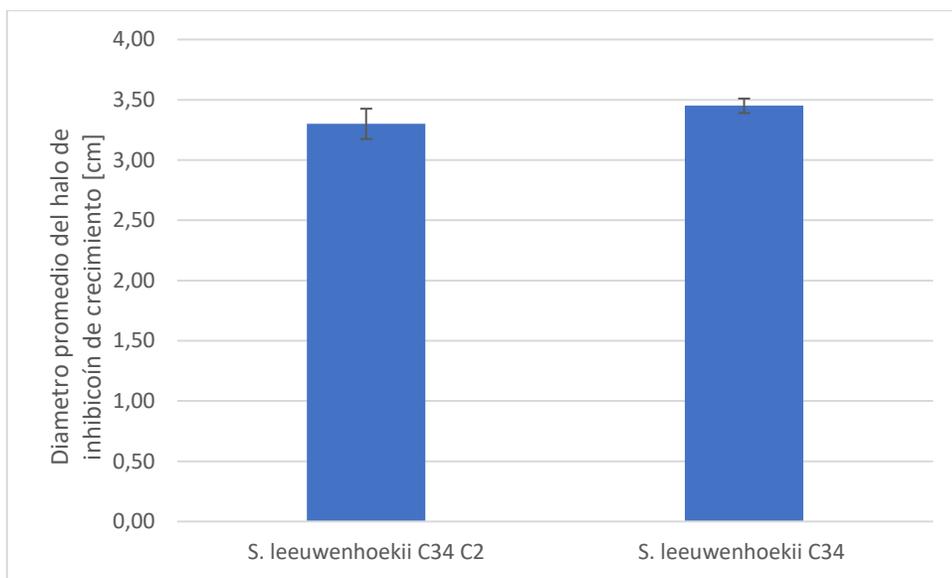


Gráfico 1: Bioactividad contra *M. luteus* producida por el sobrenadante de los cultivos en medio líquido de *S. leeuwenhoekii* C34 C2 y *S. leeuwenhoekii* C34. La bioactividad es representada cualitativamente por medio del diámetro promedio del halo de inhibición de crecimiento, alrededor de pozos con 50 [uL] de sobrenadante del cultivo de cada cepa, generado en cultivos de *M. luteus* en medio sólido de agar LB. Se trabajó con tres réplicas por cada cepa, y se incluye la desviación estándar de los datos en forma de barras de error.

El tamaño del halo de inhibición de crecimiento es un 4,5% mayor para *S. leeuwenhoekii* C34 en comparación con la versión genéticamente modificada, *S. leeuwenhoekii* C34 C2. Dada la desviación estándar, se realizó una prueba de hipótesis para determinar la significancia de la diferencia entre los promedios obtenidos entre ambas cepas, siguiendo el procedimiento mostrado en el anexo 6 2. Se utilizó como hipótesis nula que la diferencia entre la bioactividad contra *M. luteus* producida por ambas cepas era menor que $\delta = 4,5\%$ de la mayor, y como hipótesis de rechazo que dicha diferencia era mayor o igual, nuevamente, al 4,5% de la mayor. Los resultados de la prueba de hipótesis (no se muestran) indican con un 99,99% de confianza que la diferencia de bioactividad contra *M. luteus* producida por ambas cepas es menor al 4,5% de la mayor, aceptando la hipótesis nula.

Se repitió la prueba de hipótesis recién mencionada utilizando $\delta = 1\%$, y se aprobó la hipótesis nula con 95% de confianza. Es decir, se tiene un 95% de confianza en que la diferencia de los promedios de los halos de inhibición de crecimiento de ambas cepas es menor que un 1%, por lo que no es significativa.

Este resultado no se condice con las expectativas de una mayor producción de antibióticos para la cepa conjugante, que en teoría posee sobreexpresados genes que median la producción de metabolitos precursores de chaxamicinas y chaxalactinas. Una mayor concentración de metabolitos especializados debería generar un halo de inhibición de crecimiento contra *M. luteus* mayor que el generado por la cepa *wildtype*. Las posibles causas de este resultado se discuten en la sección de factores que afectan la producción de proteínas recombinantes y en la sección de análisis de rutas metabólicas.

Comparación del crecimiento de los cultivos de cada cepa de *S. leeuwenhoekii*

A continuación, se presenta el gráfico obtenido de la medición de peso seco de cada cultivo, de acuerdo con el protocolo 15 del anexo F, normalizado por el volumen del medio antes de centrifugar. El resultado de esa razón es la concentración de biomasa en el cultivo.

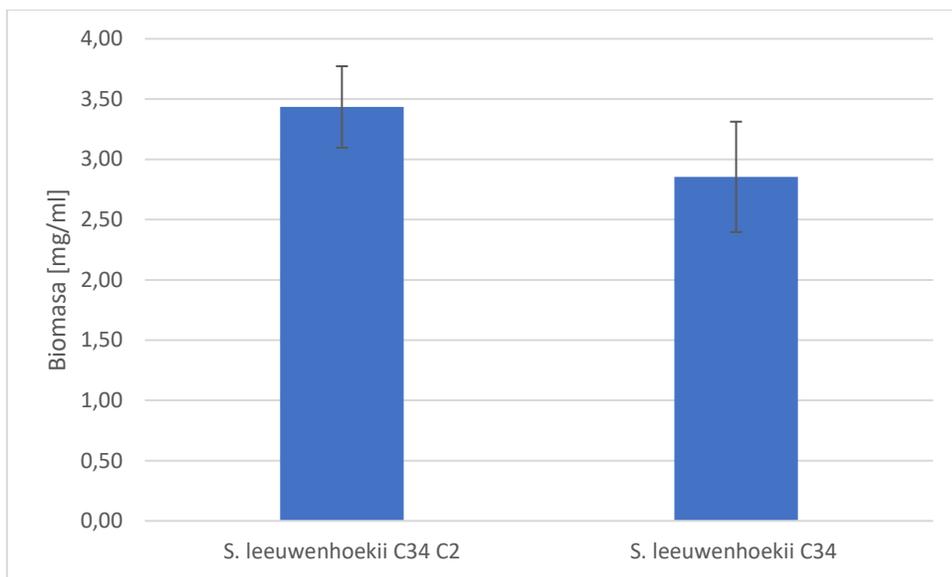


Gráfico 2: Biomasa obtenida para *S. leeuwenhoekii* C34 C2 y *S. leeuwenhoekii* C34, mediante la medición de peso seco de los pellets de cada cultivo, normalizado por el volumen de cultivo [ml]. Se muestra el promedio de los valores obtenidos para los cultivos en triplicado de cada cepa, y se incluye la desviación estándar de los datos en forma de barras de error.

Si bien se muestra en el Gráfico 2 que, en promedio, la cepa conjugante presentó un crecimiento 20,3% mayor que *S. leeuwenhoekii* C34, la desviación estándar de los datos mostrada en el gráfico no es despreciable al compararla con la diferencia de los promedios, por lo que se realizó el análisis estadístico mostrado a continuación:

Para determinar la confianza que se puede tener en las diferencias de crecimiento encontradas entre ambas cepas, se realizó la prueba de hipótesis para diferencias de medias según se muestra en el ejemplo de cálculo 2 del anexo G. Como hipótesis nula, se utilizó que la diferencia entre los promedios de crecimiento de los cultivos de ambas cepas no era mayor que diferencias arbitrarias de 5% y 10% (0,14 [mg] y 0,285 [mg]) del crecimiento obtenido por *S. leeuwenhoekii* C34. Se consideró que, si la diferencia entre ambas era menor del 5%, entonces no era relevante. Como hipótesis de rechazo se utilizó que la diferencia de crecimiento de cultivo para ambas cepas era mayor que el 5% o 10% mencionados anteriormente, considerando arbitrariamente que una diferencia mayor al 5% se puede considerar relevante.

En la Tabla 20, debajo del ejemplo de cálculo 2 del anexo G, se resumen los resultados de la prueba de hipótesis recién mencionada. La conclusión de la prueba fue que con un 95% de confianza, se puede afirmar que la diferencia entre la producción de biomasa

obtenida para *S. leeuwenhoekii* C34 y *S. leeuwenhoekii* C34 C2 es menor al 5% de la producción de biomasa de *S. leeuwenhoekii* C34 (0,1425 [mg/ml]). En otras palabras, con el número actual de réplicas de cada cultivo (3) se tiene un 95% de certeza de que el crecimiento alcanzado por la cepa conjugante no supera por más de 5% al alcanzado por la cepa *wildtype* y, por lo tanto, la diferencia no es significativa bajo estas condiciones.

Por otro lado, como se mencionó anteriormente, se trabajó en triplicado, por lo que el tamaño de cada muestra, n , es 3. Esto es relevante para el análisis estadístico, ya que mientras mayor es el tamaño de cada muestra, más confiable es el promedio de los datos, y se esperaría que la dispersión en los datos no cambie significativamente al aumentar n . Aumentando el número de datos para cada muestra, y si la desviación estándar no cambia significativamente al hacerlo, se puede llevar a cabo el siguiente análisis:

Se realizó la misma prueba de hipótesis, pero aumentando teóricamente el número de réplicas (n), bajo el supuesto de que la dispersión de los datos no cambia al aumentar n . Se determinó con 95% de confianza que la diferencia entre los promedios del crecimiento de ambas cepas era mayor que 0,1425 [mg/ml] (5% de la concentración de biomasa obtenida para *S. leeuwenhoekii* C34) para números de réplicas por cepa mayores o iguales a 6, y que la diferencia era mayor a 0,285 [mg/ml] (10% de la concentración de biomasa obtenida para *S. leeuwenhoekii* C34) para números de muestras mayores o iguales a 12. Si se sigue aumentando el número de réplicas por cultivo, se podría asegurar (siempre que la desviación estándar no varíe significativamente) que la diferencia de crecimiento entre ambas cepas es cada vez mayor, acercándose asintóticamente al 20% que indican los promedios.

Resumiendo, en teoría y siempre que la dispersión de datos no varíe significativamente, al aumentar el número de réplicas de cada cultivo hasta 12, se debería tener certeza (con un 95% de confianza) de que se tiene un crecimiento 10% mayor para la cepa genéticamente modificada. Esta diferencia se considera significativa y como se intentará explicar en la sección de análisis de rutas metabólicas, este efecto podría deberse a la ubicuidad de la reacción de producción de (S)-2-metilmalonil-CoA en el metabolismo de *S. leeuwenhoekii* C34. Si al aumentar el número de réplicas por cultivo la varianza no se mantiene homogénea, se mantendría la situación actual. Es decir, no se podría asegurar que existe una diferencia significativa para el crecimiento de los cultivos de ambas cepas.

Se enfatiza que se aumentó solo de forma teórica el número de réplicas, y que con los datos actuales, no se puede afirmar que existe una diferencia significativa de crecimiento entre ambas cepas. De todas formas, no se observan indicios de un decrecimiento en la viabilidad del cultivo, lo que conllevaría una menor concentración de biomasa, que podría haber sido una consecuencia del posible estrés metabólico asociado a insertar las copias adicionales de los genes bajo un promotor constitutivo del microorganismo.

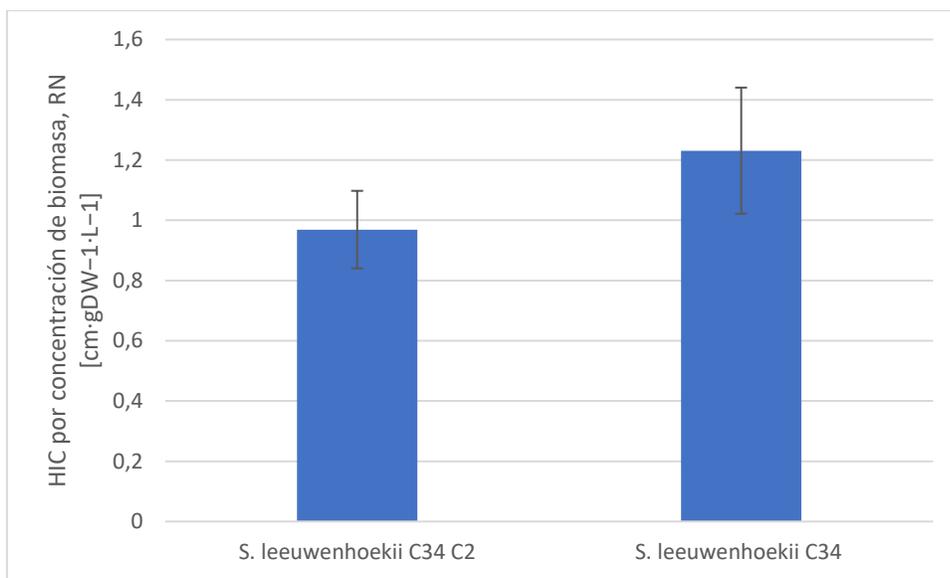


Gráfico 3: Diámetro promedio del halo de inhibición de crecimiento de *M. luteus*, normalizado por la concentración de biomasa del cultivo (RN) correspondiente de *S. leeuwenhoekii* C34

En el Gráfico 3, se aprecia el halo de inhibición de crecimiento (HIC) de *M. luteus* en presencia del sobrenadante [cm] del medio de cultivo de cada cepa de *S. leeuwenhoekii* C34, normalizado por la biomasa [mg/ml] obtenida por la cepa correspondiente. Se observa que, en promedio, *S. leeuwenhoekii* C34 produjo un HIC de mayor tamaño que su versión genéticamente modificada, superándola en un 27%. Sin embargo, hay que tener en cuenta la desviación estándar de los datos, que podría cubrir en cierta medida la diferencia entre ambas cepas, por lo que en estas condiciones no se puede afirmar con certeza que existe una diferencia entre los dos casos.

Se realizó la prueba de hipótesis para diferencias de medias de forma análoga a la realizada para el crecimiento de *S. leeuwenhoekii* C34 y su versión genéticamente modificada, utilizando como hipótesis nula que la diferencia entre el HIC producido por cada cepa, y normalizado por la biomasa [mg/ml], era menor que δ . Como hipótesis de rechazo, se utilizó que la diferencia recién mencionada era mayor que delta.

Los resultados de este análisis estadístico, exhibidos en la Tabla 21 del anexo 6 2, muestran que, trabajando con 6 o 10 réplicas, se puede afirmar con 95% de confianza, siempre y cuando la dispersión de los datos no varíe significativamente, que *S. leeuwenhoekii* C34 produce, respectivamente, un halo de inhibición de crecimiento [cm] por unidad de concentración de biomasa [mg/ml] al menos un 5% o 10% más de grande que su versión genéticamente modificada. Lo anterior indica que, en promedio, cada célula de *S. leeuwenhoekii* C34 produce más metabolitos especializados que sus contrapartes genéticamente modificadas.

Se reitera que la validez del análisis estadístico depende de que, al aumentar el número de réplicas, la varianza de los datos no cambie significativamente. Si esa condición no se cumple en la práctica, no se puede afirmar que existen diferencias significativas para crecimiento o producción de halos de inhibición de crecimiento (referencia indirecta de la producción de metabolitos especializados) entre ambas cepas.

Comparación de diferencias en abundancia de metabolitos especializados mediante el análisis de perfiles metabólicos

Se realizó la extracción de proteínas extracelulares e intracelulares, para cada cultivo según se describe en el protocolo 13 del anexo F. Los extractos extracelulares e intracelulares, respectivamente obtenidos en el sobrenadante del medio de cultivo y en el extracto metanólico del *pellet* celular, fueron enviados al laboratorio de la unidad de secuenciación y técnicas ómicas (USTO) de la Pontificia Universidad Católica de Chile¹² para su análisis mediante HPLC MS/MS. Se procesaron los resultados utilizando el software Compass DataAnalysis 4.4, mencionado en la sección de metodología, y se obtuvieron los gráficos mostrados en esta sección, que corresponden a los *extracted ion chromatograms*, o EIC por sus siglas en inglés, de las chaxamicinas y chaxalactinas.

Como se mencionó anteriormente en la sección de metodología, los patrones de fragmentación son utilizados para determinar si un compuesto encontrado en una fracción del cromatograma, y que posee la *m/z* correspondiente a la molécula de interés, corresponde realmente al compuesto que se está intentando encontrar. En el anexo B, se encuentran los patrones de fragmentación de los potenciales candidatos para chaxamicinas y chaxalactinas obtenidos en este estudio, junto con los correspondientes a dichos metabolitos obtenidos de bibliografía, que fueron utilizados para la identificación.

Cabe mencionar que a través de los datos obtenidos a partir de la técnica HPLC MS/MS se pudo determinar la presencia o ausencia de metabolitos e identificarlos, pero no fue posible cuantificarlos, ya que no se cuenta con muestras puras de chaxamicinas y chaxalactinas para utilizar como estándares internos. Debido a esto, la intensidad de los *peaks* en los EIC, correspondientes a las *m/z* de las chaxamicinas, solamente puede ser usada como una medida cualitativa de la abundancia relativa de los compuestos en cuestión.

Con el objetivo de mejorar la representatividad de los cromatogramas de cada muestra perteneciente a cada cepa, se seleccionaron los cultivos de cada triplicado cuyos valores resultaron ser los más similares a los valores promedio de los triplicados correspondientes. Si bien se cuenta con una desviación estándar no despreciable para la abundancia de algunos metabolitos entre algunos miembros del mismo triplicado (como se puede ver en la Tabla 22 para chaxamicinas y en la Tabla 23 para chaxalactinas, ambas en el anexo I), se incluyen solamente los gráficos de los cultivos seleccionados para facilitar la comparación visual entre cepas.

Se desconoce la causa de los elevados valores de desviación estándar obtenidos para los datos, pero entre los posibles factores causantes, podría incluirse la variabilidad inherente asociada a trabajar con microorganismos vivos, ya que estos no siempre se comportan de la misma manera. También, puede que se deban a potenciales errores de manipulación durante la preparación de los cultivos. En cada sección, se incluye un

¹² Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile.
<https://biologia.uc.cl/quienes-somos/plataformas/secuenciacion-y-tecnologias-omicas/>

análisis estadístico para determinar la relevancia de las diferencias entre los promedios de los datos obtenidos para cada cepa, dadas las desviaciones estándar obtenidas.

Comparación de la abundancia de Chaxamicinas entre *S. leeuwenhoekii* C34 y *S. leeuwenhoekii* C34 C2

A continuación, se muestran los EIC correspondientes a las chaxamicinas A, B, C, y D, obtenidos de las muestras de sobrenadante y de extracto metanólico del *pellet* celular de los cultivos de *S. leeuwenhoekii* C34 y *S. leeuwenhoekii* C34 C2. La identidad de estos metabolitos especializados fue confirmada mediante la comparación de sus patrones de fragmentación con los reportados en otros estudios anteriores, presentados en la Figura 26 del anexo B.

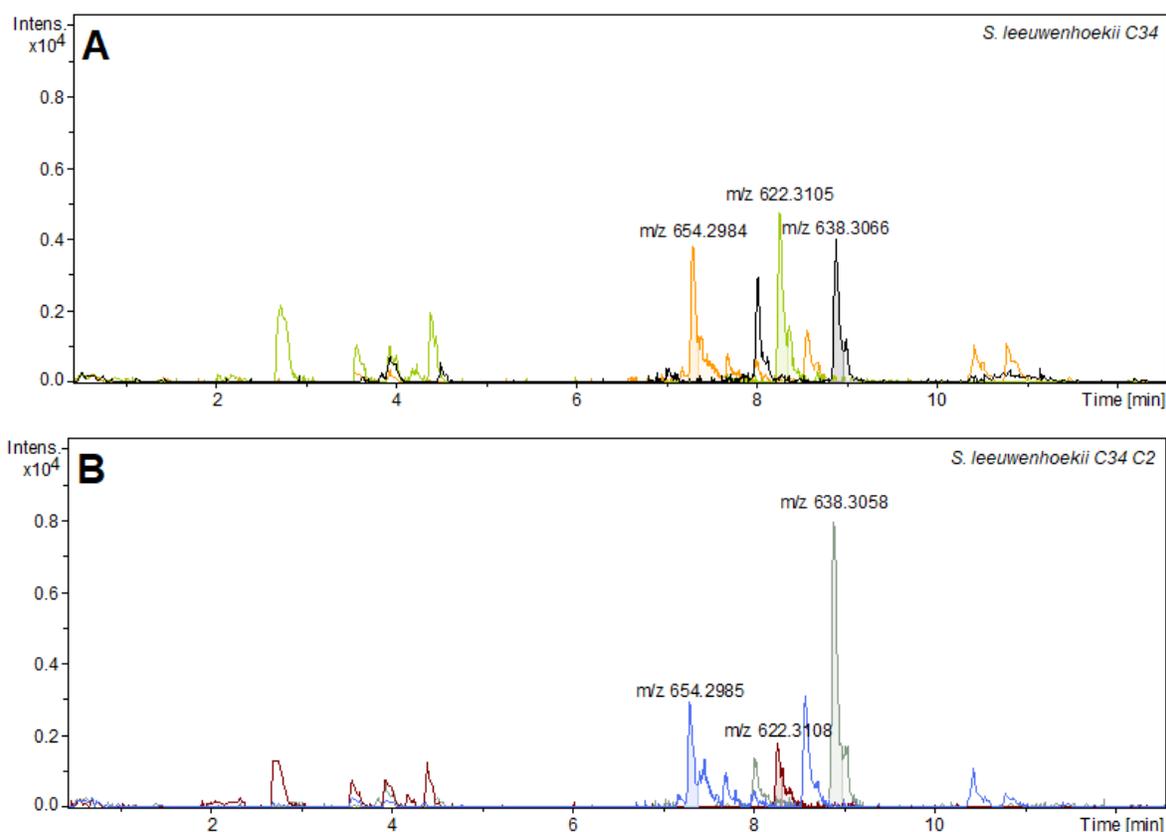


Figura 15: EICs de chaxamicinas A, B y C (m/z 638,3050, m/z 622,3108, y m/z 654,2985, respectivamente), para las muestras de extracto metanólico del *pellet* del medio de cultivo de *S. leeuwenhoekii* C34 (A) y *S. leeuwenhoekii* C34 C2 (B).

En la Figura 15, se muestran los EIC para las fórmulas químicas de las chaxamicinas A, B y C ($C_{35}H_{45}N_1O_{10}$, $C_{35}H_{45}N_1O_9$ y $C_{35}H_{45}N_1O_{11}$, respectivamente) generados a partir de las muestras provenientes del extracto metanólico del *pellet* de los cultivos de las cepas de *S. leeuwenhoekii* C34 *wildtype* (A) y conjugante (B), que presentaron resultados más cercanos al promedio de los triplicados.

Se puede observar la presencia de las chaxamicinas A, B y C en el extracto metanólico de ambas cepas, contando con una abundancia de chaxamicinas B y C (m/z 622,31 y m/z 654,29, respectivamente) ligeramente mayor en la cepa *wildtype*, y una abundancia

de chaxamicina A (m/z 638,29) para la cepa conjugante aproximadamente del doble de la exhibida por la cepa *wildtype*.

Sin embargo, los EICs mostrados corresponden a los que más se asemejan al promedio de cada cepa, y para el caso de chaxamicina A, uno de los cultivos de C34 obtuvo una abundancia en el sobrenadante del doble de los otros, y para la cepa conjugante uno de los cultivos mostró una abundancia de un tercio del obtenido por los otros cultivos del triplicado. Debido a esto, si bien los EIC mostrados son los que se asemejan más a los valores promedio, a causa de la desviación estándar, no son un ejemplo apropiado para comparar la abundancia relativa entre de chaxalactinas entre las cepas de *S. leeuwenhoekii* C34 estudiadas en este trabajo.

En la Figura 16, se presentan de forma separada los EICs correspondientes a chaxamicina D (m/z 682,29) generados para las muestras de extracto metanólico del pellet del cultivo de *S. leeuwenhoekii* C34 *wildtype* (A) y conjugante (B), para mejorar la visualización.

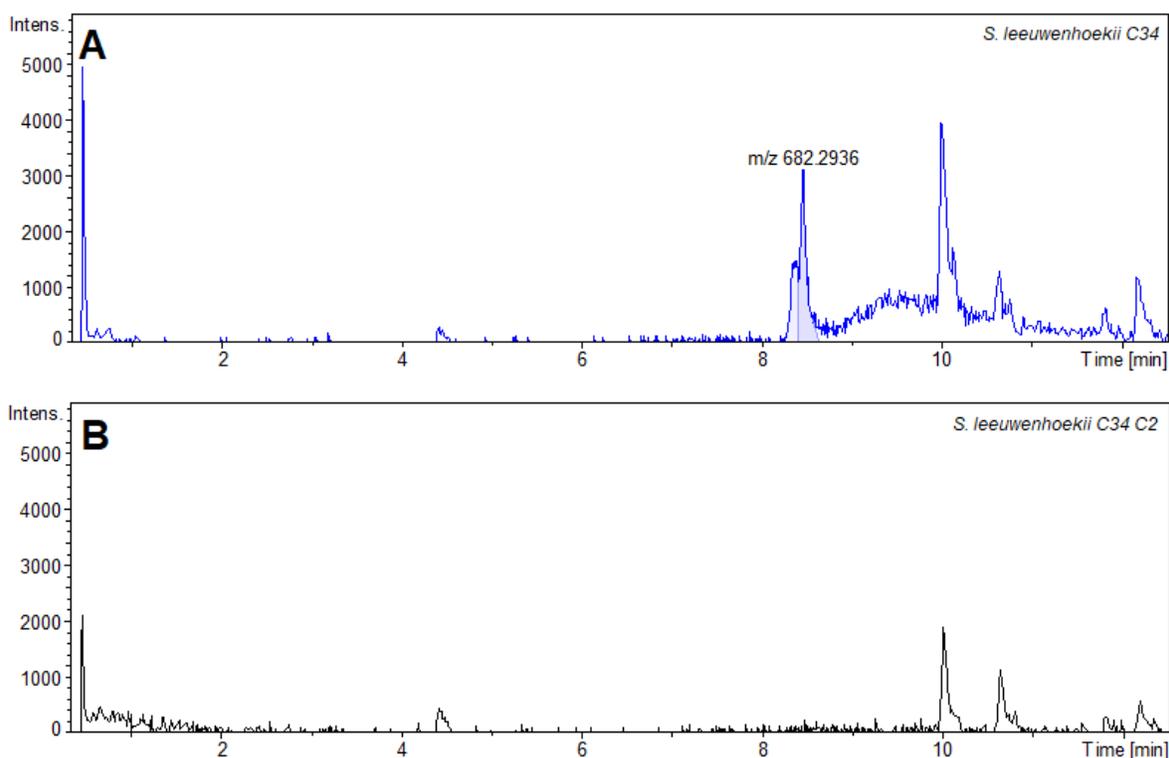


Figura 16: EICs de la chaxamicina D (m/z 682.2936), para las muestras de extracto metanólico del pellet del medio de cultivo de *S. leeuwenhoekii* C34 (A) y *S. leeuwenhoekii* C34 C2 (B).

Se observa que *S. leeuwenhoekii* C34 obtuvo una abundancia relativa similar a la registrada para las otras chaxamicinas, solo uno de los cultivos de los triplicados de *S. leeuwenhoekii* C34 C2 presentó en su extracto metanólico un *peak* correspondiente a chaxamicina D (no se muestra), cuya intensidad es aproximadamente un tercio de la presentada por la cepa *wildtype*.

En las muestras de sobrenadante, cuyos EIC para chaxamicinas A, B y C son exhibidos en la Figura 17, se observa la presencia de los 3 compuestos ya mencionados para *S. leeuwenhoekii* C34 *wildtype* (A) y conjugante (B), con una abundancia de chaxamicinas A, B y C aproximadamente dos veces mayor para las muestras provenientes de *S. leeuwenhoekii* C34.

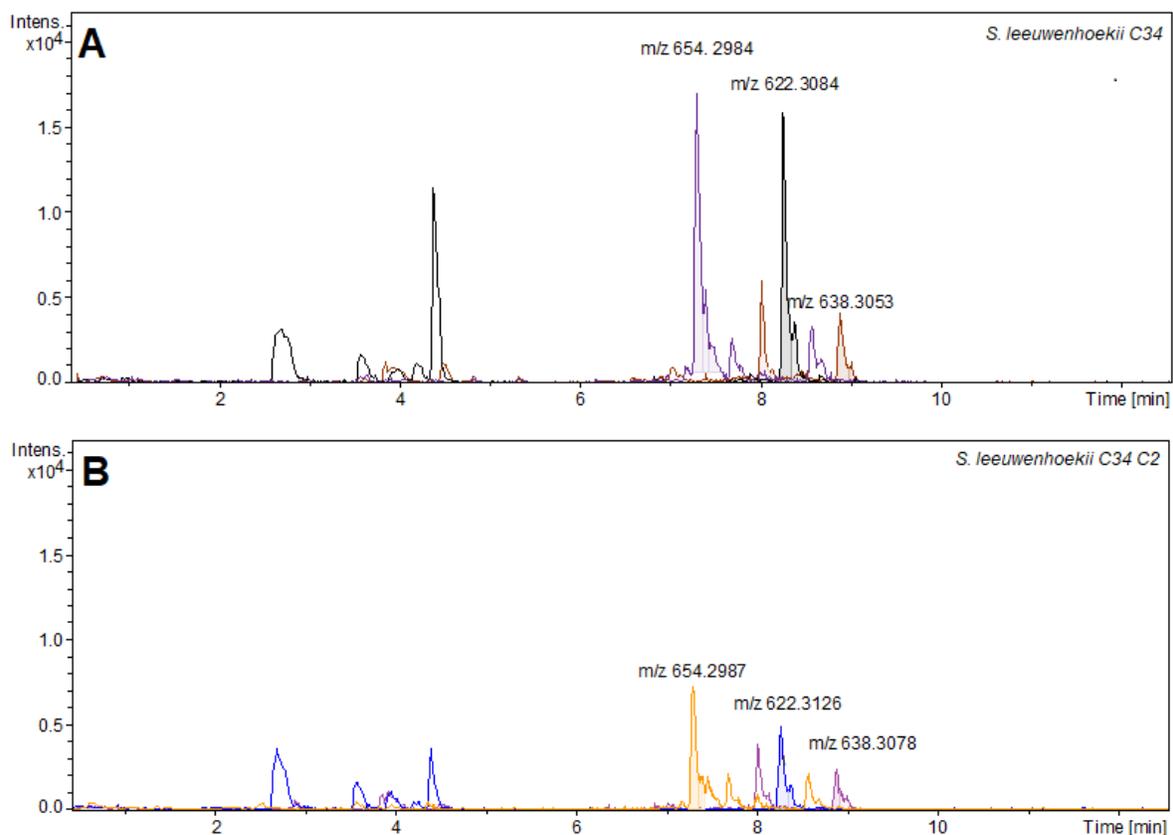


Figura 17: EICs de chaxamicinas A, B y C (m/z 638,3070, m/z 622,3126, y m/z 654.2987, respectivamente), para las muestras de sobrenadante del medio de cultivo de *S. leeuwenhoekii* C34 (A) y *S. leeuwenhoekii* C34 C2 (B).

Se presentan por separado los EIC correspondientes a la chaxamicina D en la Figura 18, ya que como se puede ver en los ejes verticales, para el caso de *S. leeuwenhoekii* C34 se tiene una abundancia un orden de magnitud mayor que la del resto de las chaxamicinas, por lo que de esta forma se facilita la visualización de todos los compuestos.

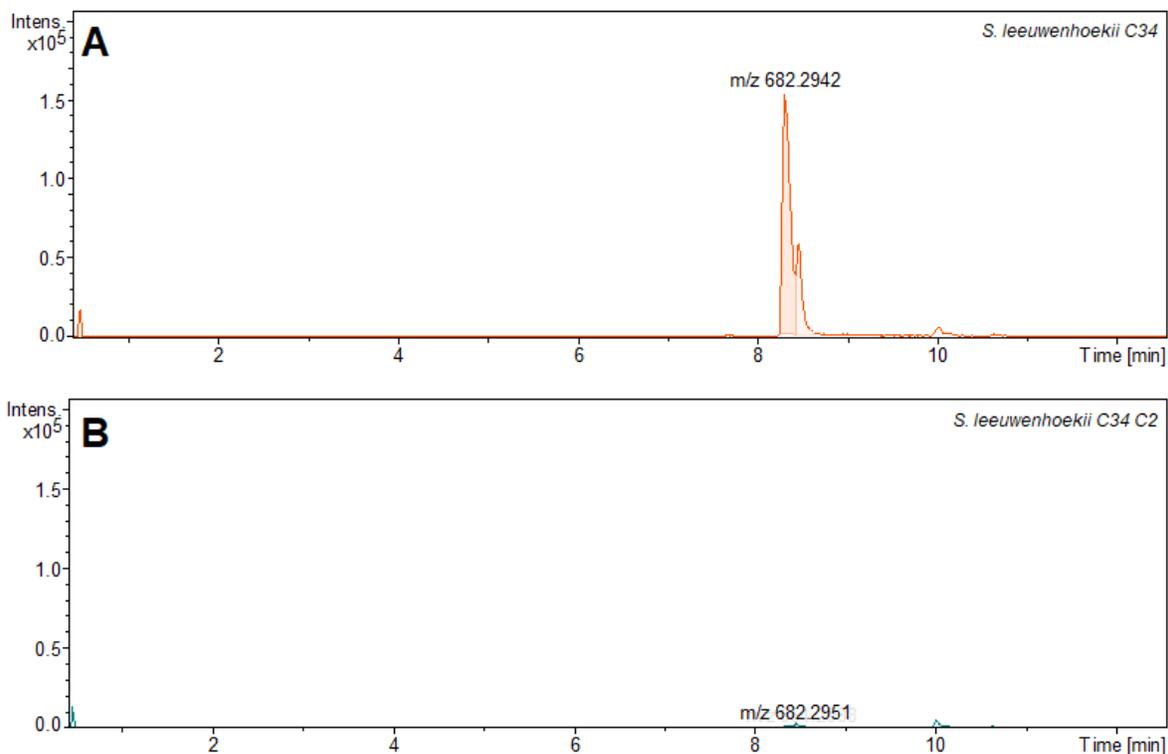


Figura 18: EICs de la chaxamicina D (m/z 682.2942), para las muestras de sobrenadante del medio de cultivo de *S. leeuwenhoekii* C34 (A) y *S. leeuwenhoekii* C34 C2 (B).

S. leeuwenhoekii C34 C2 presenta una abundancia de chaxamicina D aproximadamente dos veces mayor que para el caso de chaxamicina C (para más detalles, ver Tabla 22 en el anexo I), pero al compararla con la abundancia de chaxamicina D obtenida por *S. leeuwenhoekii* C34 como se muestra en la Figura 18, la presentada por la cepa *wildtype* (A) es más de un orden de magnitud mayor que la presentada por la cepa conjugante (B).

Cabe mencionar que, de los cultivos en triplicado de la cepa conjugante, 2 presentaron una abundancia similar a la mostrada en el gráfico y el tercero obtuvo un valor de aproximadamente un tercio del de la cepa conjugante. Se muestra el EIC correspondiente a uno de los cultivos que presentaron menor abundancia por tener un valor más cercano al promedio.

Al comparar los cromatogramas obtenidos en este estudio (figuras 12 a 15 para chaxamicinas, y 17 y 18 para chaxalactinas, mostradas más adelante) con los obtenidos de bibliografía, presentados en el anexo B, se puede ver que los tiempos de retención no coinciden, lo que se debe a las diferencias en las condiciones cromatográficas (material de la columna, flujo y composición de solventes)[48].

En el Gráfico 4 mostrado a continuación, se comparan los resultados promedio obtenidos para la abundancia de chaxamicinas A-D en *S. leeuwenhoekii* C34 y *S. leeuwenhoekii* C34 C2. Se incluye la desviación estándar de los datos en forma de barras de error.

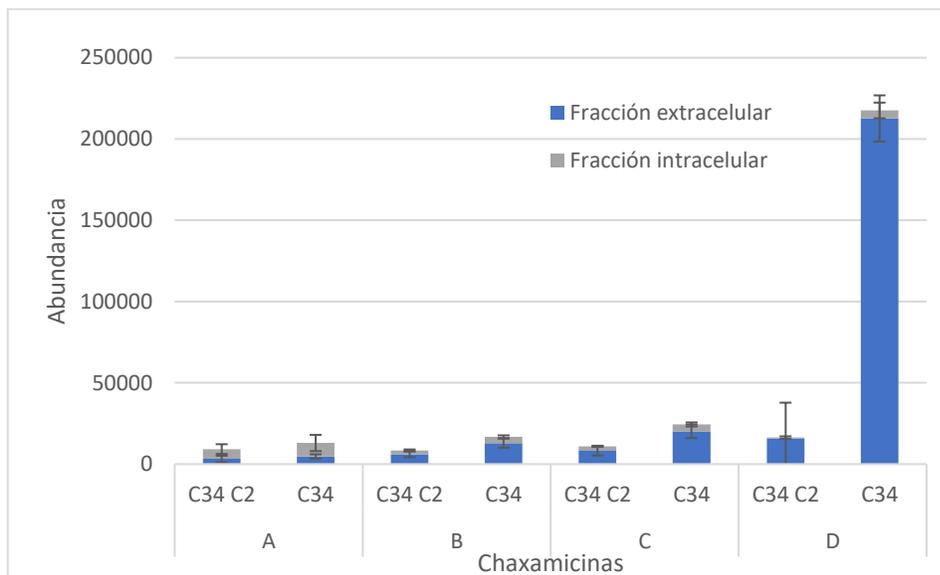


Gráfico 4: Se muestra la abundancia de chaxamicinas A, B, C y D, observada en las muestras de sobrenadante (azul) y extracto metanólico del pellet celular (gris), para *S. leeuwenhoekii* C34 C2 y de *S. leeuwenhoekii* C34 (izquierda y derecha en cada letra, respectivamente).

En la Tabla 22 del anexo 9, se muestran los valores de los promedios de abundancia de chaxamicinas A-D, para las muestras provenientes de sobrenadante y extracto metanólico del *pellet*, de las cepas *wildtype* y conjugante de *S. leeuwenhoekii* C34.

Como se mencionó anteriormente, los datos presentan una importante desviación estándar en algunos casos, por lo que se realizaron pruebas de hipótesis para evaluar las diferencias de las medias de ambas cepas, según el procedimiento descrito en el anexo 6 2, análogamente a las pruebas de hipótesis descritas para las diferencias de medias de los antibiogramas. Se utilizó como hipótesis nula que la diferencia entre las medias de abundancias para cada metabolito especializado, proveniente de cada tipo de muestra (sobrenadante o extracto metanólico) de cada cepa, era menor que δ arbitrario. Se tomó un nivel de confianza del 95%, y como hipótesis de rechazo, se tiene que la diferencia entre ambas es mayor que δ .

Los resultados, que se detallan en el anexo 9 1, indican que se puede asegurar con 95% de confianza que, para las muestras de sobrenadante, *S. leeuwenhoekii* C34 presentó una abundancia de chaxamicinas B, C y D 20%, 25% y 75% mayor respectivamente que la obtenida por la cepa conjugante. Es decir, que las diferencias de abundancia para los metabolitos mencionados son significativas.

Para la chaxamicina A, si se aumenta el número de replicas a 15 y si no varía significativamente la dispersión de los datos, se puede asegurar con 95% de confianza que la cepa *wildtype* presentó una abundancia 10% mayor que la de la cepa conjugante.

Para el caso de los datos provenientes del extracto metanólico, se puede asegurar con un 95% de confianza que, con los datos actuales, no se puede asegurar que existan diferencias en la abundancia de chaxamicinas A, B, C y D, en el interior de las bacterias. Sin embargo, si se aumenta teóricamente el número de réplicas a 10 y siempre que la dispersión de los datos no cambie significativamente, a cepa *wildtype* presenta abundancias de chaxamicinas B, C y D un 20, 15 y 30% mayores que las observadas para la cepa conjugante. Si se aumenta el número de réplicas a 29, se puede asegurar que la cepa *wildtype* cuenta con al menos un 5% más abundancia de chaxamicina A.

En resumen, si bien se puede asegurar que *S. leeuwenhoekii* C34 presentó mayor abundancia de chaxamicinas B, C y D que *S. leeuwenhoekii* C34 C2, de acuerdo con los resultados entregados por el análisis estadístico, no se debe olvidar que la abundancia es una medida netamente cualitativa. Por ello, no se puede estimar en que proporción son más abundantes las chaxamicinas en la cepa nativa.

De forma general, a partir del Gráfico 4 se puede observar que la chaxamicina A fue encontrada predominantemente en el extracto metanólico del *pellet*, mientras que las chaxamicinas B, C y D se observaron en mayor cantidad en las muestras de sobrenadante, es decir, en el interior de las bacterias y en el medio extracelular, respectivamente. Adicionalmente, la abundancia de chaxamicina D para cada cepa fue mayor que los otros tipos de chaxamicinas en la misma muestra.

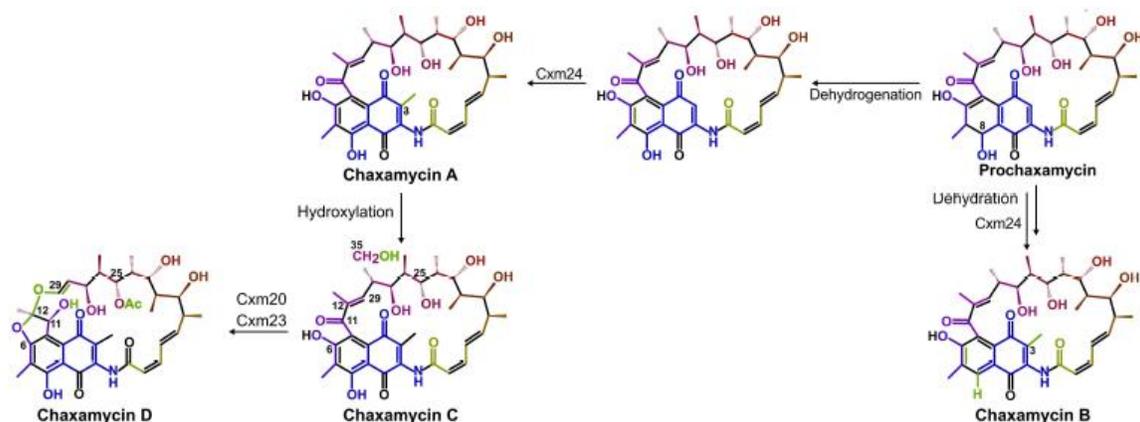


Figura 19: Fragmento del mecanismo de biosíntesis propuesto para las chaxamicinas, obtenido de Castro et al., 2015 [42].

Según se aprecia en un extracto del mecanismo de formación de las chaxamicinas mostrado en la Figura 19, la chaxamicina A y B se forman a partir de la prochaxamicina. Luego, la chaxamicina C se forma en base a la chaxamicina A y, finalmente, la chaxamicina D se forma a partir de la chaxamicina C.

De acuerdo con lo anterior, como la chaxamicina A es precursora de las chaxamicinas C y D, tiene sentido que se encuentre en el interior de la bacteria en mayor proporción que las otras chaxamicinas, ya que al menos una parte será transformada en chaxamicina C y D.

No se conocen los mecanismos regulatorios implicados en la transición de chaxamicina A a chaxamicina C y chaxamicina D, por lo que no se puede dar una explicación más detallada a las abundancias de cada tipo de chaxamicina. Sin embargo, ya que las chaxamicinas se encontraron principalmente en el medio extracelular, no se esperaría contar con un efecto de retroalimentación negativa para estas chaxamicinas. Dicho efecto tendría más sentido si los metabolitos especializados se estuvieran acumulando al interior de las bacterias.

Adicionalmente, si se estudian las abundancias de chaxamicinas mostradas en el Gráfico 4, y tomando los supuestos de que se producen continuamente chaxamicinas A, B, C, y D, que se alcanzó el equilibrio para las reacciones de producción de chaxamicinas, y que no existen otros mecanismos de regulación entre las reacciones de producción de chaxamicinas, se puede realizar el siguiente análisis:

Para contar con cantidades observables de un compuesto al llegar al equilibrio químico de reacción, su velocidad de producción debe ser mayor que su velocidad de consumo. Ya que se cuenta con cantidades observables de todos los tipos de chaxamicinas, y tomando en cuenta la Figura 19, las velocidades de producción (V_i) de cada chaxamicina se relacionan de la siguiente forma: $V_A > V_C > V_D$. Cabe mencionar que, como chaxamicina D es el producto final, es esperable que se acumule, ya que solo se produce y no se consume.

Es importante tener en cuenta que, como se mencionó en la introducción, los tipos de metabolitos especializados producidos por *S. leeuwenhoekii* C34 dependen en gran medida del medio de cultivo, tanto para su presencia como para su abundancia. Este fenómeno se debe a que la composición del medio determina la abundancia de reactivos disponibles para la formación de cada metabolito.

Comparación de la abundancia de Chaxalactinas entre S. leeuwenhoekii C34 y S. leeuwenhoekii C34 C2

El laboratorio de la USTO intentó encontrar los iones [M-H] con las m/z correspondientes a las chaxalactinas A, B y C, pero no se encontraron. Sin embargo, se detectaron m/z que podrían corresponder a las chaxalactinas con aductos de ácido fórmico, cuyas m/z son de 485,29, 501,28, y 515,30 para A, B y C, respectivamente. Estos aductos pueden formarse cuando las chaxalactinas entran en contacto con el ácido fórmico, que fue utilizado como solvente en el HPLC MS/MS. Desafortunadamente, sus patrones de fragmentación eran inexistentes o indiscernibles del ruido basal, por lo que no fue posible asegurar su identidad. Debido a lo anterior, no se tiene certeza de que los resultados obtenidos corresponden a las chaxalactinas.

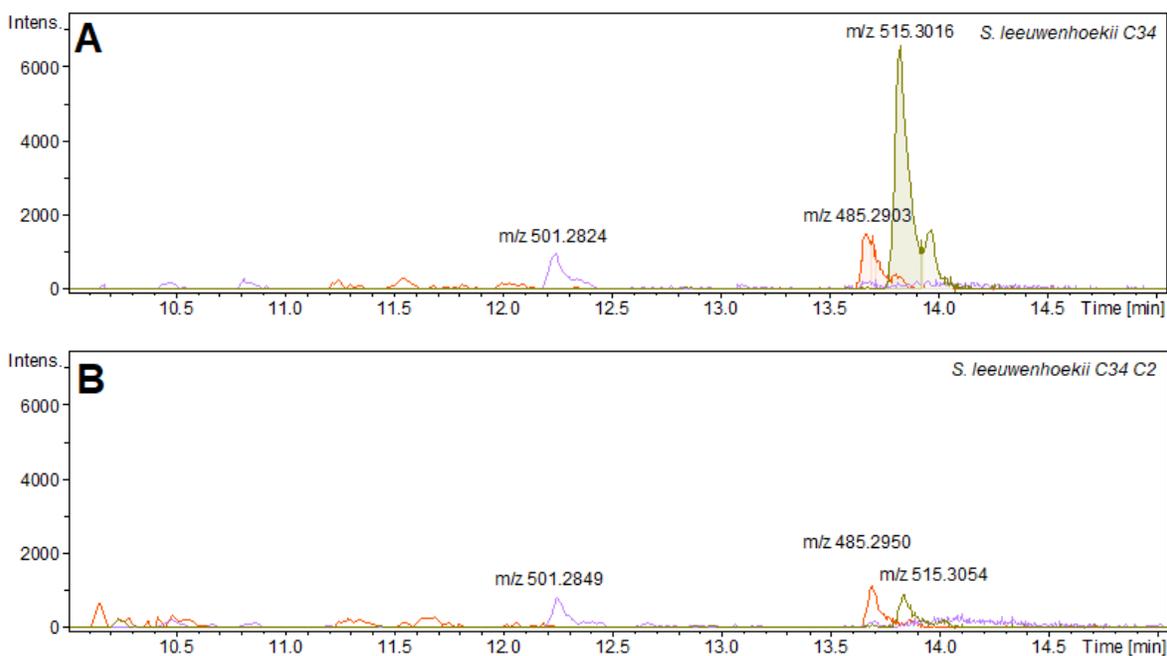


Figura 20: EICs de las potenciales chaxalactinas A, B y C con aductos de ácido fórmico (m/z 485.2950, m/z 501,2849 y 515,3054, respectivamente), para las muestras de extracto metanólico del pellet del medio de cultivo de *S. leeuwenhoekii* C34 (A) y *S. leeuwenhoekii* C34 C2 (B).

En la Figura 20, se muestra la abundancia de chaxalactinas A, B y C para muestras de extracto metanólico del *pellet* del medio de cultivo de *S. leeuwenhoekii* C34 (A) y *S. leeuwenhoekii* C34 C2 (B). Se puede ver que la cepa *wildtype* presenta una abundancia ligeramente mayor de chaxalactinas A y B (m/z 485,29 y m/z 501,28, respectivamente) que la cepa conjugante, pero 7 veces mayor para chaxalactina C (m/z 515,30).

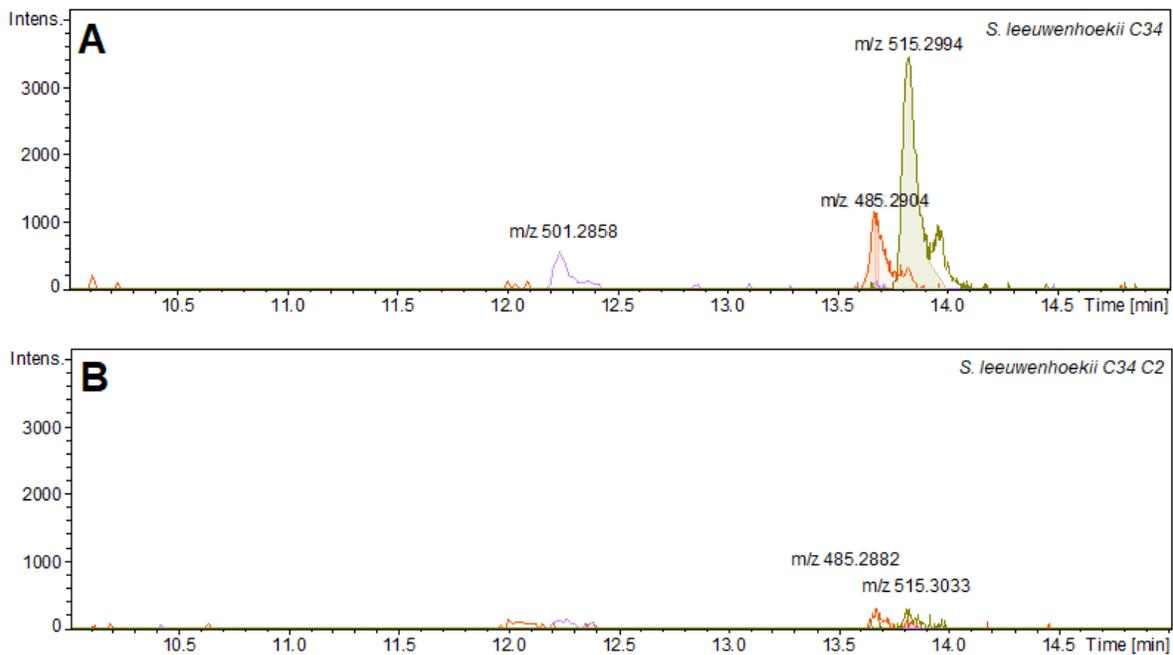


Figura 21: EICs de las potenciales chaxalactinas A, B y C con aductos de ácido fórmico (m/z 485.2904, m/z 501,2858 y 515,3033, respectivamente), para las muestras de sobrenadante del medio de cultivo de *S. leeuwenhoekii* C34 (A) y *S. leeuwenhoekii* C34 C2 (B).

En la Figura 21, se muestra la abundancia de chaxalactinas A, B y C para muestras de sobrenadante del medio de cultivo de *S. leeuwenhoekii* C34 (A) y *S. leeuwenhoekii* C34 C2 (B). Se observa que, de forma general, la cepa *wildtype* presenta una abundancia marcadamente mayor de chaxalactinas A y C (m/z 485,29 y m/z 515,30, respectivamente) que la cepa conjugante.

Con respecto a chaxalactina B (m/z 501,28), la cepa *wildtype* presenta una abundancia de este metabolito 3 veces mayor que el exhibido para chaxalactina A, pero no se observa detección de chaxalactina B en la cepa conjugante. Solamente uno de los cultivos en triplicado de *S. leeuwenhoekii* C34 C2 presentó chaxalactina B en su sobrenadante, con una abundancia 2,5 veces menor que el promedio de las abundancias obtenidas por la cepa *wildtype* para chaxalactina B.

A continuación, se comparan los resultados de las abundancias promedio, obtenidas para la producción de chaxalactinas entre *S. leeuwenhoekii* C34C2 y *S. leeuwenhoekii* C34, mediante los presuntos aductos de ácido fórmico de dichas moléculas.

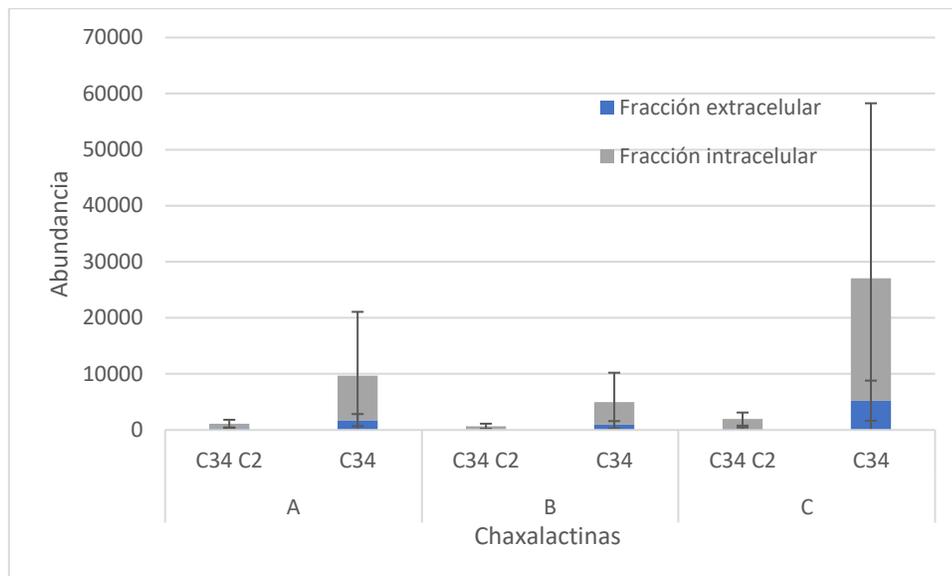


Gráfico 5: Se muestra la abundancia de chaxalactinas A, B y C, observada en las muestras de sobrenadante (azul) y extracto metanólico del pellet celular (gris), para *S. leeuwenhoekii* C34 C2 y de *S. leeuwenhoekii* C34 (izquierda y derecha en cada letra, respectivamente).

En el Gráfico 5, se observa que la cepa nativa cuenta con una abundancia notablemente mayor que la cepa conjugante, para todos los tipos de chaxalactinas. Sin embargo, los datos tienen una elevada desviación estándar en la cepa nativa, por lo que se realizó una prueba de hipótesis de la misma forma que para el caso de los antibiogramas, según se muestra en el anexo 6 b. Se utilizó como hipótesis nula que la diferencia entre las medias de abundancia para cada tipo de chaxalactinas en cada tipo de extracto, comparando entre ambas cepas (por ejemplo, se compara abundancia de chaxalactina A en extracto metanólico del pellet entre *S. leeuwenhoekii* C34 y *S. leeuwenhoekii* C34C2) es menor que δ , con δ correspondiendo a diferencias arbitrarias de 5% o 10% de la abundancia mayor correspondiente. Como hipótesis de rechazo se utilizó que la diferencia entre las medias mencionadas es mayor a δ . Los resultados de las pruebas de hipótesis mencionadas se pueden encontrar detalladamente en el anexo 9 a.

Respecto a la abundancia de chaxalactina A en sobrenadante, con un 95% de confianza se rechazó la hipótesis nula para $n = 3$ y $\delta = 5\%$, y para $\delta = 10\%$ y $n = 4$. Es decir, con 4 réplicas en vez de 3 por cultivo se puede asegurar teóricamente que *S. leeuwenhoekii* C34 presentó una abundancia al menos 10% mayor de chaxalactina A que *S. leeuwenhoekii* C34 C2. Para las muestras de extracto metanólico, para 10 réplicas se puede asegurar con 95% de confianza que *S. leeuwenhoekii* C34 presentó una abundancia al menos 10% mayor de chaxalactina A que *S. leeuwenhoekii* C34 C2.

Para el caso de la abundancia de chaxalactina B, se puede asegurar con 95% de confianza que *S. leeuwenhoekii* C34 presentó una abundancia al menos 10% mayor de chaxalactina A que *S. leeuwenhoekii* C34 C2 con $n = 4$ y $n = 9$, para muestras de sobrenadante y extracto metanólico, respectivamente.

Para la chaxamicina C, se puede asegurar con 95% de confianza que *S. leeuwenhoekii* C34 presentó una abundancia al menos 10% mayor de chaxalactina A que *S. leeuwenhoekii* C34 C2 con $n = 3$ y $n = 9$, para muestras de sobrenadante y extracto metanólico, respetivamente.

Resumiendo lo anterior, el análisis estadístico muestra que, con los datos actuales, se puede asegurar con 95% de confianza que las diferencias en la diferencia entre las cepas conjugante y nativa, para la abundancia de las chaxalactinas A, B, y C en la fracción intracelular es menor al 5% de lo obtenido para *S. leeuwenhoekii* C34.

Sin embargo, al aumentar el número de réplicas hasta 10 en los casos con mayor desviación estándar de datos, teóricamente se podría asegurar que *S. leeuwenhoekii* C34 presenta una abundancia al menos 10% mayor de chaxalactinas que *S. leeuwenhoekii* C34 C2. Luego, tomando en cuenta el análisis estadístico, se cuenta con una abundancia de chaxalactinas notablemente mayor en la cepa *wildtype*, lo que se condice con lo predicho por los antibiogramas, y apoya la teoría planteada en la sección de análisis de rutas metabólicas, en la que se expone que la sobreexpresión de los genes elegidos no tuvo un efecto positivo sobre la producción de metabolitos especializados y su impacto se vio distribuido entre las rutas metabólicas que utilizan (S)-2-metilmalonil-CoA, como el TCA.

En el Gráfico 5 se observa que, para todos los compuestos y en todas las cepas, las chaxalactinas se encontraron predominantemente en el extracto metanólico del *pellet*, es decir, estaban en el interior de las bacterias en el momento de detener el cultivo.

Ya que las chaxalactinas son metabolitos especializados que poseen bioactividad contra otros microorganismos, normalmente se encuentran en el medio de cultivo en vez del interior de las bacterias. Por ello, es posible que, si el cultivo se hubiera incubado por más tiempo, estos metabolitos habrían sido encontrados en las muestras de sobrenadante en vez del extracto metanólico.

En la Figura 22, se muestra el mecanismo propuesto para la biosíntesis de chaxalactinas.



Figura 22: Fragmento del mecanismo de producción de chaxalactinas, obtenido de Castro et al., 2018 [49].

Se observa que la chaxalactina C se produce a partir de la chaxalactina B, y ésta a su vez, se produce en base a la chaxalactina A. No se cuenta con más información sobre los mecanismos regulatorios involucrados en estas reacciones, pero como las chaxalactinas fueron encontradas predominantemente en el interior de las bacterias, es posible que exista retroalimentación negativa de chaxalactina B sobre su reacción de producción. Esto que podría haber causado la abundancia mayor de chaxalactina A con respecto a chaxalactina B en la cepa *wildtype*. Análogo al caso de chaxamicina D,

chaxalactina C se encuentra en mayor abundancia que las chaxalactinas B y A, ya que es producto final, y por lo tanto, se produce pero no se consume.

Si se estudian las abundancias de chaxalactinas mostradas en el gráfico 5, y tomando los supuestos de que se producen continuamente chaxalactinas A, B y C, y que se alcanzó el equilibrio para las reacciones de producción de chaxalactinas, se puede realizar el siguiente análisis:

Para contar con cantidades observables de un compuesto al llegar al equilibrio químico de reacción, su velocidad de producción debe ser mayor que su velocidad de consumo. Ya que se cuenta con cantidades observables de todos los tipos de chaxalactinas, y tomando en cuenta la Figura 22, las velocidades de producción de cada chaxalactina se relacionan de la siguiente forma: $V_A > V_B > V_C$.

No obstante, no se debe olvidar que la medida de abundancia no es exacta y no representa una medida cuantitativa por si sola, por lo que no se puede tener certeza sobre lo recién mencionado.

En la Tabla 3, se muestran las concentraciones mínimas inhibitorias promedio (MIC por sus siglas en inglés) [$\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$] de las chaxamicinas A, B, C y D, para *E. coli* y *S. aureus* [24] [25]. Se observa que las MIC de chaxamicinas A, B y C son notablemente más altas que la de la chaxamicina D, es decir, la chaxamicina D es la más efectiva para eliminar los microorganismos ya mencionados.

Tabla 3: Concentración mínima inhibitoria de chaxamicina A, B, C y D para *E. coli* y *S. aureus* [24] [25].

Concentración mínima inhibitoria promedio $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$				
	Chaxamicina A	Chaxamicina B	Chaxamicina C	Chaxamicina D
<i>E. coli</i>	>20	>20	>20	1,21
<i>S. aureus</i>	0,4	0,2	0,8	0,05

Como se mencionó anteriormente, la chaxamicina D fue la chaxamicina que demostró mayor abundancia tanto para la cepa *wildtype* como para la cepa conjugante.

Ya que la chaxamicina D fue la chaxamicina más abundante para ambas cepas (efecto notablemente mayor para la cepa *wildtype*), tomando en cuenta que las chaxalactinas se encontraron predominantemente en el interior de las bacterias, y sumado a que la chaxamicina D posee una MIC menor que el resto de las chaxamicinas, se puede argumentar que la chaxamicina D podría ser la causante del mayor tamaño (aunque la diferencia de tamaño es pequeña) en los halos de inhibición de crecimiento, normalizados por la concentración de biomasa, obtenidos para la cepa *wildtype*.

Recapitulando: los genes se insertaron con un promotor constitutivo, pero no se logró aumentar la producción de metabolitos especializados. Se analizaron las rutas metabólicas y se encontraron argumentos de porqué ocurre esto. Además, se verificó

mediante secuenciación que los plásmidos se construyeron correctamente mediante secuenciación, y que las copias de genes fueron incorporadas en C34.

Factores que afectan la producción de proteínas recombinantes

En este estudio se comprobó que se había aumentado el número de copias de los genes sle39830 y sle27500 en el genoma de *S. leeuwenhoekii* C34, pero como no se estudió el transcriptoma, no se cuenta directamente con prueba irrefutable de que las copias incorporadas de los genes se estén expresando. Si no se estuvieran expresando las copias incorporadas, el fenómeno podría entregar una posible explicación a que no se haya obtenido una mayor producción de metabolitos especializados en la cepa conjugante. No obstante, ya que los genes fueron insertados río abajo del promotor ermE* constitutivo para *Streptomyces*, cuya efectividad para expresar genes en *S. leeuwenhoekii* ha sido probada [42], los genes incorporados bajo dicho promotor debieran expresarse continuamente.

Si las copias incorporadas de los genes no se estuvieran expresando, una posible causa sería que los genes se hubieran insertado incorrectamente en el plásmido respectivo, lo que se descartó comprobando los resultados de la secuenciación (no se muestran). La posibilidad de que las copias de los genes no se hubieran integrado en el genoma de *S. leeuwenhoekii* C34 se descarta, ya que, como se explicó anteriormente, la cepa conjugante creció en medios suplementados con apramicina e higromicina B, cuyos genes de resistencia se encuentran en los plásmidos utilizados y no en el genoma de *S. leeuwenhoekii* C34; también se descarta por los productos de PCR obtenidos a partir de la cepa conjugante utilizando los partidores GBA, que no generan amplificación en el genoma nativo de *S. leeuwenhoekii* C34.

Entre los factores que pueden afectar la expresión de proteínas recombinantes están la carga metabólica asociada al número de copias de los plásmidos recombinantes, el gasto energético y de nutrientes derivado de llevar a cabo la transcripción de estos genes, y la traducción del mRNA en proteínas, junto con la formación de cuerpos de inclusión, o la posible toxicidad de la proteína para la bacteria. Estos factores pueden afectar no solamente la producción de las proteínas recombinantes, sino que también pueden ser perjudiciales para el crecimiento de los microorganismos.

Con respecto a la carga metabólica derivada de la mantención y replicación de los plásmidos recombinantes, ésta es mayor mientras más elevado sea el número de copias del plásmido, gastando energía y recursos que normalmente son utilizados en los procesos rutinarios de la bacteria, lo que entorpece el crecimiento y genera cambios fisiológicos que entorpecen la producción de la proteína recombinante [51][52]. Sin embargo, para plásmidos con un bajo número de copias (hasta 20), el número de copias se relaciona directamente con el aumento de la expresión de los genes recombinantes, y la producción de las proteínas asociadas a ellos[53]. La carga metabólica es significativamente menor para plásmidos integrativos en su organismo huésped objetivo, ya que no se deben utilizar recursos para mantener y replicar los plásmidos[54][52].

Los vectores con un alto número de copias alcanzan sobre 500 copias y producen entre 3 y 5 µg de DNA por ml de cultivo en medio LB al extraer el DNA plasmidial. Los vectores

con bajo número de copias, en cambio, alcanzan hasta 20 copias y producen entre 0,2 y 1 µg de DNA por ml de cultivo en medio LB[55].

No se cuenta con información bibliográfica sobre el número de copias de los plásmidos pIJ10257 y pIJ12551, pero al extraerlos desde *E. coli* para trabajar con ellos, se obtuvieron entre 0,25 y 0,9 µg por ml de cultivo en medio LB. En consecuencia, los plásmidos recombinantes *sle39830*-pIJ10257 y *sle27500*-pIJ12551 también deberían tener un bajo número de copias. Adicionalmente, dado que los plásmidos pIJ10257 y pIJ12551 son integrativos y no se replican en *Streptomyces*, la carga metabólica adicional en *S. leeuwenhoekii* C34 C2 debido a las nuevas copias de los genes *Sle39830* y *sle27500* en el genoma, debería ser mínima comparada con plásmidos de alto número de copias. Por lo que este factor no debiera afectar mayormente el crecimiento de la bacteria, ni la producción de metabolitos especializados en la cepa conjugante.

Cuando se dirige la actividad metabólica de un microorganismo hacia la producción de metabolitos, el microorganismo debe destinar nutrientes y energía hacia ese objetivo [51][56], por lo que la producción excesiva de proteínas recombinantes puede perjudicar al microorganismo huésped. Se observó mediante la expresión de GFP en *E. coli* BL21 bajo el promotor fuerte T7, que este fenómeno ocurre predominantemente en la etapa de transcripción del DNA, y que la principal contribución de la etapa de traducción de mRNA a la carga metabólica está asociada a la formación de cuerpos de inclusión o a la toxicidad de la proteína recombinante para el microorganismo[54][51].

No se estudió el transcriptoma de los cultivos de las cepas *wildtype* y conjugante, por lo que no se puede afirmar, con completa certeza, que haya aumentado la transcripción de los genes *sle39830* y *sle27500*. Sin embargo, si la cepa conjugante hubiera tenido una carga metabólica significativamente mayor que la cepa *wildtype*, *S. leeuwenhoekii* C34 C2 habría alcanzado menor crecimiento que *S. leeuwenhoekii* C34, que no es el caso.

Con respecto a la potencial toxicidad de las chaxamicinas para *S. leeuwenhoekii* C34 y *S. leeuwenhoekii* C34 C2, cabe mencionar que, como son proteínas producidas naturalmente por la bacteria, no deberían dañarla mientras sean secretadas al medio extracelular. En el caso de las chaxalactinas, se encontraron predominantemente en el medio intracelular. Si bien es cierto que los promedios de abundancia, de cada cepa y para cada compuesto, indican que la cepa nativa presentó mayor abundancia de todos los tipos de chaxalactinas, debido a la desviación estándar no se puede asegurar que las diferencias entre ambas cepas sean mayores a 5%. No obstante, *S. leeuwenhoekii* C34 presentó abundancias al menos iguales a las de la cepa conjugante (si es que no mayores), por lo que no tendría sentido que la abundancia de chaxalactinas hubiera resultado tóxica para la cepa conjugante y no para la cepa nativa.

Con respecto a los cuerpos de inclusión, no se observa una diferencia, para la cepa conjugante y la cepa *wildtype*, en la proporción en que se encuentra cada metabolito en la fracción intracelular y extracelular. Se observan predominantemente todos los tipos de chaxamicinas en la fracción extracelular para ambas cepas, por lo que se descarta la formación de cuerpos de inclusión de chaxamicinas.

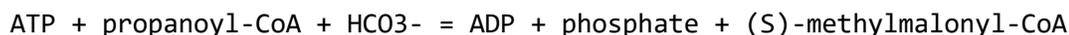
Por otro lado, se observa que las chaxalactinas se encuentran predominantemente en la fracción intracelular para ambas cepas, pero la cepa *wildtype* presenta una abundancia al menos igual a la de la cepa conjugante (si es que no mayor), para todos los compuestos. Si, a causa de la acumulación de metabolitos en el medio intracelular se estuvieran produciendo cuerpos de inclusión, y estos estuvieran interfiriendo con el crecimiento y producción de metabolitos especializados, este fenómeno debería ocurrir en igual o mayor medida en la cepa nativa en comparación con la cepa conjugante. Por ello, se descarta en la cepa conjugante se produzca una mayor cantidad de cuerpos de inclusión que en la cepa nativa, por lo que el efecto de dicho fenómeno no debería ser mayor en la cepa conjugante, de estar ocurriendo.

Finalmente, con los datos y desviaciones estándar actuales, se tiene 95% de certeza de que las diferencias de abundancia observadas entre ambas cepas son menores al 5% para todos los tipos de chaxamicinas y chaxalactinas. Por ello, no tendría sentido que existiera inhibición por producto en la cepa conjugante y no en la cepa nativa.

Dado el análisis, recién expuesto, de los factores mencionados en esta sección, se llegó a los siguientes resultados: la cepa conjugante no debiera poseer una carga metabólica significativamente mayor que la carga metabólica de la cepa nativa, tampoco fue afectada por la potencial toxicidad de las chaxamicinas y chaxalactinas, ni se produjeron cuerpos de inclusión en mayor medida que en el caso de la cepa nativa. Debido a lo anterior, estos factores no debieran haber afectado significativamente la producción de metabolitos en *S. leeuwenhoekii* C34 C2, por lo que se descarta que sean la causa de la falta de producción adicional de chaxamicinas y chaxalactinas en la cepa conjugante.

Análisis de las rutas metabólicas relacionadas con el precursor clave (S)-2-methylmalonyl-CoA

Se estudió el mapa metabólico de *S. leeuwenhoekii* C34 disponible en la base de datos *Krypto Enciclopedia of Genes and Genomes*, o *KEGG*¹³. Como se mencionó anteriormente, los genes *Sle39830* y *Sle27500* codifican para la producción de las cadenas alfa y beta de la enzima propanoil-CoA carboxilasa [44][45], que cataliza la reacción de producción de (S)-2-metilmalonil-CoA a partir de propanoil-CoA, mostrada a continuación.



La reacción de producción de (S)-2-metilmalonil-CoA a partir de propanoil-CoA, mostrada anteriormente, forma parte de diversas rutas metabólicas dentro de *S. leeuwenhoekii* C34[57][58][59], tales como la degradación de valina, leucina e isoleucina[60]; el metabolismo del glioxilato y el dicarboxilato[61]; el metabolismo del propanoato[62]; la biosíntesis de metabolitos secundarios[63]; el metabolismo del carbono[64], y el metabolismo microbiano en diversos ambientes[44][45].

¹³ <https://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>

Dada la información anterior, es predecible que, de contar con (S)-2-metilmalonil-CoA adicional, producido a causa de la presunta sobreexpresión de los genes *Sle27500* y *Sle39830*, no sea utilizado exclusivamente en la ruta asociada a las chaxamicinas. Sin embargo, era necesario llevar a cabo la sobreexpresión conjunta de *Sle27500* y *Sle39830*, ya que el (S)-2-metilmalonil-CoA es un precursor clave para la síntesis de metabolitos especializados [43] y, por lo tanto, es necesario evaluar si la sobreexpresión de los genes mencionados se traduce en un aumento de la producción de chaxamicinas y chaxalactinas.

Adicionalmente, y si se toma en cuenta el estudio estadístico considerando los supuestos utilizados, la sobreexpresión de los genes seleccionados parece haber producido un aumento en la biomasa en vez de un aumento de metabolitos precursores directos para la producción de chaxamicinas y chaxalactinas a partir de (S)-2-metilmalonil-CoA. De ser cierto, este resultado podría explicarse en parte por la presencia de la reacción de formación de (S)-2-metilmalonil-CoA a partir de propanoil-CoA en diversas rutas metabólicas, asociadas a todo tipo de procesos dentro de *S. leeuwenhoekii* C34.

El (S)-2-metilmalonil-CoA también es utilizado para la síntesis de succinil-CoA, que luego participa en el ciclo del citrato (o TCA). Este ciclo es esencial para el funcionamiento de cualquier organismo, ya que provee energía en forma de ATP, NADH y FADH₂. Además, algunos intermediarios del TCA, como el oxalacetato y oxoglutarato, son precursores en la síntesis de aminoácidos[65][66][67]. También es importante mencionar que, como el succinil-CoA participa en un ciclo (TCA), al aumentar el flujo de un componente del ciclo, aumentan, en consecuencia, todos los otros componentes, potenciando todas las rutas que se alimenten de ellos.

Sin embargo, el efecto del aumento del flujo de los componentes del ciclo del citrato se ve atenuado por el hecho de que un elemento del ciclo se genera a partir de la transformación del anterior, es decir, al aumentar en cierta cantidad el succinil-CoA que entra al ciclo, el siguiente elemento aumentaría consumiendo succinil-CoA, y el subsiguiente haría lo mismo, por lo que el aumento tendría un comportamiento de pulso. Si el aumento es sostenido como se esperaría de un promotor constitutivo, se tendría una serie de pulsos que, en teoría, podrían aumentar la cantidad de todos los elementos del ciclo. Por otro lado, como se mencionó anteriormente, los elementos del ciclo son utilizados en otras reacciones externas, por lo que el aumento de la intensidad del pulso disminuye a lo largo del ciclo.

Como no se cuenta con conocimiento más detallado sobre los elementos regulatorios para las reacciones del TCA en *Streptomyces*, y como el GSM de *S. leeuwenhoekii* C34 no incluye elementos regulatorios, no se puede simular el fenómeno ni se puede hacer afirmaciones sobre la intensidad que podrían tener los efectos recién descritos y, por lo tanto, no se puede predecir el impacto del efecto de aumentar el (S)-2-metilmalonil-CoA sobre el metabolismo general del microorganismo.

Otros precursores clave para la síntesis de chaxamicinas y chaxalactinas

De acuerdo con la estequiometría de las rutas metabólicas de producción de chaxamicinas y chaxalactinas mostradas en la Figura 4 y la Figura 5, presentadas en la página 11, desde la reacción de producción de (S)-2-metilmalonil-CoA a partir de propanoil-CoA, mediada por los genes sobreexpresados en este trabajo, se necesitan 7 moléculas de (S)-2-metilmalonil-CoA para producir una chaxamicina, y 4 para producir una chaxalactina. Por ello, el efecto de la sobreexpresión de los genes *sle39830* y *sle27500* sobre la producción adicional de (S)-2-metilmalonil-CoA está a razón 7:1 con respecto a la producción de chaxamicinas, y está a razón 4:1 con respecto a la producción de chaxalactinas.

Adicionalmente, en la ruta metabólica de producción de metabolitos especializados mostrada en la Figura 3 del anexoA, se puede ver que dentro de los precursores clave para la biosíntesis de chaxamicinas y chaxalactinas se encuentran el 3-Amino-5-hidroxibenzoato (AHBA) y el malonil-CoA. En las rutas metabólicas de producción de chaxamicinas y chaxalactinas mostradas en la Figura 4 y la Figura 5, se puede ver que para producir una chaxamicina se necesitan 3 moléculas de malonil-CoA y una molécula de AHBA, mientras que para producir una chaxalactina se requieren 8 moléculas de malonil-CoA, y no se requiere AHBA (aparte de las moléculas de (S)-2-metilmalonil-CoA mencionadas anteriormente).

En consecuencia, para poder observar un aumento efectivo en la producción de chaxamicinas y chaxalactinas, se hace necesario sobreexpresar, en conjunto con *sle39830* y *sle27500*, genes que aumenten la producción de AHBA y malonil-CoA en *S. leeuwenhoekii* C34 C2, ya que, si solo se produce en exceso el (S)-2-metilmalonil-CoA, la ruta de producción de chaxamicinas se verá limitada por la cantidad disponible de AHBA y malonil-CoA, y la de chaxalactinas se verá limitada por la cantidad de malonil-CoA.

En base a la Figura 4 y la Figura 5, se dan ejemplos de genes que podrían potenciar la producción de AHBA y malonil-CoA. Para el caso de AHBA, se puede sobreexpresar el gen *sle10250*, que media la reacción de producción de AHBA a partir de 5-Amino-5-deoxy-3-dehidroshikimato.

Para aumentar la producción de malonil-CoA, se puede sobreexpresar el gen *sle47660* que media la producción de malonil-CoA a partir de acetil-CoA y *carboxybiotin-carboxyl carrier protein*, en conjunto con la potenciación de la reacción de producción de *carboxybiotin-carboxyl carrier protein* a través de la sobreexpresión de alguno de los siguientes genes: *sle59710*, *sle44630*, *sle27560*, *Sle39830*. Cabe mencionar que de los genes que median la producción de *carboxybiotin-carboxyl carrier protein*, ya se cuenta con *Sle39830* sobreexpresado, por lo que para llevar a cabo el aumento de malonil-CoA, solo hace falta sobreexpresar el gen *sle47660*.

Tras haber analizado las rutas metabólicas de *S. leeuwenhoekii* C34, y tomando en cuenta que la reacción de producción de (S)-2-metilmalonil-CoA a partir de propanoil-CoA está presente en varias rutas esenciales para el funcionamiento de la bacteria, junto con lo expuesto sobre el ciclo del citrato, es posible que al potenciar dicha reacción, se potencie el metabolismo de *S. leeuwenhoekii* C34 de forma general, en una magnitud desconocida. Si bien actualmente no se cuenta con evidencia experimental de que eso ocurra, si se cumplen las condiciones del estudio estadístico, la proposición anterior estaría respaldada por el mayor crecimiento para *S. leeuwenhoekii* C34 C2 con respecto a *S. leeuwenhoekii* C34. Sin embargo, se reitera que la desviación estándar actual, en conjunto con el bajo número de datos por cultivo, no permiten obtener esas conclusiones, y se realiza el análisis anterior únicamente como un ejercicio teórico.

Los resultados obtenidos para los halos de inhibición de crecimiento y el análisis de perfiles metabólicos indican que la sobreexpresión realizada no genera un aumento en la producción de metabolitos especializados. Si además se toma en cuenta que la cepa conjugante alcanzó un mayor crecimiento que la cepa *wildtype* (según el análisis estadístico), se podría afirmar que, bajo las condiciones utilizadas, el exceso de (S)-2-metilmalonil-CoA no se utilizó en la ruta metabólica de producción de metabolitos especializados (probablemente por la falta de exceso de malonil-CoA y AHBA), y fue distribuido hacia otras rutas, como, por ejemplo, el TCA.

Posibles estrategias para impulsar la producción de metabolitos especializados en *S. leeuwenhoekii* C34 C2

Sobreexpresión conjunta de los otros precursores clave para la producción de chaxamicinas y chaxalactinas

Como se aumentó la producción de (S)-2-metilmalonil-CoA, es de esperar que todos los procesos en los que se utiliza esta molécula se hayan visto potenciados, y no solamente la producción de metabolitos especializados. Sería interesante potenciar la producción de AHBA y malonil-CoA, mediante la sobreexpresión de los genes *sle10250*, y *sle47660*, respectivamente [43][68][69], en *S. leeuwenhoekii* C34 C2. Al aumentar la producción de los 3 precursores clave para la producción de chaxamicinas y chaxalactinas, debería obtenerse un aumento en la producción de dichos metabolitos especializados.

En *Streptomyces hygroscopicus* XM201, la sobreexpresión de 6 genes para la biosíntesis de AHBA bajo el promotor fuerte 5063p, junto con la expresión de los genes asociados a PKS bajo el mismo promotor, produjo un aumento en la producción del policétido geldanamicina[70]. Estudiando la síntesis de naftomicina y ansatrienina en *S. collinus*, se encontraron regiones relacionadas con la biosíntesis de AHBA en los clusters de genes de la ansatrienina y la naftomicina [71].

Se observó que los genes *rifG-N* del *cluster* de rifamicina de *Amycolatopsis mediterranei*, que fueron expresados en *S. coelicolor* bajo el promotor *actII-orf4*, poseen un rol importante en la producción de AHBA[72]. Se determinó que *rifL*, *rifM* y *rifN* codifican para la producción de AHBA, mientras que la delección del gen *rifI* provoca un aumento en la producción de AHBA [72]. Los genes *rifG-N* tienen sus homólogos en *S. leeuwenhoekii*,

cxmG-N, respectivamente [42], [73]–[79], por lo que se esperaría que sobreexpresar o silenciarlos aumente la producción de AHBA, lo que podría provocar un aumento en la producción de chaxamicinas.

En un estudio llevado a cabo en *S. coelicolor* se muestra que la sobreexpresión de genes asociados a la acetil-CoA carboxilasa, que produce malonil-CoA a partir de acetil-CoA, produjo una rápida utilización de la glucosa y aumentó su eficiencia de conversión a actinorhodin, un antibiótico de la familia de los policétidos producido por dicho microorganismo[80]. Si el objetivo es aumentar la producción de malonil-CoA, que también es un precursor clave en la biosíntesis de chaxamicinas y chaxalactinas, sobreexpresar los genes *sle44630* y *sle27560*, que codifican para la enzima acetil-CoA carboxilasa, puede ser una estrategia viable para aumentar la producción de metabolitos especializados, si se lleva a cabo de forma complementaria a la sobreexpresión de genes realizada en este trabajo.

Sin embargo, si bien no se ha observado un decrecimiento en la viabilidad del cultivo tras agregar las copias de los genes *sle39830* y *sle27500* al genoma del microorganismo, y su presunta sobreexpresión, no se cuenta con más información sobre la magnitud del potencial aumento de carga metabólica derivado de realizar la sobreexpresión de más genes en *S. leeuwenhoekii* C34 C2, y el modelo de escala genómica disponible para el microorganismo no incluye restricciones relacionadas con elementos de regulación de genes ni reacciones. Por ello, no se puede prever cuantos genes pueden sobreexpresarse río abajo de promotores constitutivos en el genoma de *S. leeuwenhoekii* C34 sin causar un estrés metabólico perjudicial para la viabilidad del microorganismo.

Delección de genes que podrían causar un potencial aumento en la producción de metabolitos especializados

Se ha estudiado el comportamiento de la enzima metilmalonil-CoA mutasa (MCM), que transforma el (S)-2-metilmalonil-CoA en succinil-CoA y viceversa. Se determinó que para *Saccharopolyspora erythraea* (anteriormente conocida como *Streptomyces erythraea*[81]), en medios basados en aceites potencia la producción de (S)-2-metilmalonil-CoA, mientras que en medios basados en carbohidratos potencia la producción de succinil-CoA [82]. La delección de los genes asociados a MCM produjo el efecto contrario para los medios recién mencionados [82]. Como se desea aumentar el (S)-2-metilmalonil-CoA para fortalecer la ruta de producción de chaxamicinas y chaxalactinas, se debería utilizar medios basados en aceites si no se utiliza la delección, y en caso contrario, medios basados en carbohidratos con el fin de aprovechar este efecto. Una posible hipótesis para explicar este fenómeno es que la obtención de los precursores de estos metabolitos puede ser más directa en un medio que en otro.

En *S. leeuwenhoekii* C34, los genes que codifican para MCM son *sle22410*, *sle28060* y *sle28760*[83], y fueron identificados como posibles *targets* de sobreexpresión, indirectamente relacionados con la producción de chaxamicinas y chaxalactinas, para la producción de dichos compuestos según las predicciones realizadas por el modelo iVR1007[43].

Se ha demostrado que la inactivación de la proteína *GlnB*, que inhibe las enzimas acetil-CoA carboxilasa y propionil-CoA carboxilasa, provoca un aumento de malonil-CoA y el (S)-2-metilmalonil-CoA, lo que produjo un aumento en la producción del antibiótico ascomicina en *S. hygroscopicus* sin afectar el crecimiento del microorganismo [84]. En *S. leeuwenhoekii*, la producción de la proteína *glnB* está mediada por el gen *Sle20620*[85], por lo que llevar a cabo una delección de dicho gen podría provocar un aumento de chaxamicinas y chaxalactinas.

Un estudio realizado en *S. albus* J1074 probó el efecto de 8 delecciones conjuntas de los genes *sco6473*, *sco6472*, *sco2776*, *sco4380*, *sco4926*, *sco4869*, y *sco4089* sobre la producción de malonil-CoA and (S)-2-metilmalonil-CoA, las que consiguieron aumentar la producción de pamamicina mediante el aumento de los precursores mencionados[86]. Dichos genes poseen sus homólogos en *S. leeuwenhoekii*: *sle13020*[87], *sle13030*[88], *sle44640*[89], *sle39820*[90], *sle27500*[45], *sle22410*[91] y *sle28060*[92] (ambos indicados por el modelo iVR1007 como candidatos para ser sobreexpresados), y *sle37550*[93], respectivamente. Por ello, se podría evaluar si dichas delecciones, realizadas de forma análoga a la utilizada en el estudio citado, impactan la producción de metabolitos especializados.

La inactivación del gen *bkdR* en *Streptomyces albus* J1074/R2 produjo un aumento en la producción de pamamicina y sus derivados, al suplementar el medio de cultivo con L-valina [94]. No se encontró el gen homólogo para *S. leeuwenhoekii*, por lo que, por el momento, no se puede utilizar dicha delección para aumentar la producción de chaxamicinas y chaxalactinas.

Promotores inducibles y otras modificaciones

Se han utilizado exitosamente en *Streptomyces* promotores inducibles mediante tetraciclina para *S. coelicolor* [95], cumato y oxitetraciclina para *S. coelicolor* y *S. venezuelae*, respectivamente [96], thiostreptona en *S. lividans* [97], y resorcinol y cumato en *S. albus* [98]. Si se utilizan promotores inducibles, los genes solo se expresarán cuando sea requerido para que produzcan los compuestos deseados y, por lo tanto, no representarán un aumento relevante en la carga metabólica de la bacteria durante su etapa de crecimiento. Por ello, representan una estrategia prometedora para introducir la sobreexpresión de múltiples genes en una misma cepa sin afectar su viabilidad a causa de la carga metabólica adicional.

Estrategias alternativas

Se pueden utilizar métodos distintos de sobreexpresiones o delecciones para aumentar la producción de compuestos bioactivos, aunque no estén dirigidas a un metabolito en particular. Entre ellos, se ha utilizado la optimización del medio de cultivo mediante el método OSMAC, como se mostró en la sección de introducción, provocando la producción de distintos metabolitos en diferentes cantidades, mediante la activación de *clusters* genéticos silenciosos. Para ello, se varía la temperatura, pH, salinidad, radiación UV y composición del medio de cultivo con el objetivo de encontrar las condiciones que produce el mayor aumento de metabolitos especializados.

Son ejemplos adicionales del uso de este método en *Streptomyces* la producción de antimicinas en medio R5A y SM30 para *S. argillaceus* [99], tetramatos macrolactámicos policíclicos (PTMs) y mirubactina en medios GYM, 523 modificado, LB, NA y SM para *S. pulveraceus* ES16 [100], y suguramidas en medio SCB para *Streptomyces* sp. BRB081[101].

Otra opción es la manipulación de genes reguladores globales, e involucrados en procesos fisiológicos basales, como, por ejemplo, la ingeniería de ribosomas. Se ha reportado el uso de esta técnica[102] mediante la sobreexpresión del gen *rpsL* que codifica para la proteína ribosomal S12 [103], cuya modificación ha activado o potenciado la producción de compuestos bioactivos en *Streptomyces* a través del aumento general de la síntesis proteica, en conjunto con una mayor estabilidad de los ribosomas 70S [103][104].

Algunas mutaciones en el gen *rpsL* para *Streptomyces* provocaron la producción de piperidamicina, un metabolito especializado que no se había producido en cultivos de laboratorio[105]. Ya que esta técnica se ha utilizado satisfactoriamente en *Streptomyces*, podría considerarse como una opción viable para la aumentar la producción de metabolitos especializados en *S. leeuwenhoekii* C34, y descubrir potenciales metabolitos que no se han detectado anteriormente en cultivos de laboratorio. Se recomienda la aplicación del método OSMAC después de aplicar ingeniería de ribosomal, ya que de esta forma podría detectarse una mayor variedad de metabolitos especializados en cada medio, y en mayor cantidad.

En otros estudios se ha utilizado la técnica de co-cultivo entre distintas cepas de *Streptomyces* y otros microorganismos tales como *Acanthamoeba polyphaga* y *Penicillium spinulosum*[106], *Stachybotrys chartaru* y *Stachybotrys chartarum*[107], y *Aspergillus versicolor* y *Penicillium spinulosum*[108], *Bacillus mycoides*[109], *Alteromonas* sp. KNS-16 [110], *Aspergillus flavipes*[111], y *Rhinoctadiella similis* 35 [112]. En ellos, se descubrió que en co-cultivo, los microorganismos involucrados aumentan significativamente la producción de metabolitos especializados, que pueden tener un rol clave en relaciones simbióticas o de competencia por espacio y nutrientes limitados[113]

Dados los antecedentes recién descritos, puede resultar interesante probar en conjunto combinaciones de las estrategias mencionadas, y evaluar el efecto que pueden tener sobre la producción de chaxamicinas y chaxalactinas.

Por ejemplo, se puede comenzar por realizar la sobreexpresión de los genes *Sle10250* y *Sle47660* para aumentar la producción de AHBA y malonil-CoA, respectivamente, en *S. leeuwenhoekii* C34 C2, cepa que se denominará *S. leeuwenhoekii* C34 C4. Luego, se pueden incorporar las modificaciones en el gen *rpsL* en *S. leeuwenhoekii* C34 C4 para aumentar la síntesis proteica, creando la nueva cepa *S. leeuwenhoekii* C34 C5.

Después de eso, puede aplicarse el método OSMAC para determinar el medio de cultivo óptimo dado el aumento de la síntesis proteica. Y finalmente, se puede estudiar el impacto de crecer *S. leeuwenhoekii* C34 *wildtype*, y cada una de las cepas conjugantes, C4 y C5,

en co-cultivo (por ejemplo, con *Aspergillus versicolor*), en el medio óptimo. Se pueden realizar comparaciones de producción de metabolitos especializados entre las cepas mencionadas para los escenarios con y sin co-cultivo para determinar el efecto de cada modificación.

También, se pueden utilizar los promotores inducibles mencionados para llevar a cabo la sobreexpresión conjunta de *sle10250* y *sle47660*, y de esa forma, evitar aumentar el estrés metabólico. Además, se puede probar la sobreexpresión y delección de los genes exhibidos en los otros estudios mencionados, para intentar canalizar el uso de (S)-2-metilmalonil-CoA, malonil-CoA y AHBA hacia la producción de chaxamicinas y chaxalactinas.

4. Conclusiones

Tras haber estudiado las predicciones del modelo de escala genómica iVR1007 y haber estudiado las rutas metabólicas de producción de chaxamicinas y chaxalactinas, se seleccionó la reacción de producción (S)-2-metilmalonil-CoA, precursor clave para la producción de chaxamicinas y chaxalactinas, a partir de propanoil-CoA. Se aumentó el número de copias de los genes *sle39830* y *sle27500* bajo el promotor constitutivo *ermE** en *S. leeuwenhoekii* C34 para aumentar la disponibilidad de la enzima propanoil-CoA carboxilasa, que media la reacción mencionada, lo que debiera ocasionar una mayor producción de chaxamicinas y chaxalactinas.

Se logró la obtención del reservorio biológico de los plásmidos recombinantes *Sle39830*-pIJ10257 y *Sle27500*-pIJ12551, que contienen los genes seleccionados para su sobreexpresión, en *E. coli* DH5 α . También, se logró la conjugación de *S. leeuwenhoekii* C34 con dichos plásmidos recombinantes.

Con respecto al último objetivo, se llevó a cabo la identificación de metabolitos especializados y la comparación cualitativa de la producción entre *S. leeuwenhoekii* C34 y *S. leeuwenhoekii* C34 C2 por medio del estudio de los bioensayos realizados contra *M. luteus* y del estudio de los perfiles metabólicos generados a partir de cada cepa. No fue posible la cuantificación debido a la falta de estándares internos para el HPLC MS/MS.

Si bien no se probó experimentalmente que las copias de los genes *sle39830* y *sle27500* insertadas en el genoma de *S. leeuwenhoekii* C34 se estuvieran expresando, dado que están bajo un promotor constitutivo, en teoría, dichos genes deberían expresarse constantemente. Tras analizar distintos factores que podrían haber perjudicado la expresión de los genes insertados, se concluyó la carga metabólica adicional, asociada al aumento del número de copias, y la presunta sobreexpresión de los genes *sle39830* y *sle27500*, no debería ser significativa, y por lo tanto, no debería afectar la expresión de los genes mencionados. Adicionalmente, se concluyó que, de existir, los efectos de la formación de cuerpos de inclusión, o de inhibición por producto, no deberían ser mayores en la cepa conjugante que en la cepa nativa.

El potencial aumento de (S)-2-metilmalonil-CoA, generado por la presunta sobreexpresión de los genes *sle39830* y *sle27500*, no es suficiente como la única modificación o estrategia para aumentar la producción de agentes terapéuticos en *S. leeuwenhoekii* C34, ya que no hubo diferencias significativas entre la bioactividad contra *M. luteus*, producida por ambas cepas. Adicionalmente, el análisis de los perfiles metabólicos generados para ambas cepas mostró que, dada la alta desviación estándar de los datos, no se puede afirmar que hubo diferencias significativas en la producción de metabolitos especializados entre ambas cepas de *S. leeuwenhoekii* C34.

La relevancia de la elevada desviación estándar de los datos fue estudiada mediante la prueba de hipótesis para diferencias de medias, con lo que se determinó que, teóricamente y mientras se cumplan los supuestos, si se aumenta el número de réplicas, se podría asegurar con 95% de confianza que existen diferencias pequeñas entre los resultados de ambas cepas. Es decir, que *S. leeuwenhoekii* C34 produjo más metabolitos especializados por unidad de concentración de biomasa, pero menos biomasa que *S. leeuwenhoekii* C34 C2.

Tras llevar a cabo el análisis de rutas metabólicas, se observó que dada la ubicuidad de la reacción de producción de (S)-2-metilmalonil-CoA a partir de propanoil-CoA en el metabolismo de *S. leeuwenhoekii* C34, el aumento de (S)-2-metilmalonil-CoA no se concentró en la producción de metabolitos especializados, sino que se distribuyó entre los procesos metabólicos que dependen del ciclo del citrato. A esto se suma la necesidad de sobreexpresar en conjunto los genes asociados a la producción de malonil-CoA y AHBA, precursores clave para la producción de chaxamicinas y chaxalactinas, para poder lograr un aumento significativo en la producción de dichos metabolitos especializados. Lo anterior se considera la causa principal de que no se haya obtenido mayor abundancia de chaxamicinas y chaxalactinas en *S. leeuwenhoekii* C34 C2, con respecto a la cepa nativa.

Se discutieron diversas estrategias utilizadas en *Streptomyces* para aumentar la producción de metabolitos especializados, entre las que se encuentran la ingeniería ribosomal para aumentar la síntesis proteica en general y permitir detección de compuestos no observados, el uso de promotores inducibles para disminuir la carga metabólica, deleciones complementarias para dirigir el flujo de precursores clave hacia las rutas metabólicas de producción de chaxamicinas y chaxalactinas, la incubación de *S. leeuwenhoekii* en co-cultivo con otros microorganismos para estimular la producción de metabolitos especializados.

Para estudios futuros, se propone el uso conjunto de las estrategias recién mencionadas, en una cepa de *S. leeuwenhoekii* C34 que posea la sobreexpresión de los genes correspondientes a los 3 precursores clave en las rutas metabólicas de producción de chaxamicinas y chaxalactinas (malonil-CoA, AHBA y (S)-2-metilmalonil-CoA), con el objetivo de maximizar la producción de chaxamicinas y chaxalactinas.

5. Bibliografía

- [1] S. M. Collins, M. Surette, and P. Bercik, “The interplay between the intestinal microbiota and the brain,” *Nature Reviews Microbiology*, vol. 10, no. 11. Nature Publishing Group, pp. 735–742, 24-Nov-2012.
- [2] C. L. Maynard, C. O. Elson, R. D. Hatton, and C. T. Weaver, “Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system,” *Nature*, vol. 489, no. 7415. Nature Publishing Group, pp. 231–241, 13-Sep-2012.
- [3] “Gérmenes: entiende las bacterias, los virus y las infecciones, y protégete de ellos - Mayo Clinic.” [Online]. Available: <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/infectious-diseases/in-depth/germs/art-20045289>. [Accessed: 06-Jan-2019].
- [4] F. S. and I. S. United States Department of Agriculture, “Bacterias que Causan Enfermedades Transmitidas por Alimentos.” [Online]. Available: <https://www.fsis.usda.gov/wps/portal/informational/en-espanol/hojasinformativas/enfermedades-por-alimentos/enfermedades-transmitidas-alimentos>. [Accessed: 15-Apr-2020].
- [5] “Paul Ehrlich | Science History Institute.” [Online]. Available: <https://www.sciencehistory.org/historical-profile/paul-ehrlich>. [Accessed: 24-Mar-2019].
- [6] “The history of antibiotics | Microbiology Society.” [Online]. Available: <https://microbiologysociety.org/education-outreach/antibiotics-unearthed/antibiotics-and-antibiotic-resistance/the-history-of-antibiotics.html>. [Accessed: 24-Mar-2019].
- [7] “WHO EMRO | What is the difference between antibiotic and antimicrobial resistance? | Antimicrobial resistance | Health topics.” [Online]. Available: <http://www.emro.who.int/health-topics/drug-resistance/what-is-the-difference-between-antibiotic-and-antimicrobial-resistance.html>. [Accessed: 30-Mar-2019].
- [8] H. Nankervis, K. S. Thomas, F. M. Delamere, S. Barbarot, N. K. Rogers, and H. C. Williams, “Chapter 6: Antimicrobials including antibiotics, antiseptics and antifungal agents - Scoping systematic review of treatments for eczema,” *Program. GRANTS Appl. Res.*, vol. 4, no. 7, p. 89, 2016.
- [9] E. Stephens and W. C. Shiel, “Antibiotics - INFECTIONS CENTER | TOPIC GUIDE,” 2021. [Online]. Available: https://www.emedicinehealth.com/antibiotics/article_em.htm. [Accessed: 30-Mar-2019].
- [10] “antibiotic | Origin and meaning of antibiotic by Online Etymology Dictionary.” [Online]. Available: <https://www.etymonline.com/word/antibiotic>. [Accessed: 30-Mar-2019].
- [11] Mayo Clinic, “Antibiotics: Are you misusing them? - Healthy Lifestyle | Consumer health.” [Online]. Available: <https://www.mayoclinic.org/healthy-lifestyle/consumer-health/in-depth/antibiotics/art-20045720>. [Accessed: 24-Mar-2019].
- [12] “Causes of Antimicrobial (Drug) Resistance | NIH: National Institute of Allergy and Infectious Diseases.” [Online]. Available: <https://www.niaid.nih.gov/research/antimicrobial-resistance-causes>. [Accessed: 14-Mar-

2019].

- [13] “Antibiotic resistance | World Health Organization,” 2020. [Online]. Available: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>. [Accessed: 14-Jun-2018].
- [14] E. Stackebrandt and C. R. Woese, “Towards a phylogeny of the actinomycetes and related organisms,” *Curr. Microbiol.*, vol. 5, no. 4, pp. 197–202, Jul. 1981.
- [15] K. Tiwari and R. K. Gupta, “Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics,” *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 32, no. 2, pp. 108–132, Jun. 2012.
- [16] R. Baltz, “Antimicrobials from actinomycetes: Back to the future,” *Microbe*, no. 2, pp. 125–131, 2007.
- [17] M. Goodfellow and S. T. Williams, “Ecology of Actinomycetes,” *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 37, no. 1, pp. 189–216, Oct. 1983.
- [18] A. Hasani, A. Kariminik, and K. Issazadeh, “Streptomyces: Characteristics and Their Antimicrobial Activities,” *Int. J. Adv. Biol. Biomed. Res.*, vol. 2, no. 1, pp. 63–75, 2014.
- [19] A. Lazzarini, L. Cavaletti, G. Toppo, and F. Marinelli, “Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics,” *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 78, no. 3/4, pp. 399–405, 2000.
- [20] K. Busarakam, A. T. Bull, G. Girard, D. P. Labeda, G. P. van Wezel, and M. Goodfellow, “*Streptomyces leeuwenhoekii* sp. nov., the producer of chaxalactins and chaxamycins, forms a distinct branch in *Streptomyces* gene trees,” *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 105, no. 5, pp. 849–861, May 2014.
- [21] T. A. Taylor and C. G. Unakal, “*Staphylococcus Aureus*,” *Food Microbiol. Fundam. Front.*, pp. 555–584, Jul. 2021.
- [22] M. Conrad Stöppler and W. C. Shiel, “Staph (Staphylococcus) Infection | MedicineNet,” 2021. [Online]. Available: https://www.medicinenet.com/staph_infection/article.htm#what_is_staphylococcus_what_causes_a_staph_infection. [Accessed: 14-Jun-2018].
- [23] A. T. Bull and J. A. Asenjo, “Microbiology of hyper-arid environments: recent insights from the Atacama Desert, Chile,” *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 103, no. 6, pp. 1173–1179, Jun. 2013.
- [24] M. E. Rateb *et al.*, “Chaxamycins A–D, Bioactive Ansamycins from a Hyper-arid Desert *Streptomyces* sp.,” *J. Nat. Prod.*, vol. 74, no. 6, pp. 1491–1499, 2011.
- [25] M. E. Rateb *et al.*, “Diverse Metabolic Profiles of a *Streptomyces* Strain Isolated from a Hyper-arid Environment,” *J. Nat. Prod.*, vol. 74, no. 9, pp. 1965–1971, Sep. 2011.
- [26] R. Taroco, V. Seija, and R. Vignoli, “Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica - Temas de bacteriología y virología médica,” *Temas Bacteriol. y Virol. Médica*, vol. 36, no. 1, pp. 663–669, 2006.

- [27] E. L. F. de Bobadilla, A. P. Reig, and M. R. Creixems, "Hemocultivos | Procedimientos en Microbiología Clínica - Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica." 2003.
- [28] "LA UTILIDAD DE LOS ANTIBIOGRAMAS - MiProma." [Online]. Available: <http://miproma.es/la-utilidad-de-los-antibiogramas/>. [Accessed: 19-Mar-2019].
- [29] K. Jayaprakash and M. Vijayalakshmi, "Optimization of Antimicrobial Metabolites Production by *Streptomyces albidoflavus*," *Medwell Journals. Res. J. Pharmacol.*, vol. 2, no. 1, pp. 4–7, 2008.
- [30] A. I. Khattab, E. H. Babiker, and H. A. Saeed, "Streptomyces: isolation, optimization of culture conditions and extraction of secondary metabolites," *Int. Curr. J.*, vol. 5, no. 3, pp. 27–32, 2016.
- [31] G. J. E. Baart and D. E. Martens, "Genome-Scale Metabolic Models: Reconstruction and Analysis," in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, vol. 799, 2012, pp. 107–126.
- [32] J. D. Orth, I. Thiele, and B. Ø. Palsson, "What is flux balance analysis?," *Nat. Biotechnol.*, vol. 28, no. 3, pp. 245–248, Mar. 2010.
- [33] "4. Simulating with FBA | Documentation for COBRApy." [Online]. Available: <https://cobrapy.readthedocs.io/en/latest/simulating.html>.
- [34] I. Borodina, P. Krabben, and J. Nielsen, "Genome-scale analysis of *Streptomyces coelicolor*A3(2) metabolism," *Cold Spring Harb. Lab. Press*, no. 5, pp. 820–829, 2005.
- [35] P.-J. D'Huys, I. Lule, D. Vercammen, J. Anné, J. F. Van Impe, and K. Bernaerts, "Genome-scale metabolic flux analysis of *Streptomyces lividans* growing on a complex medium," *J. Biotechnol.*, vol. 161, no. 1, pp. 1–13, Sep. 2012.
- [36] M. T. Alam *et al.*, "Metabolic modeling and analysis of the metabolic switch in *Streptomyces coelicolor*," *BMC Genomics*, vol. 11, no. 1, p. 202, Mar. 2010.
- [37] M. E. Bushell *et al.*, "The use of genome scale metabolic flux variability analysis for process feed formulation based on an investigation of the effects of the *zwf* mutation on antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 39, no. 6, pp. 1347–1353, Oct. 2006.
- [38] V. Razmilic, J. A. Asenjo, B. Andrews, and J. F. Castro, "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* Vol. 115, no.7, pp. 1815-1828.
- [39] K. A. Kaiser, C. E. Merrywell, F. Fang, and C. K. Larive, "Metabolic Profiling," in *NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis*, Elsevier, 2008, pp. 233–267.
- [40] C. J. Clarke and J. N. Haselden, "Metabolic Profiling as a Tool for Understanding Mechanisms of Toxicity," *Toxicol. Pathol.*, vol. 36, no. 1, pp. 140–147, Jan. 2008.
- [41] Q. Gu, J. J. Spinelli, T. B. J. Dummer, T. E. McDonald, S. C. Moore, and R. A. Murphy, "Metabolic profiling of adherence to diet, physical activity and body size recommendations

for cancer prevention,” *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–11, Dec. 2018.

- [42] J. F. Castro, V. Razmilic, J. P. Gomez-Escribano, B. Andrews, J. A. Asenjo, and M. J. Bibb, “Identification and heterologous expression of the chaxamycin biosynthesis gene cluster from *Streptomyces leeuwenhoekii*,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 81, no. 17, pp. 5820–5831, Sep. 2015.
- [43] V. Razmilic, “METABOLISM ANALYSIS OF *Streptomyces leeuwenhoekii* C34 WITH A GENOME SCALE MODEL AND IDENTIFICATION OF BIOSYNTHETIC GENES OF SPECIALISED METABOLITES BY GENOME MINING,” Ph.D. Thesis University of Chile, 2017.
- [44] “*Streptomyces leeuwenhoekii*: sle_39830 T04414 | KEGG.” [Online]. Available: https://www.kegg.jp/entry/sle:sle_39830. [Accessed: 27-Aug-2021].
- [45] “*Streptomyces leeuwenhoekii*: sle_27500 T04414 |KEGG.” [Online]. Available: https://www.kegg.jp/dbget-bin/www_bget?sle:sle_27500. [Accessed: 27-Aug-2021].
- [46] “About: Staden Package |DBpedia.” [Online]. Available: https://dbpedia.org/page/Staden_Package. [Accessed: 30-Aug-2021].
- [47] “Staden Package Home | SourceForge.” [Online]. Available: <http://staden.sourceforge.net/>. [Accessed: 30-Aug-2021].
- [48] J. F. Castro, “IDENTIFICATION OF THE CHAXAMYCIN AND CHAXALACTIN BIOSYNTHESIS GENES THROUGH GENOME MINING OF *Streptomyces leeuwenhoekii* C34 AND HETEROLOGOUS PRODUCTION OF CHAXAMYCINS IN *Streptomyces coelicolor* M1152,” Ph.D. Thesis University de Chile, 2015.
- [49] J. Franco Castro Valeria Razmilic Juan Pablo Gomez-Escribano Barbara Andrews Juan Asenjo Mervyn Bibb, “The ‘gifted’ actinomycete *Streptomyces leeuwenhoekii*,” *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 111, pp. 1433–1448, 2018.
- [50] M. Demko, L. Chrást, P. Dvořák, J. Damborský, and D. Šafránek, “Computational Modelling of Metabolic Burden and Substrate Toxicity in *Escherichia coli* Carrying a Synthetic Metabolic Pathway,” *Microorganisms*, vol. 7, no. 11, pp. 553–582, Nov. 2019.
- [51] G. Wu, Q. Yan, J. A. Jones, Y. J. Tang, S. S. Fong, and M. A. G. Koffas, “Metabolic Burden: Cornerstones in Synthetic Biology and Metabolic Engineering Applications,” *Trends Biotechnol.*, vol. 34, no. 8, pp. 652–664, Aug. 2016.
- [52] B. R. Glick, “Metabolic load and heterologous gene expression,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 13, no. 2, pp. 247–261, Jan. 1995.
- [53] S. Charrier *et al.*, “Quantification of lentiviral vector copy numbers in individual hematopoietic colony-forming cells shows vector dose-dependent effects on the frequency and level of transduction,” *Gene Ther.*, vol. 18, pp. 479–487, 2011.
- [54] E. C. Ong, P. Smidt, and J. T. McGrew, “Limiting the metabolic burden of recombinant protein expression during selection yields pools with higher expression levels,” *Biotechnol. Prog.*, vol. 35, no. 5, p. e2839, Sep. 2019.
- [55] “How do I know if my plasmid is a high- or low copy number type? - QIAGEN.” [Online].

Available: <https://www.qiagen.com/ch/resources/faq?id=1f42840e-fbd7-4734-b0cd-e17372a9e5a4&lang=en>. [Accessed: 08-Jan-2022].

- [56] S. K. Bhattacharya and A. K. Dubey, "Metabolic burden as reflected by maintenance coefficient of recombinant *Escherichia coli* overexpressing target gene," *Biotechnol. Lett.*, vol. 17, no. 11, pp. 1155–1160, Nov. 1995.
- [57] "KEGG COMPOUND: C00683 (S)-Methylmalonyl-CoA." [Online]. Available: https://www.kegg.jp/dbget-bin/www_bget?C00683. [Accessed: 27-Aug-2021].
- [58] "KEGG ORTHOLOGY: K01965 propionyl-CoA carboxylase alpha chain." [Online]. Available: <https://www.kegg.jp/entry/K01965>. [Accessed: 27-Aug-2021].
- [59] "KEGG ORTHOLOGY: K01966 propionyl-CoA carboxylase beta chain." [Online]. Available: <https://www.kegg.jp/entry/K01966>. [Accessed: 27-Aug-2021].
- [60] "KEGG PATHWAY: Valine, leucine and isoleucine degradation - *Streptomyces leeuwenhoekii*." [Online]. Available: https://www.kegg.jp/pathway/sle00280+sle_39830. [Accessed: 31-Aug-2021].
- [61] "KEGG PATHWAY: Glyoxylate and dicarboxylate metabolism - *Streptomyces leeuwenhoekii*." [Online]. Available: https://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?org_name=sle&mapno=00630&mapscale=&show_description=hide. [Accessed: 03-Jun-2019].
- [62] "KEGG PATHWAY: Propanoate metabolism - *Streptomyces leeuwenhoekii*." [Online]. Available: https://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?sle00640. [Accessed: 27-Aug-2021].
- [63] "KEGG PATHWAY: Biosynthesis of secondary metabolites - *Streptomyces leeuwenhoekii*." [Online]. Available: https://www.kegg.jp/pathway/sle01110+sle_39830. [Accessed: 31-Aug-2021].
- [64] "KEGG PATHWAY: Carbon metabolism - *Streptomyces leeuwenhoekii*." [Online]. Available: https://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?sle01200. [Accessed: 27-Aug-2021].
- [65] "PDB-101: Molecule of the Month: Citric Acid Cycle | Protein Data Bank." [Online]. Available: <https://pdb101.rcsb.org/motm/154>. [Accessed: 01-Sep-2021].
- [66] D. Voet, J. G. Voet, and C. W. Pratt, Chapter 17: The Citric Acid Cycle In: *Fundamentals of Biochemistry*, Second. John Wiley and Sons, Inc, 2006. pp. 558-579.
- [67] L. Stryer, "*Citric acid cycle*". In: *Biochemistry*, Fourth. New York: W. H. Freeman and Company, 1995. pp. 509–527, 569–579, 614–616, 638–641, 732–735, 739
- [68] "KEGG T04414: cxmK." [Online]. Available: <https://www.genome.jp/entry/sle:cxmK>. [Accessed: 13-Nov-2021].
- [69] "KEGG T04414: sle_47660." [Online]. Available: https://www.genome.jp/entry/sle:sle_47660. [Accessed: 13-Nov-2021].
- [70] X. Wang, X. Ning, Q. Zhao, Q. Kang, and L. Bai, "Improved PKS Gene Expression With Strong

- Endogenous Promoter Resulted in Geldanamycin Yield Increase," *Biotechnol. J.*, vol. 12, no. 11, p. 1700321, Nov. 2017.
- [71] S. Chen *et al.*, "Biosynthesis of ansatrienin (mycotrienin) and naphthomycin," *Eur. J. Biochem.*, vol. 261, no. 1, pp. 98–107, Mar. 1999.
- [72] H. G. Floss, T.-W. Yu, and K. Arakawa, "The biosynthesis of 3-amino-5-hydroxybenzoic acid (AHBA), the precursor of mC 7 N units in ansamycin and mitomycin antibiotics: a review," *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. 64, pp. 35–44, 2011.
- [73] "KEGG T04414: cxmG." [Online]. Available: <https://www.kegg.jp/entry/sle:cxmG>. [Accessed: 13-Nov-2021].
- [74] "KEGG T04414: cxmH." [Online]. Available: <https://www.kegg.jp/entry/sle:cxmH>. [Accessed: 13-Nov-2021].
- [75] "KEGG T04414: cxmI." [Online]. Available: <https://www.kegg.jp/entry/sle:cxmI>. [Accessed: 13-Nov-2021].
- [76] "KEGG T04414: cxmJ." [Online]. Available: <https://www.kegg.jp/entry/sle:cxmJ>. [Accessed: 13-Nov-2021].
- [77] "KEGG T04414: cxmL." [Online]. Available: <https://www.kegg.jp/entry/sle:cxmL>. [Accessed: 13-Nov-2021].
- [78] "KEGG T04414: cxmM." [Online]. Available: <https://www.kegg.jp/entry/sle:cxmM>. [Accessed: 13-Nov-2021].
- [79] "KEGG T04414: cxmN." [Online]. Available: <https://www.kegg.jp/entry/sle:cxmN>. [Accessed: 13-Nov-2021].
- [80] Y. G. Ryu, M. J. Butler, K. F. Chater, and K. J. Lee, "Engineering of Primary Carbohydrate Metabolism for Increased Production of Actinorhodin in *Streptomyces coelicolor*," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 72, no. 11, p. 7132, Nov. 2006.
- [81] D. P. Labeda, "Transfer of the type strain of *Streptomyces erythraeus* (Waksman 1923) Waksman and Henrici 1948 to the genus *Saccharopolyspora* Lacey and Goodfellow 1975 as *Saccharopolyspora erythraea* sp. nov., and designation of a neotype strain for *Streptomyces erythraeus*," *Int. J. Syst. Bacteriol.*, vol. 37, no. 1, pp. 19–22, Jan. 1987.
- [82] A. R. Reeves, I. A. Brikun, W. H. Cernota, B. I. Leach, M. C. Gonzalez, and J. M. Weber, "Effects of methylmalonyl-CoA mutase gene knockouts on erythromycin production in carbohydrate-based and oil-based fermentations of *Saccharopolyspora erythraea*," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 33, no. 7, pp. 600–609, Jul. 2006.
- [83] "KEGG ENZYME: 5.4.99.2 methylmalonyl-CoA mutase." [Online]. Available: https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ec:5.4.99.2. [Accessed: 12-Nov-2021].
- [84] P. Wang *et al.*, "Increasing the Ascomycin Yield by Relieving the Inhibition of Acetyl/Propionyl-CoA Carboxylase by the Signal Transduction Protein GlnB," *Front. Microbiol.*, vol. 12, p. 1289, May 2021.

- [85] "KEGG T04414: sle_20620." [Online]. Available: https://www.kegg.jp/entry/sle:sle_20620. [Accessed: 12-Nov-2021].
- [86] N. Gummerlich *et al.*, "Engineering-the-precursor-pool-to-modulate-the-production-of-pamamycins-in-the-heterologous-host-s-albus-j1074," *Metabolic engineering*, vol. 67, pp. 11-18, Sep. 2021.
- [87] "KEGG T04414: sle_13020." [Online]. Available: https://www.kegg.jp/entry/sle:sle_13020. [Accessed: 12-Nov-2021].
- [88] "KEGG T04414: sle_13030." [Online]. Available: https://www.kegg.jp/entry/sle:sle_13030. [Accessed: 12-Nov-2021].
- [89] "KEGG T04414: sle_44640." [Online]. Available: https://www.kegg.jp/entry/sle:sle_44640. [Accessed: 12-Nov-2021].
- [90] "KEGG T04414: sle_39820." [Online]. Available: https://www.kegg.jp/entry/sle:sle_39820. [Accessed: 12-Nov-2021].
- [91] "KEGG T04414: sle_22410." [Online]. Available: https://www.kegg.jp/entry/sle:sle_22410. [Accessed: 12-Nov-2021].
- [92] "KEGG T04414: sle_28060." [Online]. Available: https://www.kegg.jp/entry/sle:sle_28060. [Accessed: 12-Nov-2021].
- [93] "KEGG T04414: sle_37550." [Online]. Available: https://www.kegg.jp/entry/sle:sle_37550. [Accessed: 12-Nov-2021].
- [94] L. Gläser *et al.*, "Superior production of heavy pamamycin derivatives using a bkdR deletion mutant of *Streptomyces albus* J1074/R2," *Microb. Cell Fact.*, vol. 20, no. 1, pp. 1–16, Dec. 2021.
- [95] A. Rodríguez-García, P. Combes, R. Pérez-Redondo, M. C. A. Smith, and M. C. M. Smith, "Natural and synthetic tetracycline-inducible promoters for use in the antibiotic-producing bacteria *Streptomyces*," *Nucleic Acids Res.*, vol. 33, no. 9, pp. e87, May 2005.
- [96] S. Li, J. Wang, W. Xiang, K. Yang, Z. Li, and W. Wang, "An Autoregulated Fine-Tuning Strategy for Titer Improvement of Secondary Metabolites Using Native Promoters in *Streptomyces*," *ACS Synth. Biol.*, vol. 7, no. 2, pp. 522–530, Feb. 2018.
- [97] E. Takano, J. White, C. J. Thompson, and M. J. Bibb, "Construction of thiostrepton-inducible, high-copy-number expression vectors for use in *Streptomyces* spp.," *Gene*, vol. 166, no. 1, pp. 133–137, Dec. 1995.
- [98] L. Horbal, V. Fedorenko, and A. Luzhetskyy, "Novel and tightly regulated resorcinol and cumate-inducible expression systems for *Streptomyces* and other actinobacteria," *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014 9820, vol. 98, no. 20, pp. 8641–8655, Jul. 2014.
- [99] A. Becerril *et al.*, "Uncovering production of specialized metabolites by *Streptomyces argillaceus*: Activation of cryptic biosynthesis gene clusters using nutritional and genetic approaches," *PLoS One*, vol. 13, no. 5, p. e0198145, May 2018.

- [100] R. Armin, S. Zühlke, F. Mahnkopp-Dirks, T. Winkelmann, and S. Kusari, "Evaluation of Apple Root-Associated Endophytic *Streptomyces pulveraceus* Strain ES16 by an OSMAC-Assisted Metabolomics Approach," *Front. Sustain. Food Syst.*, vol. 5, p. 60, Mar. 2021.
- [101] M. M. P. Tangerina *et al.*, "Metabolomic study of marine *Streptomyces* sp.: Secondary metabolites and the production of potential anticancer compounds," *PLoS One*, vol. 15, no. 12, p. e0244385, Dec. 2020.
- [102] A. A. Shaikh, L. F. Nothias, S. K. Srivastava, P. C. Dorrestein, and K. Tahlan, "Specialized metabolites from ribosome engineered strains of *streptomyces clavuligerus*," *Metabolites*, vol. 11, no. 4, pp. 239-257, Apr. 2021.
- [103] S. Zhu, Y. Duan, and Y. Huang, "The Application of Ribosome Engineering to Natural Product Discovery and Yield Improvement in *Streptomyces*," *Antibiotics*, vol. 8, no. 3, pp. 133-149, Sep. 2019.
- [104] Y. Okamoto-Hosoya, T. Hosaka, and K. Ochi, "An aberrant protein synthesis activity is linked with antibiotic overproduction in *rpsL* mutants of *Streptomyces coelicolor* A3(2)," *Microbiology*, vol. 149, no. Pt 11, pp. 3299–3309, 2003.
- [105] T. Hosaka *et al.*, "Antibacterial discovery in actinomycetes strains with mutations in RNA polymerase or ribosomal protein S12," *Nat. Biotechnol.*, vol. 27, no. 5, pp. 462–464, May 2009.
- [106] T. Yli-Pirilä, K. Huttunen, A. Nevalainen, M. Seuri, and M.-R. Hirvonen, "Effects of co-culture of amoebae with indoor microbes on their cytotoxic and proinflammatory potential," *Environ. Toxicol.*, vol. 22, no. 4, pp. 357–367, Aug. 2007.
- [107] P. M. (Penttinen), J. Pelkonen, M. Tapanainen, J. Mäki-Paakkanen, P. I. Jalava, and M.-R. Hirvonen, "Co-cultivated damp building related microbes *Streptomyces californicus* and *Stachybotrys chartarum* induce immunotoxic and genotoxic responses via oxidative stress," <http://dx.doi.org/10.1080/08958370802526873>, vol. 21, no. 10, pp. 857–867, 2009.
- [108] T. Murtoniemi, P. Penttinen, A. Nevalainen, and M.-R. Hirvonen, "Effects of Microbial Cocultivation on Inflammatory and Cytotoxic Potential of Spores," <http://dx.doi.org/10.1080/08958370500189669>, vol. 17, no. 12, pp. 681–693, Nov. 2008.
- [109] L. Yu, Z. Hu, and Z. Ma, "Production of bioactive tryptamine derivatives by co-culture of marine *Streptomyces* with *Bacillus mycoides*," <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2015.1005619>, vol. 29, no. 22, pp. 2087–2091, Nov. 2015.
- [110] J. Y. Cho and M. S. Kim, "Induction of Antifouling Diterpene Production by *Streptomyces cinnabarinus* PK209 in Co-Culture with Marine-Derived *Alteromonas* sp. KNS-16," *OUP*, vol. 76, no. 10, pp. 1849–1854, 2014.
- [111] L. Yu, W. Ding, and Z. Ma, "Induced production of cytochalasins in co-culture of marine fungus *Aspergillus flavipes* and actinomycete *Streptomyces* sp.," <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2015.1136910>, vol. 30, no. 15, pp. 1718–1723, 2016.

- [112] M. Yu *et al.*, “New metabolites from the Co-culture of marine-derived actinomycete streptomyces rochei MB037 and fungus rhinocladiella similis35,” *Front. Microbiol.*, vol. 10, no. 915, May 2019.
- [113] K. Scherlach and C. Hertweck, “Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms,” *Org. Biomol. Chem.*, vol. 7, no. 9, pp. 1753–1760, May 2009.
- [114] D. J. MacNeil *et al.*, “Complex organization of the Streptomyces avermitilis genes encoding the avermectin polyketide synthase,” *Gene*, vol. 115, no. 1–2, pp. 119–125, Jun. 1992.
- [115] K. Busarakam, A. T. Bull, G. Girard, D. P. Labeda, G. P. van Wezel, and M. Goodfellow, “Streptomyces leeuwenhoekii sp. nov., the producer of chaxalactins and chaxamycins, forms a distinct branch in Streptomyces gene trees,” *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 105, no. 5, pp. 849–861, May 2014.
- [116] M. Wieser *et al.*, “Emended descriptions of the genus Micrococcus, Micrococcus luteus (Cohn 1872) and Micrococcus lylae (Kloos et al. 1974),” *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 52, no. 2, pp. 629–637, Mar. 2002.
- [117] D. Widdick *et al.*, “Analysis of the tunicamycin biosynthetic gene cluster of streptomyces chartreusis reveals new insights into tunicamycin production and immunity,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 62, no. 8, Aug. 2018.
- [118] “GeneJET Gel Extraction Kit | Thermo Fisher Scientific.” [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K0691#/K0691>. [Accessed: 29-Aug-2021].
- [119] “GeneJET Plasmid Miniprep Kit | Thermo Scientific.” [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K0502#/K0502>. [Accessed: 29-Aug-2021].
- [120] “PCR Protocol Phusion® DNA Polymerase | NEB.” [Online]. Available: <https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/pcr-protocol-m0530>. [Accessed: 29-Aug-2021].
- [121] “GeneJet Gel Extraction Kit |Thermo Scientific.” [Online]. Available: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0012661_GeneJET_Gel_Extraction_UG.pdf. [Accessed: 29-Aug-2021].
- [122] “User Guide: Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit #K0502, #K0503 .” [Online]. Available: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0012655_GeneJET_Plasmid_Miniprep_UG.pdf. [Accessed: 29-Aug-2021].
- [123] D. Gibson, “One-step enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases in size,” *Protoc. Exch.*, Apr. 2009.
- [124] W. Mendenhall, D. Wackerly, and R. Schaeffer, *Mathematical statistics with applications*,

4th ed. PWS-Kent, 1990. Cap. 8, Cap. 10 & Cap. 14.

- [125] "Homogeneity of Variance Calculator - Levene's Test | Social Science Statistics." [Online]. Available: <https://www.socscistatistics.com/tests/levене/default.aspx>. [Accessed: 03-Sep-2021].
- [126] A. Ulrich, P. Schumann, D. Naumann, U. Behrendt, and K. Suzuki, "Diversity of grass-associated Microbacteriaceae isolated from the phyllosphere and litter layer after mulching the sward; polyphasic characterization of *Subtercola pratensis* sp. nov., *Curtobacterium herbarum* sp. nov. and *Plantibacter flavus* gen. nov., sp. nov.," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 52, no. 5, pp. 1441–1454, Sep. 2002.
- [127] G. Hobbs, C. M. Frazer, D. C. J. Gardner, J. A. Cullum, and S. G. Oliver, "Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 31, no. 3, pp. 272–277, Sep. 1989.
- [128] "Flux Variability analysis (FVA) — The COBRA Toolbox." [Online]. Available: <https://opencobra.github.io/cobratoolbox/latest/tutorials/tutorialFVA.html>. [Accessed: 18-Mar-2019].
- [129] W. Hongjuan, L. Zhenjian, L. Dehai, G. Qianqun, and Z. Tianjiao, "[OSMAC (one strain many compounds) approach in the research of microbial metabolites--a review] - PubMed," *PubMed*, vol. 50, no. 6, pp. 701-709, 2010.

B. Perfiles metabólicos y patrones de fragmentación para metabolitos especializados de *S. leeuwenhoekii* C34 en distintos medios

1. Perfiles metabólicos

A continuación, se muestran los perfiles metabólicos para metabolitos especializados en *S. leeuwenhoekii* C34 en distintos medios de cultivo, obtenidos de otro estudio. La técnica utilizada corresponde a HPLC MS.

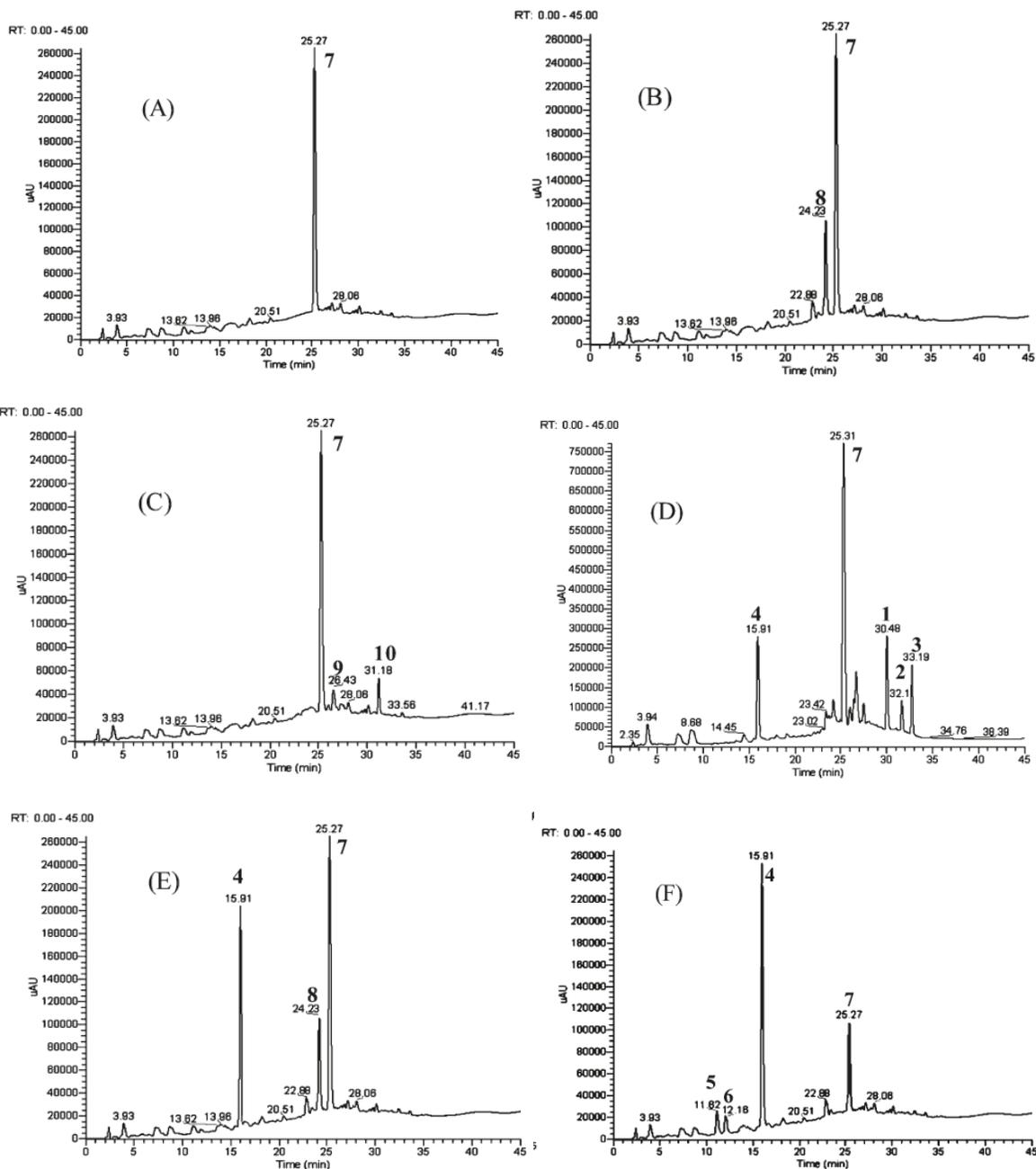


Figura 25: Perfiles obtenidos de LCMS del patrón de metabolitos de *S. leeuwenhoekii* C34 en distintos medios: (A) GYE; (B) ISP2; (C) ISP2 modificado; (D) medio definido; (E) Fries 1 modificado; (F) ISP3. Los compuestos 7, 8, 9 y 10 corresponden a chaxamicinas A, B, C y D, respectivamente. Esta información fue obtenida de Rateb et al., 2011 [25]

También, se incluyen los tiempos de retención (RT) y valores de carga/masa [m/z] para las chaxamicinas [A-D] y chaxalactinas [A-C].

Tabla 4: Valores de carga/masa y tiempos de retención obtenidos para chaxamicinas A-D [42] y chaxalactinas A-C [25].

	Chaxamycins				Chaxalactins		
	A	B	C	D	A	B	C
m/z	638,29	622,29	654,29	682,29	463	479,28	493,29
RT [min]	25,27	24,23	26,43	31,18	30,48	32,1	33,19

2. Patrones de fragmentación

Se presentan los patrones de fragmentación de las chaxamicinas A-D, obtenidos desde literatura, en la siguiente figura.

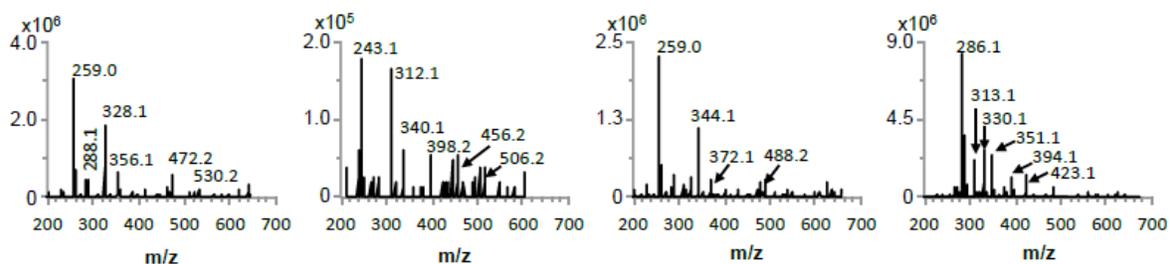


Figura 26: Patrones de fragmentación de las chaxamicinas A, B, C y D, de izquierda a derecha, respectivamente, generados a partir de ionización negativa. La información fue obtenida de Castro, 2015 [48].

Adicionalmente, se incluyen los patrones de fragmentación de los compuestos identificados como chaxamicinas A, B, C y D en este estudio.

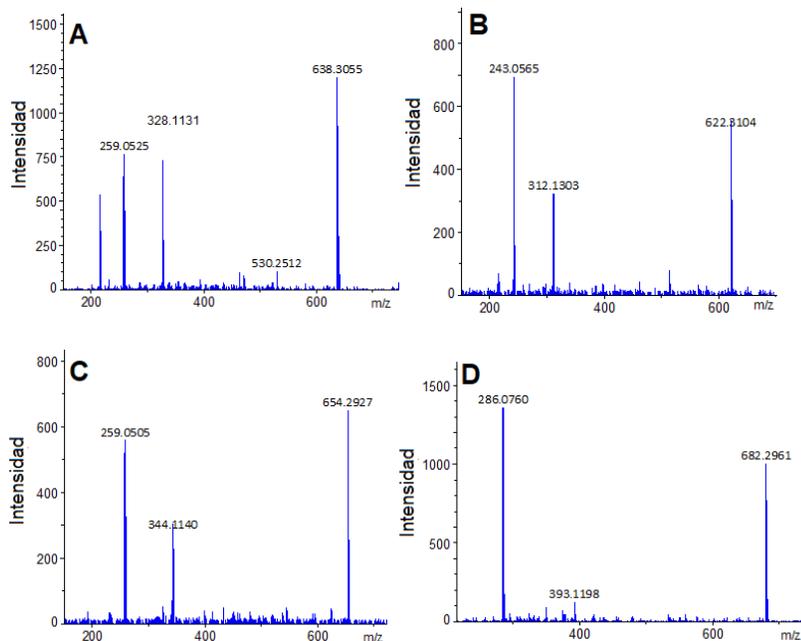


Figura 27: Se muestran los patrones de fragmentación de las chaxamicinas A, B, C y D (gráficos A, B, C y D, respectivamente) obtenidos a partir del análisis HPLC MS/MS de las muestras trabajadas en este proyecto.

Para cada metabolito, los patrones de fragmentación obtenidos a lo largo de todas las muestras son muy similares, variando solamente en intensidad, por lo que solamente se muestran los pertenecientes a una muestra.

C. Equipos y reactivos

1. Amplificación y purificación de DNA

- 5X Phusion ® GC Reaction Buffer New England BioLabs inc
- 100% DMSO New England BioLabs inc
- Partidores¹⁴
- dNTPs (70% GC)
- gDNA de *S. leeuwenhoekii* C34
- dH₂O
- Thermo Scientific Phusion DNA Polimerase, Lithuania (o X7)
- FINE VORTEX FINEPCR
- SCILOGEX D1008
- MAESTROGEN MaestroNANO
- *Thermo Scientific GeneJet Gel Extraction Kit*[118]
- *Thermo Scientific GeneJet Plasmid Miniprep Kit*[119]

2. Gibson Assembly

- PEG 8000
- Tris-Hcl pH 7.5 [1M]
- MgCl₂ [500 mM]
- DTT [1M]
- dATP [100 mM]
- dTTP [100 mM]
- dCTP [100 mM]
- dGTP [100 mM]
- NAD⁺ [50 mM]
- H₂O (nuclease free)
- 5X Isothermal reaction buffer
- T5 Exonuclease 1 [U/μl]

¹⁴ Consultar anexo E. E.2

- Phusion DNA Polymerase 2 [U/μl]
 - Taq DNA ligase 40 [U/μl]
 - H₂O (nuclease free)
3. Digestiones
- Enzimas de restricción (NdeI, HindIII, XhoI, EcoRV, BamHI, AgeI)
 - Buffers (3.1, 1.1, R, O y cutsmart)
4. Transformaciones
- Bacterias quimiocompetentes (*E. coli* DH5α o *E. coli* ET12567/pUZ8002)
 - Plásmido recombinante gen-plásmido (*sle39830*-pIJ10257 o *sle27500*-pIJ12551)
 - Tubos eppendorf de 1,5 [ml]
 - BARNSTEAD| Lab Line Multi-blok® Heater
 - Pipeta pasteur
 - Placas de medio agar LB
 - eppendorf centrifuge 5804R
 - FINE VORTEX FINEPCR
 - Autoclave Labtech LaC-S1005D

5. Conjugaciones

- *E. coli* E. coli ET12567/pUZ8002 transformadas con *sle39830-pIJ10257* o *sle27500-pIJ12551*
- Stock de esporas de *S. leeuwenhoekii* C34
- Medio LB líquido
- eppendorf centrifuge 5804R
- tubos eppendorf de 1,5 [ml]
- Medio 2X YT
- Medio SFM agar
- Ácido nalidíxico y apramicina o higromicina B
- Autoclave Labtech LaC-S1005D

6. Cultivos de *S. leeuwenhoekii* C34

- Extracto de malta (BD Bacto TM 218630)
- Extracto de levadura (BD Bacto TM212750)
- Glicerol (winkler BM-0800)
- dH₂O
- NaOH 4M.
- Dilución de HCL al 50% en agua destilada.
- pHímetro (Corning pH meter 320)
- Balanza (Equilab Chyo MP-3000G)
- Autoclave Labtech LaC-S1005D
- Incubadora (SHEL LAB SHAKING INCUBATOR)
- D(-) -Mannitol (Merck 1.05982.0500)
- Mi Tierra® Harina de Soya
- Bacto™ Agar

7. Extracción de proteínas

- Tubos Eppendorf de 15 [ml].
- Tubos de microcentrífuga de 2 ml estériles.
- Pipeta P100.
- Puntas de pipeta P1000.
- Medios de cultivo de *S. leeuwenhoekii* C34.
- Centrífuga eppendorf 5804 R

8. Bioensayos

- Placas de Petri estériles.
- NaCl (AppliChem Panreac 131659.1211)
- Agar (BD Bacto TM 214010)
- Triptona (BD Bacto TM211705)
- Extracto de levadura (BD Bacto TM212750)
- Pipetas P200 y P1000.
- Puntas de pipetas para P200 y P1000.
- Extractos de proteínas.
- Balanza (Equilab Chyo MP-3000G)
- Incubadora (YIH DER LM 400D)
- Autoclave Labtech LaC-S1005D
- Espectrofotómetro (Pharmacia Biotech Ultrospec 3000)
- *M. luteus*

9. Peso seco

- Tubos Eppendorf con pellets
- Balanza (OHAUS ANALYTICAL Plus)
- Estufa (GALLENKAMP Hotbox with fan, Size 2)

D. Medios y condiciones de cultivo

A continuación, se detalla la composición de los diferentes medios de cultivo utilizados en este trabajo.

1. Medios líquidos

a. Medio LB [68]

Tabla 5: Composición del medio de cultivo LB para un litro de agua destilada.

Componente	Cantidad por litro de dH ₂ O
Extracto de levadura	5 [g]
NaCl	10 [g]
Triptona	10 [g]

b. Medio mISP2 [126]

Tabla 6: Composición del medio de cultivo mISP2 para un litro de agua destilada.

Componente	Cantidad por litro de dH ₂ O
Extracto de levadura	4[g]
Extracto de malta	10[g]
Glicerol	10[g]

2. Medios Sólidos

a. Agar LB [68]

Tabla 7: Composición del medio de cultivo agar LB por litro de agua destilada.

Componente	Cantidad por litro de dH ₂ O
Extracto de levadura	5 [g]
NaCl	10 [g]
Triptona	10 [g]
Agar	15 [g]

b. Agar SFM [127]

Tabla 8: Composición del medio agar SFM por litro de agua destilada.

Componente	Cantidad por litro de dH ₂ O
Harina de soya	20 [g]
Manitol	20 [g]
Agar	20 [g]

3. Antibióticos

A continuación, se muestra una lista de los antibióticos utilizados en este trabajo, junto con su concentración de trabajo.

Tabla 9: Antibióticos utilizados en este trabajo [43].

Compuesto	Número de Catálogo	Dilución	Concentración del stock [mg/ml]	Concentración de trabajo [µg/ml]
Apramicina	Apramycin sulphate Sigma cat. no. A2024	dH ₂ O	50	70
Higromicina B	Hygromycin B from <i>Streptomyces hygrosopicus</i> Sigma cat. no. 238813	PBS	50	80 (<i>E. coli</i>) 40 (<i>Streptomyces</i>)
Cloranfenicol	Chloramphenicol Calbiochem cat. no. 220551	Etanol al 100%	50	50
Kanamicina	Kanamycin Gibco cat. no. 11815-024	dH ₂ O	50	50
Ácido nalidíxico	Nalidixic acid Sigma cat. no. N8878	0.3 M NaOH	25	20
Carbencilina	Carbenicillin disodium salt Invitrogen cat. no. 10177-012	dH ₂ O	50	100

E. Cepas Bacterianas, plásmidos y partidores.

A continuación, se presentan las cepas bacterianas, los plásmidos y los partidores utilizados en este trabajo.

1. Cepas Bacterianas

En la siguiente tabla, se muestran las distintas cepas de *E. coli*, *S. leeuwenhoekii* C34 y *M. luteus* utilizadas en este trabajo o generadas en él.

Tabla 10: Lista y descripción de las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

Cepa	Descripción	Fuente referencia
<i>E. coli</i> Dh5 α	Cepa utilizada para clonamiento rutinario de plásmidos recombinantes F- ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-. m _{k+}) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ -	Razmilic 2017[43] Grant et al., 1990
<i>E. coli</i> Dh5 α T1	<i>E. coli</i> Dh5 α transformada con el plásmido pIJ10257- <i>Sle39830</i> .	Este trabajo
<i>E. coli</i> Dh5 α T2	<i>E. coli</i> Dh5 α transformada con el plásmido pIJ12551- <i>Sle27500</i> .	Este trabajo
<i>E. coli</i> ET12657/pUZ8002	Cepa deficiente para metilaciones utilizada para conjugar <i>Streptomyces</i> . El plásmido pUZ8002 aporta la maquinaria de conjugación. dam13::Tn9 (resistencia a Chloramfenicol) 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 (resistencia a kanamicina)	MacNeil et al., 1992[114]; pUZ8002, J. Wilson & D. Figurski, unpublished. Razmilic 2017[43]
<i>E. coli</i> ET12657T1/pUZ8002 p1	<i>E. coli</i> ET12657/pUZ8002 transformada con el plásmido pIJ10257- <i>Sle39830</i> .	Este trabajo
<i>E. coli</i> ET12657T2/pUZ8002 p3	<i>E. coli</i> ET12657/pUZ8002 transformada con el plásmido pIJ12551- <i>Sle27500</i> .	Este trabajo
<i>S. leeuwenhoekii</i> C34	Cepa <i>wildtype</i> de <i>Streptomyces</i> .	Busarakam et al., 2014[115]
<i>S. leeuwenhoekii</i> C34C1	<i>S. leeuwenhoekii</i> C34 conjugada con el plásmido pIJ10257- <i>Sle39830</i> .	Este trabajo

<i>S. leeuwenhoekii</i> C34C2	<i>S. leeuwenhoekii</i> C34 conjugada con los plásmidos pIJ10257- <i>Sle39830</i> y pIJ12551- <i>Sle27500</i> .	Este trabajo
<i>M. luteus</i>	Cepa <i>wildtype</i> .	Wieser <i>et al.</i> , 2002 [116]

2. Partidores

Se muestra una lista de los partidores utilizados en este trabajo para poder realizar la sobreexpresión de los genes seleccionados.

Tabla 11: Lista y secuencias 5' de los partidores utilizados en este trabajo. Los partidores BZ01 y BZ03 amplifican los genes *Sle39830* y *Sle44630*, respectivamente. Los pares de partidores [GBA02, GBA05], y [GBA03, GBA04] amplifican para inserción de genes en los plásmidos pIJ10257 y pIJ12551, respectivamente.

Partidor	secuencia 5' → 3'	Origen
BZ01_F	AGGCATATGATCACCAGCCTGCTC	Este trabajo
BZ01_R	GGGAAGCTTCTTTGTGTTCCCTCGGATTCG	Este trabajo
BZ03g_F	GTCTAGAACAGGAGGCCCAATGTCCGAGCCGGAAGAACT	Este trabajo
BZ03g_R	TAATCACTCGAGATCTCATACTACAGGGGGATGTTGCCGT	Este trabajo
GBA002_rv	TCATCTCGTTCTCCGCTCAT	GBA, CeBiB ¹⁵
GBA03_rv	CACACAGGAAACAGCTATGACA	GBA, CeBiB
GBA04_fw	GTTTTCCAGTCACGACGTT	GBA, CeBiB
GBA05_fw	CTGAGGTTGAAAAACGCTCACT	GBA, CeBiB

¹⁵ GBA: Grupo de Bioprospección de Actinomicetas del Centro de Biotecnología y Bioingeniería (CeBiB) de la Universidad de Chile.

3. Plásmidos

Se muestran los plásmidos utilizados en este trabajo, o generados a partir de él, para lograr la sobreexpresión de los genes deseados en *S. leeuwenhoekii* C34.

Tabla 12: Lista y descripción de los plásmidos utilizados en este trabajo

Plásmido	Descripción	Fuente
pIJ12551	Vector de expresión para <i>Streptomyces</i> con el promotor constitutivo ermE*, Conjugativo, integrativo (ϕ C31) resistencia a Apramicina.	Hong et al., 2005[117]
pIJ12551- <i>Sle27500</i>	pIJ12551 con el gen <i>Sle27500</i> inserto.	Este trabajo
pIJ10257	Vector de expresión para <i>Streptomyces</i> con el promotor constitutivo ermE*, hyg (resistencia a hygromicina B), conjugativo (oriT from RK2), se integra en el sitio de anclaje ϕ BT1 attP	Razmilic 2017[43] Hong et al., 2005[117]
pIJ10257- <i>Sle39830</i>	pIJ10257 con el gen <i>Sle39830</i> inserto.	Este trabajo

Mapa de los plásmidos recombinantes

A continuación, se presentan diagramas de los plásmidos recombinantes *Sle3980*-pIJ10257 y *Sle27500*-pIJ12551 a partir de los plásmidos y genes correspondientes.

i. *Sle39830*-pIJ10257

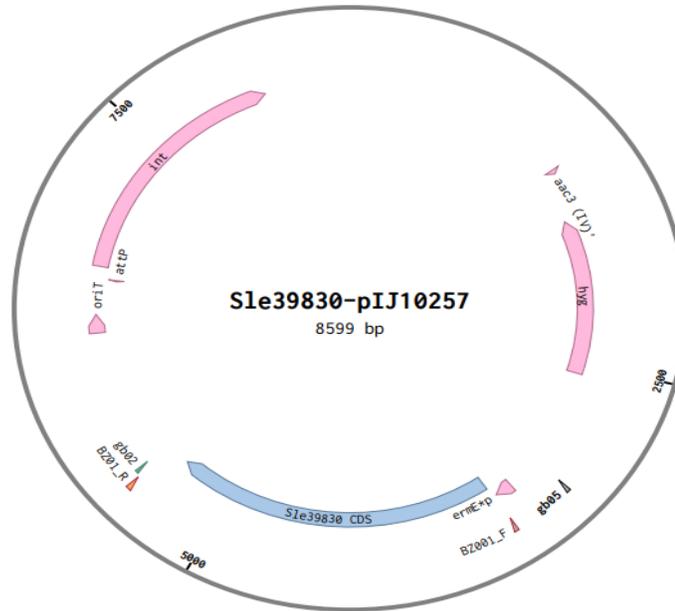


Figura 28: Mapa del plásmido *Sle39830*-pIJ10257. Se pueden apreciar los sitios de anclaje de los partidores *BZ01_F*, *BZ01_R*, y *GBA02_rv* y *GBA05_fw*.

ii. *Sle27500-pIJ12551*

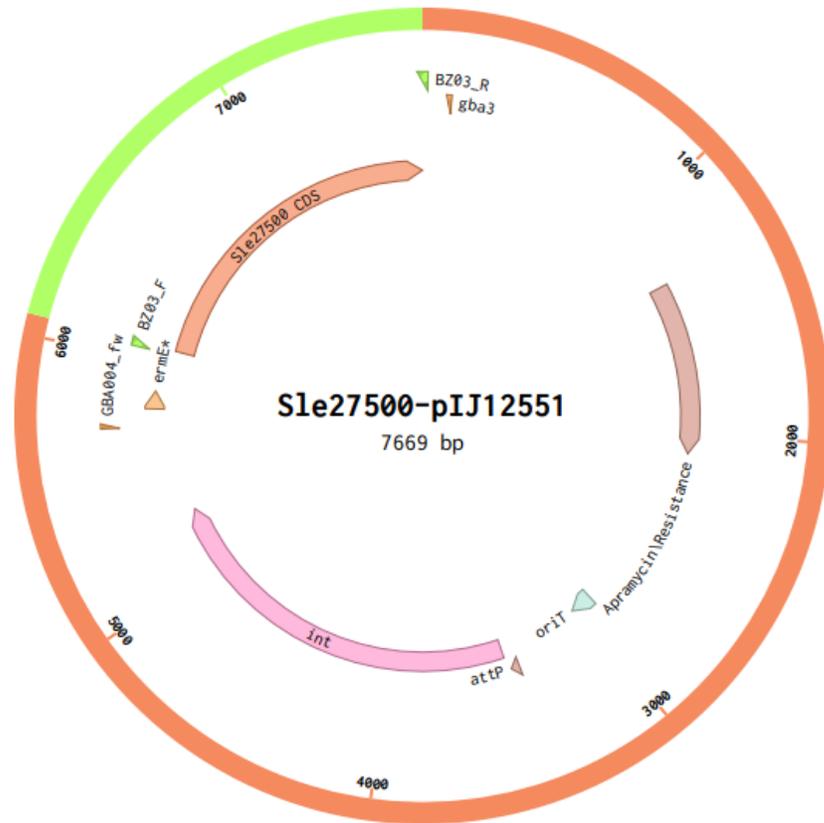


Figura 29:: Mapa del plásmido *Sle27500-pIJ12551*. Se pueden apreciar los sitios de anclaje de los partidores *BZ03g_F*, *BZ03g_R*, y *GBA03_rv* y *GBA04_fw*.

F. Protocolos

1. Amplificación de genes

- a. Se inserta el volumen de cada componente de la PCR, detallados en la Tabla 13, en un tubo eppendorf de 0,6 ml para formar el mastermix (MM). Se debe mantener los reactivos que no se estén utilizando en hielo.
- b. Se añaden 0,1 μ l de DNA polimerasa (*Phusion* o X7¹⁶) por cada 10 μ l de mezcla manteniendo siempre la enzima en hielo
- c. Se utiliza el vortex y spinner para asegurar una distribución homogénea de todos los componentes dentro del tubo.
- d. Se divide la mezcla en alícuotas de 20 μ l en tubos de 0,2 μ l, para luego ponerlos en el termociclador *PCR TOUCH T690* utilizando el programa de PCR prediseñado para cada gen de acuerdo las instrucciones del fabricante de la polimerasa *phusion* [120].

Tabla 13: Componentes de la PCR para 30 μ l.

Reactivo	Volumen [μ l]
dH ₂ O	20,4
Buffer GC	6
DMSO	1,5
DNA	0,9
dNTPs	0,6
pFw	0,15
pRev	0,15
DNA polimerasa	0,3

2. Purificación de DNA

- b. Prerapar gel de agarosa al 1% utilizando 1 [g] de agarosa y 100 [ml] de buffer TAE 1X. Añadir 2 [μ l] de gelred.
- c. Solubilizar la mezcla calentando en el microondas. Dejar enfriar durante 5 minutos y verter la mezcla en el molde y peine requeridos según la cantidad y tamaño de las muestras y dejar enfriar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- d. Poner el gel de agarosa al 1% en la cámara de electroforesis y conectarla a la fuente de poder.
- e. Añadir 1/6 en volumen de buffer 6x a las muestras.
- f. Cargar el marcador de peso molecular de 1 kb en el primer pocillo de la izquierda del gel de agarosa al 1%, e insertar en los pocillos contiguos las muestras a purificar registrando el orden.
- g. Poner la cubierta de la cámara de electroforesis y encender la fuente de poder, configurando los parámetros en 60 minutos y 90 [V].
- h. Una vez transcurridos los 60 minutos, remover cuidadosamente el gel de agarosa de la cámara de electroforesis y utilizar Bio-Rad Gel DocTM EZ Imager para

¹⁶ La enzima X7 corresponde a una versión de la enzima *phusion* manufacturada en el laboratorio del CeBiB.

visualizar el DNA. Cortar los fragmentos de interés del gel con un bisturí e insertarlos en tubos eppendorf de 2 [ml] previamente rotulados.

- i. Utilizar protocolo de purificación de DNA a partir de geles *thermo scientific GeneJet Gel Extraction Kit* de *thermofisher* siguiendo las instrucciones del fabricante[121], pero eluyendo con agua destilada tibia.
- j. Al terminar el paso anterior, cuantificar el DNA obtenido utilizando el espectrofotómetro y agua destilada como blanco.

3. Extracción y purificación de plásmido

- a. Se dejan creciendo *overnight* las bacterias que poseen el plásmido de interés en presencia del antibiótico correspondiente para asegurar su selección.
- b. Al día siguiente, se vierte el contenido de los viales en tubos Falcon de 15 [ml] y se centrifuga a 5000 rpm durante 5 a 10 min.
- c. Realizar la extracción del DNA plasmidial utilizando el kit *Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit* [122] y siguiendo las instrucciones del fabricante[122], pero eluyendo con agua destilada tibia.
- d. Al finalizar el protocolo, cuantificar el DNA plasmidial obtenido utilizando el espectrofotómetro y agua destilada como blanco.

4. Digestión de genes y plásmidos con enzimas de restricción

Se digiere el plásmido y el gen por separado, con el mismo par de enzimas previamente seleccionadas.

- a. Se rotula un tubo eppendorf estéril de 200 [μl] y se añaden 10 [μl] del buffer correspondiente según se señala en la tabla x __, 1 [μl] de cada enzima si la actividad en dicho buffer es de 100%, 1000 [ng] del gen y 2000 [ng] del plásmido, y agua destilada hasta completar los 100 [μl].

Tabla 14: Se muestran las enzimas y buffers utilizados para digerir el gen *Sle39830* y el plásmido *pIJ10257* para su posterior ligación, y la enzima utilizada para linealizar el plásmido *pIJ12551* antes realizar *Gibson assembly*.

DNA	Enzimas de restricción	Buffer
<i>Sle39830-pIJ10257</i>	HindIII & NdeI	R
<i>pIJ12551</i>	NdeI	R

- b. Dejar incubando la reacción durante 4 horas u *overnight* a 37 °C. Los tiempos y temperatura pueden variar dependiendo de las enzimas utilizadas.

5. Ligación

- a. Se purifica el producto de digestión con el kit *thermo scientific GeneJet Gel Extraction Kit*. Se considera un volumen total de reacción de 10 [μl], con una composición dada por la Tabla 15.
- b. Se deja incubando la mezcla *overnight* a 4 °C o a temperatura ambiente durante 2 horas.

Tabla 15: Composición de la mezcla para ligación de genes y plásmidos.

Reactivo	Volumen [μ l]
5x T4 ligase Buffer	2
T4 ligase	1
Inserto	A
Vector	B
dH ₂ O	C

Los volúmenes A, B y C se calculan como se muestra en ejemplo de cálculo 1.

6. Gibson assembly

A continuación, se muestra el protocolo utilizado para realizar Gibson assembly[123].

- a. Preparar 1 [ml] de 5X ISO Buffer con los componentes de la Tabla 16.

Tabla 16: Composición para preparar 1 [ml] de 5X ISO Buffer.

Reactivo	Cantidad [gr] o [μ l]
PEG 8000	0,25
Tris-Hcl pH 7.5 [1M]	500
MgCl ₂ [500 mM]	100
DTT [1M]	100
dATP [100 mM]	10
dTTP [100 mM]	10
dCTP [100 mM]	10
dGTP [100 mM]	10
NAD ⁺ [50 mM]	100
H ₂ O (nuclease free)	160

- b. Preparar 100 [μ l] de 2X Mastermix con los componentes de la Tabla 17. Alicuotar en 10 [μ l] y almacenar a -20 °C.

Tabla 17: Composición requerida para preparar 100 [μ l] de 2X Mastermix.

Reactivo	Volumen [μ l]
5X Isothermal reaction buffer	40,1
T5 Exonuclease 1 [U/ μ l]	0,8
Phusion DNA Polymerase 2 [U/ μ l]	2,5
Taq DNA ligase 40 [U/ μ l]	20,1
H ₂ O (nuclease free)	36,5

- c. Descongelar una alícuota de 2X Mastermix, manteniéndola siempre en hielo.

- d. Añadir 5 µl del DNA a ensamblar al mastermix. Los fragmentos de DNA deben estar en cantidades equimolares. Se recomienda utilizar entre 10 y 100 ng por cada 6 kb que tenga el respectivo fragmento.
- e. Incubar a 50°C durante 90 minutos en un termociclador.

7. Generación de bacterias (*E. coli* DH5α / *E. coli* ET12567/pUZ8002) quimiocompetentes con cloruro de calcio (CaCl₂).

- a. Dejar cultivando las bacterias en 10 [ml] de medio LB en viales de 20 [ml] a 37 °C *overnight*.
- b. Inocular 1 [ml] de cultivo en 50 [ml] de medio LB en matraces de 250 [ml] e incubar a 37 °C y 250 rpm en la incubadora *Shel Lab Shaking Incubator* hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,3.
- c. Dejar en hielo durante 10 minutos.
- d. Trasladar el contenido del matraz a un tubo Falcon de 50 [ml] y centrifugar a 3000 rpm y 4 °C durante 10 minutos para formar un *pellet* celular.
- e. Se descarta el sobrenadante y se re suspende el *pellet* en 12,5 [ml] de solución 0,1 M de MgCl₂. Luego, se debe mantener en hielo durante 5 minutos.
- f. Se centrifuga a 4000 rpm y 4 °C durante 10 minutos. Se elimina el sobrenadante y se re suspende el *pellet* en 2,5 [ml] de solución 0,1 M de CaCl₂. Mantener en hielo durante 20 minutos.
- g. Se centrifuga a 4000 rpm y 4 °C durante 10 minutos. Se descarta el sobrenadante y se re suspende el *pellet* en 1 [ml] de solución 85% CaCl₂ y 15% glicerol.
- h. Guardar alícuotas de 100 [µl] en tubos de 0,6 [ml] y almacenar a -80 °C.

8. Transformación bacteriana

Nota 1: Se utiliza el plásmido vacío sin digerir como control positivo.

Nota 2: Se utilizará 1 placa para la muestra sin concentrar, 1 placa para la muestra concentrada, 1 placa para el control positivo, y una placa de respaldo para la PCR de colonias. Las placas de Petri contienen medio LB agar suplementado 80 [µg/ml] de higromicina B para pIJ10257 y 50 [µg/ml] de apramicina para pIJ12551 para llevar a cabo la selección de interés. Las placas deben estar listas antes de comenzar este protocolo.

- a. Descongelar las bacterias quimio competentes en hielo durante 10 minutos. Evitar tomar los tubos desde abajo.
- b. Precalentar el termo bloque a 42 °C.
- c. Mezclar 10 [µl] del producto de ligación con 100 [µl] de bacterias en tubos de 1,5 o 2 [ml]. Mantener en hielo por 30 minutos.
- d. Poner los tubos en el termo bloque durante 45 segundos.
- e. Mantener en hielo por 1 minuto.
- f. Añadir 900 [µl] de medio LB a cada tubo e incubar a 37 ° C durante 1 hora.

- g. Inocular 100 [μl] de cada tubo en la placa correspondiente, previamente rotulada. Se debe esparcir el líquido utilizando una pipeta *Pasteur* doblada en forma de rastrillo. Asegurarse que la pipeta *Pasteur* esté lo suficientemente fría para no matar las bacterias al esparcirlas. Apoyar la pipeta en el agar antes de
- h. Centrifugar las muestras a 5000 rpm durante 5 minutos. Extraer 100 [μl] de sobrenadante por tubo, descartar el resto del sobrenadante, y re suspender el pellet en sus 100 [μl] de sobrenadante respectivos. Utilizar vortex o pipetear para homogeneizar.
- i. Inocular los tubos con muestra concentrada en las placas correspondientes. Cubrir todos los bordes de las placas con Parafilm.
- j. Incubar *overnight* a 37 °C.

9. PCR de Colonias

- a. Se prepara un mastermix, contando 10 [μL] por colonia más 10 para control negativo (el plásmido vacío), de mezcla de PCR reemplazando el DNA por agua destilada. Se mantiene en hielo. Se deben utilizar los partidores inespecíficos correspondientes al plásmido.
- b. Se ponen alicuotas de 10 [μL] del mastermix en tubos de 0,2 [ml] rotulados según el número de colonias a examinar y el control negativo.
- c. Rotular la placa de respaldo indicando el espacio correspondiente a cada colonia.
- d. Bajo condiciones estériles, pinchar una colonia con un mondadientes, pasar el mondadientes por el espacio correspondiente en la placa de respaldo y luego sumergir la punta del mondadientes en el tubo rotulado con mezcla de PCR. Repetir con cada tubo. Incubar placa de respaldo a 37 °C *overnight*.
- e. Añadir 0,5 [μL] de plásmido vacío al tubo de control negativo.
- f. Realizar PCR utilizando el termociclador PCR TOUCH T690.

10. Stock en glicerol

- a. Se prepara una solución de 40 % de glicerol y 60 % de agua destilada.
- b. Se esteriliza en la autoclave a 121 °C durante 1 hora.
- c. Se mezclan volúmenes iguales de la solución 40% de glicerol y del cultivo correspondiente al microorganismo que se desea almacenar.
- d. Se almacena a -20 o -80 °C hasta su próximo uso.

11. Conjugación bacteriana

- a. Se inoculan 10 [ml] de LB suplementado con 50 [μg/ml] de cloranfenicol y kanamicina, y el antibiótico relevante con las células de *E. coli* *ET12567/PUZ8002*, transformadas con el constructo gen – plásmido de interés. Se incuban *overnight* a 37 °C y 250 rpm.
- b. A la mañana siguiente, se inocula 1 [ml] de cultivo *overnight* en 10 ml de LB con 50 [μg/ml] de cloranfenicol y kanamicina, y los antibióticos relevantes para

- seleccionar las transformantes. Se incuba a 37 °C y 250 rpm hasta alcanzar una OD₆₀₀ de entre 0,3 y 0,4.
- Dejar calentando el termobloque a 50°C mientras se espera que el cultivo alcance la OD₆₀₀ indicada.
 - Centrifugar el cultivo a 4500 rpm y temperatura ambiente durante 5 minutos. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 10 [ml] de LB. Repetir el proceso 2 veces.
 - Resuspender pellet de *E. coli* ET12567 transformantes en 0,3 [ml] de LB.
 - Mezclar aproximadamente 10⁸ esporas del stock en glicerol de *S. leeuwenhoekii* C34 con 0,5 [ml] de medio 2x YT y aplicar shock térmico a 50 °C durante 10 minutos utilizando el termobloque. Dejar enfriar hasta temperatura ambiente.
 - Centrifugar a 10.000 rpm y temperatura ambiente durante 5 minutos. Descartar sobrenadante.
 - Resuspender las esporas con la solución de *E. coli* ET12567 transformantes. Mezclar suavemente.
 - En placas previamente preparadas de agar SFM, suplementado con 10 mM de CaCl₂ y 10 mM de MgCl₂, se deben esparcir 100 [µl] de la mezcla de *E. coli* ET12567 transformantes y *S. leeuwenhoekii* C34 utilizando una pipeta *pasteur* doblada en forma de L. Incubar las placas a 30 °C durante 20 a 24 horas.
 - Cubrir las placas con 1 ml de solución de los antibióticos relevantes a las concentraciones indicadas en la Tabla 18.

Tabla 18: Cantidad de antibióticos utilizados en la cobertura de las placas de conjugación.

Antibiótico	µl por 1 ml de cobertura	Concentración final [µg/ml]
Higromicina B	20	40
Apramicina	25	50
Kanamicina	25	50
Ácido Nalidíxico	20	20

- Dejar secar la superficie de las placas a temperatura ambiente e incubar a 30 °C. Para los controles, utilizar solamente ácido nalidíxico para la cobertura.

12. Cultivo en medio líquido de *S. leeuwenhoekii* C34

- Preparar 25 [ml] de medio mISP2 por cepa para el cultivo semilla, según se indica en el anexo 4 b, en un matraz de 250 [ml]. Añadir perlas de vidrio y autoclavar.
- Inocular 10⁸ esporas de la cepa de *S. leeuwenhoekii* C34 de interés en 25 [ml] de medio mISP2 previamente autoclavado e incubar durante 24 hrs a 30 °C y 200 rpm.
- Centrifugar el medio de cultivo en tubos falcon de 50 [ml] a 10.000 rpm durante 10 minutos y temperatura ambiente.
- Realizar dos veces un lavado del pellet utilizando medio de cultivo o solución salina, y resuspender en medio de cultivo.

- e. Medir OD₆₀₀ utilizando el espectrofotómetro.
- f. Para los cultivos de producción de metabolitos, inocular matraz de 50 [ml] de medio mISP2 con el volumen de cultivo semilla necesario para obtener una OD₆₀₀ de 0,2. Trabajar en triplicado. Para determinar el volumen del inóculo se debe utilizar la siguiente ecuación:

$$V_i = OD_{600,f} \cdot \frac{V_f}{OD_{600,i}}$$

- g. Incubar durante 3 a 5 días a 30°C y 200 rpm.

13. Extracción de DNA genómico

A continuación, se muestra el protocolo de DNeasy® UltraClean® Microbial Kit¹⁷ para extraer DNA genómico a partir de un cultivo finalizado.

- a. Insertar 1,8 ml de cultivo microbial en un tubo de recolección de 2 ml y centrifugar a 10.000 g durante al menos 30 segundos. Decantar el sobrenadante y centrifugar nuevamente a 14.000 rpm durante 5 minutos. Descartar el sobrenadante.
- b. Resuspender el *pellet* celular en 300 µl de *PowerBead Solution* y mezclar suavemente en el vortex. Transferir las células resuspendidas a un tubo *PowerBead*.
- c. Añadir 50 µl de solución SL al tubo *PowerBead* (incluido). Calentar a 70°C durante 10 minutos.
- d. Fijar los tubos horizontalmente en el vortex. Utilizar vortex a máxima velocidad durante 10 minutos.
- e. Centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos. Extraer sobrenadante a un tubo limpio y centrifugar a 14.000 rpm durante 10 minutos.
- f. Transferir el sobrenadante a un tubo de recolección limpio (incluido) de 2 ml.
- g. Añadir 100 µl de solución IRS al sobrenadante y agitar en vortex durante 5 segundos. Incubar a 4°C por 5 minutos.
- h. Centrifugar a 14.000 rpm durante 2 minutos.
- i. Transferir todo el sobrenadante a un tubo de recolección limpio de 2 ml.
- j. Añadir 900 µl de solución SB al sobrenadante y agitar en el vortex durante 5 segundos.
- k. Cargar hasta 700 µl en una columna de giro MB (incluida) y centrifugar a 14.000 rpm durante 2 minutos a temperatura ambiente. Descartar el líquido, añadir el resto del sobrenadante a la columna de giro MB y centrifugar nuevamente a 14.000 rpm durante 2 minutos. Descartar el líquido. Repetir el proceso hasta agotar el sobrenadante.

¹⁷<https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=a733f3a9-5a8b-4003-b28e-55bb050bad1e&lang=en>

- l. Añadir 300 μ l de solución CB y centrifugar a 14.000 rpm durante 2 minutos.
- m. Descartar el líquido y centrifugar a 14.000 rpm durante 2 minutos con la tapa abierta. Dejar con la tapa abierta durante 2 minutos para evaporar los restos de etanol.
- n. Poner la columna a de giro MB en un nuevo tubo de recolección de 2 ml y añadir 30 μ l de agua destilada tibia (aproximadamente 60°C) al centro de la membrana. Dejar reposar durante 2 minutos.
- o. Centrifugar a 14.000 rpm durante 2 minutos y descartar la columna de giro MB. Almacenar a -80°C.

14. Extracción de proteínas

- a. Se rotulan un tubo Falcon de 50 [ml], dos tubos eppendorf de 1,5 [ml] y dos tubos de 2 [ml] por cada cultivo, para medición de peso seco, muestra de sobrenadante para bioensayos, y muestras de proteínas extracelulares e intracelulares, respectivamente. Se registra el peso de cada tubo Falcon, indicado por la balanza analítica.
- b. Se toman 2 [ml] del medio de cultivo de cada matraz y se insertan en los tubos Eppendorf correspondientes. El resto del medio de cultivo se deposita en los tubos Falcon de 50 [ml].
- c. Se centrifugan los tubos Falcon a 4 °C y 12500 rpm durante 10 minutos, luego se extrae 1 [ml] del sobrenadante de cada tubo y se inserta en el tubo de 1,5 [ml] correspondiente para realizar los bioensayos. Se descarta el resto del sobrenadante y se conserva el *pellet* para la medición de peso seco.
- d. Los tubos eppendorf mencionados en el paso b se centrifugan a 13,000 rpm a 4°C durante 10 minutos.
- e. Se traslada el sobrenadante a un eppendorf y se centrifuga nuevamente a 13,000 rpm a 4°C durante 10 minutos.
- f. Se transfieren cuidadosamente 0,5 [ml] del sobrenadante a un tubo eppendorf para su posterior análisis mediante HPLC.
- g. Se re suspende el pellet del paso en 0,5 [ml] de metanol y se deja a 4°C overnight.
- h. Se centrifuga a 13,000 rpm a 4°C durante 10 minutos y se transfieren 0,3 [ml] del extracto metanólico a un tubo eppendorf de 1,5 [ml] y se añaden 0,3 [ml] de agua destilada a cada extracto.
- i. Finalmente se guardan los extractos de proteínas a -20 °C.

15. Medición de peso seco

- a. Se ponen a secar los tubos Falcon con los *pellets*, provenientes del paso de extracción de proteínas, y se ponen a secar en la estufa durante entre 15 y 24 horas o hasta que se observe que el *pellet* está seco.
- b. Una vez que los pellets están secos, se registra el peso de cada tubo con su *pellet* obtenido en la balanza OHAUS^R ANALYTICAL Plus.
- c. Para obtener el valor del peso seco, se toma la diferencia entre los pesos de cada tubo con y sin *pellet*.

16. Bioensayos

- a. Se prepara un matraz con 50 [ml] de medio líquido LB y un matraz con agar LB según se indica en el anexo 0. Para determinar el volumen de agar LB a preparar, se deben considerar 25 ml por cada placa necesaria de agar LB.
- b. Se autoclava durante 1 hora a 121 °C.
- c. Para preparar el cultivo semilla, se inocula *M. luteus*, proveniente de un cultivo en agar LB, directamente en 10ml de medio LB líquido. Se deja incubando durante la noche a 200 rpm y 37 °C.
- d. Se inocula 1 ml del cultivo semilla en el matraz con 50 ml de medio líquido LB y se deja incubando hasta alcanzar una densidad óptica de 0,6 medida a 600 nm.
- e. Una vez alcanzada la OD600 de 0,6, se inocula un volumen del cultivo del punto anterior tal que, tras inocular el agar LB (en su forma líquida) cuando baje su temperatura a 50 °C, éste quede con una OD600 de 0,0125. Dicho cálculo puede realizarse mediante la siguiente ecuación:

$$V_i = OD_{600,f} \cdot \frac{V_f}{OD_{600,i}}$$

- f. En placas de Petri estériles previamente rotuladas, se vierte suficiente agar LB inoculado para cubrir todo el fondo de la placa, aproximadamente 20-25 [ml], y se deja secar durante 30 minutos.
- g. Se hacen 4 pozos en el agar utilizando el extremo ancho de una punta de pipeta en cada placa, y se introducen 50 [µl] de cada extracto de proteínas extracelulares, proveniente de cada cultivo, en los pozos de la placa correspondiente.
- h. Se sellan las juntas de las placas con tiras de Parafilm.
- i. Se incuban las placas a 37°C durante entre 18 y 24 horas.
- j. Se mide y registra el diámetro del halo de inhibición de crecimiento en cada caso. Como control positivo se utiliza una dilución a 100 µg/ml de carbencilina, y como control negativo, medio LB.

G. Ejemplos de cálculo

1. Cálculo de DNA para la ligación

Para calcular las cantidades de DNA requeridas en el protocolo 5 para ligación, se parte con los [ng] de vector que se utilizarán, y considerando la razón para vector: inserto de 3:1, se utiliza la siguiente ecuación para determinar los ng de inserto que se deben añadir a la mezcla.

$$ng \text{ de vector} \cdot \frac{\text{tamaño inserto [kb]}}{\text{tamaño vector [kb]}} \cdot \frac{3}{1} = ng \text{ de inserto}$$

Una vez que se conocen las cantidades [ng] de vector e inserto, se debe determinar el volumen de cada compuesto que se debe añadir a la reacción dividiendo por la respectiva concentración de la alícuota de cada compuesto para obtener A y B.

El volumen de dH₂O, es decir C, corresponde a lo que falta para completar los 10 [μl] tras agregar el resto de los reactivos.

2. Prueba de hipótesis para diferencias de medias para muestras pequeñas

A continuación, se expone el análisis estadístico realizado para comparar las medias obtenidas para el crecimiento de cada cepa de *S. leeuwenhoekii* C34, dado que las desviaciones estándar no son despreciables.

Para llevar a cabo el análisis, se utiliza la prueba de hipótesis para diferencias de medias para poblaciones (o muestras de datos) pequeñas [124], es decir, con $n \leq 30$. Se puede realizar la prueba de la forma mostrada a continuación, ya que las varianzas poblacionales son homogéneas [125].

Se cuenta con los datos de media, desviación estándar y tamaño de la población para cada cepa, es decir, x_i , s_i , y n_i . Dichos datos se muestran en la siguiente tabla, donde los subíndices 1 y 2 corresponden a *S. leeuwenhoekii* C34 C2 y *S. leeuwenhoekii* C34, respectivamente:

Tabla 19: Datos estadísticos sobre el crecimiento de los cultivos para la prueba de hipótesis para diferencias de medias. Los subíndices 1 y 2 corresponden a la cepa genéticamente modificada y la cepa wildtype, respectivamente. X corresponde a la media, s corresponde a la desviación estándar y n corresponde al número de datos por cultivo (o tamaño de la población).

X_1	X_2	S_1	S_2	n_1	n_2
3,43	2,85	0,34	0,46	3	3

Se utiliza la ecuación

$$t_p = \frac{x_1 - x_2 - \delta}{\sqrt{\frac{s_c^2}{n_1} + \frac{s_c^2}{n_2}}}$$

Donde t_p corresponde al valor de prueba, y s_c es la desviación estándar acumulada.

$$s_c^2 = \frac{(n_1 - 1) \cdot s_1^2 + (n_2 - 1) \cdot s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

I. Se plantean las hipótesis:

- Hipótesis nula: la diferencia entre ambas medias es menor que δ , para $\delta = 5\%$ de x_2 , es decir, $\delta = 0,1425$

$$H_0: x_1 - x_2 < \delta$$

- Hipótesis de rechazo: La diferencia entre ambas medias es mayor que δ

$$H_1: x_1 - x_2 \geq \delta$$

II. Se plantea el nivel de significancia α (que es arbitrario) y los grados de libertad v . Se utilizará $\alpha = 5\%$. $1-\alpha$ es el nivel de confianza. Los grados de libertad se calculan como se muestra a continuación.

$$V = n_1 + n_2 - 2$$

$$\alpha = 0,05$$

III. Se calcula t_p y t_c , utilizando la ecuación mostrada anteriormente y la tabla de valores para la t de student, respectivamente.

IV.

Primero, se calcula s_c^2 :

$$s_c^2 = \frac{(3 - 1) \cdot 0,34^2 + (3 - 1) \cdot 0,46^2}{3 + 3 - 2} = 0,1636$$

Luego, se calcula t_p :

$$t_p = \frac{3,43 - 2,85 - 0,1425}{\sqrt{\frac{0,1636}{3} + \frac{0,1636}{3}}} = \frac{0,4365}{0,33025} = 1,322$$

Obteniendo t_c desde la tabla¹⁸ con 4 grados de libertad con 95% de confianza, se tiene

$$t_c = 1,533$$

¹⁸ https://en.wikibooks.org/wiki/Engineering_Tables/Student%27s_T-Distribution

Finalmente, como $t_p < t_c$, se acepta la hipótesis nula. Es decir, con un 95% de confianza se puede afirmar que la diferencia entre los promedios de crecimiento para ambas cepas es menor que el 5% del promedio de crecimiento de *S. leeuwenhoekii* C34, 0,1425 [mg/ml].

Resultados de la prueba de hipótesis

Se incluye a continuación una tabla con los resultados de los cálculos realizados aumentando el tamaño de la población y la diferencia entre ambos crecimientos promedio.

Tabla 20: Resultados de la prueba de hipótesis para diferencias de medias, calculados utilizando tamaños de muestra de 6, 12 y 18, y una diferencia de crecimientos promedio entre ambas cepas de 5 y 10%. Se presentan los valores de la t de student y "A" si se acepta la hipótesis nula y "R" si ésta es rechazada.

δ	5% = 0,1425 [mg/ml]			10% = 0,285 [mg/ml]		
n	6	12	18	6	12	18
tp	1,88	2,66	3,25	1,27	1,79	2,20
tc	1,81	1,72	1,69	1,81	1,72	1,69
Resultado	R	R	R	A	R	R

En la Tabla 20, se presentan los valores críticos de la t de student (t_c) para los grados de libertad correspondientes y un 95% de confianza. También se incluyen los valores calculados para la t de student (t_p) de prueba en cada caso y se asigna una "A" si se acepta la hipótesis nula y "R" si ésta es rechazada. Es decir, si se acepta, la diferencia entre el crecimiento promedio de ambas cepas es menor que δ , y si se rechaza es mayor o igual que δ .

Tabla 21: Resultados de la prueba de hipótesis para diferencias de medias para el halo de inhibición de crecimiento producido por el sobrenadante del medio de cultivo de *S. leeuwenhoekii* C34 y *S. leeuwenhoekii* C34 C2, normalizado por la biomasa obtenida por cada cepa. Se presentan los valores de la t de student y "A" si se acepta la hipótesis nula y "R" si ésta es rechazada.

δ	5% = 0,0615	10% = 0,123
n	6	10
tp	1,998	1,788
tc	1,812	1,734
Resultado	R	R

Análogamente, en la Tabla 21 se muestran los resultados de la prueba de hipótesis para diferencias de medias para el halo de inhibición de crecimiento producido por el sobrenadante del medio de cultivo de *S. leeuwenhoekii* C34 y *S. leeuwenhoekii* C34 C2, normalizado por la biomasa obtenida por cada cepa.

H. Resultados de la secuenciación

A continuación, se muestran fragmentos de los resultados de la secuenciación realizada en MacroGen del DNA plasmidial obtenido de *E. coli* DH5 α *Sle39830*-pIJ10257 y de *E. coli* DH5 α *Sle27500*-pIJ12551, contrastados con las secuencias correspondientes de los genes de cada caso obtenidas de benchling.

1. Secuenciación de *Sle39830*-pIJ10257

En la Figura 30 y la Figura 31 se muestra en la parte superior un fragmento de la secuencia entregada por MacroGen de la amplificación del DNA plasmidial de *E. coli* DH5 α *Sle39830*-pIJ10257 utilizando los partidores BZ01F y BZ01R en orientación 5' a 3', respectivamente. En la parte inferior se explicitan las secuencias de los genes correspondientes a los mismos fragmentos de la secuenciación, obtenidas desde benchling.

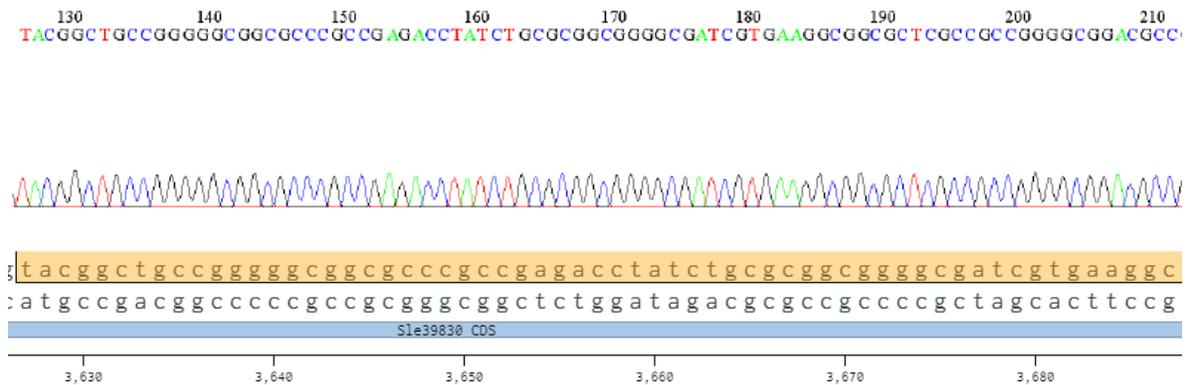


Figura 30: Resultado de la secuenciación del DNA plasmidial de *E. coli* DH5 α *Sle39830*-pIJ10257 amplificada con el partidore forward BZ01F(arriba) y la secuencia del fragmento correspondiente del gen *Sle39830* obtenida desde benchling (abajo).

Cabe mencionar que en la Figura 31 la secuenciación entregada por MacroGen se encuentra en sentido 5' a 3' pero en benchling se visualiza al revés.

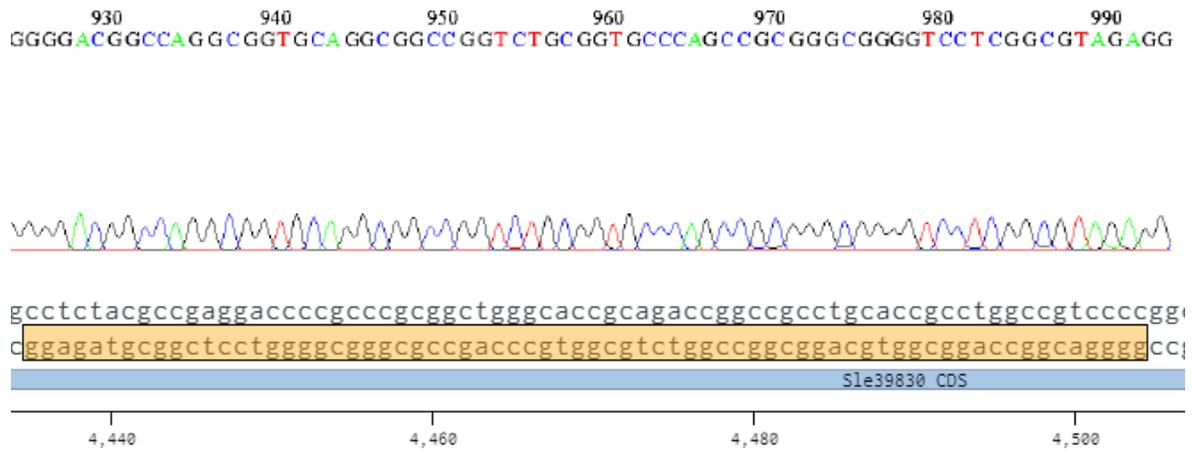


Figura 31: Resultado de la secuenciación del DNA plasmidial de *E. coli* DH5α *Sle39830-pIJ10257* amplificada con el partidor reverse BZ01R(arriba) y la secuencia del fragmento correspondiente del gen *Sle39830* obtenida desde benchling (abajo).

2. Secuenciación de *Sle27500-pIJ12551*

En la Figura 32 y la Figura 33 se muestra en la parte superior un fragmento de la secuencia entregada por Macrogen de la amplificación del DNA plasmidial de *E. coli* DH5α *Sle27500-pIJ12551* utilizando los partidores GBA04 (forward) y GBA03(reverse) en orientación 5´a 3´, respectivamente. En la parte inferior se explicitan las secuencias de los genes correspondientes a los mismos fragmentos de la secuenciación, obtenidas desde benchling.

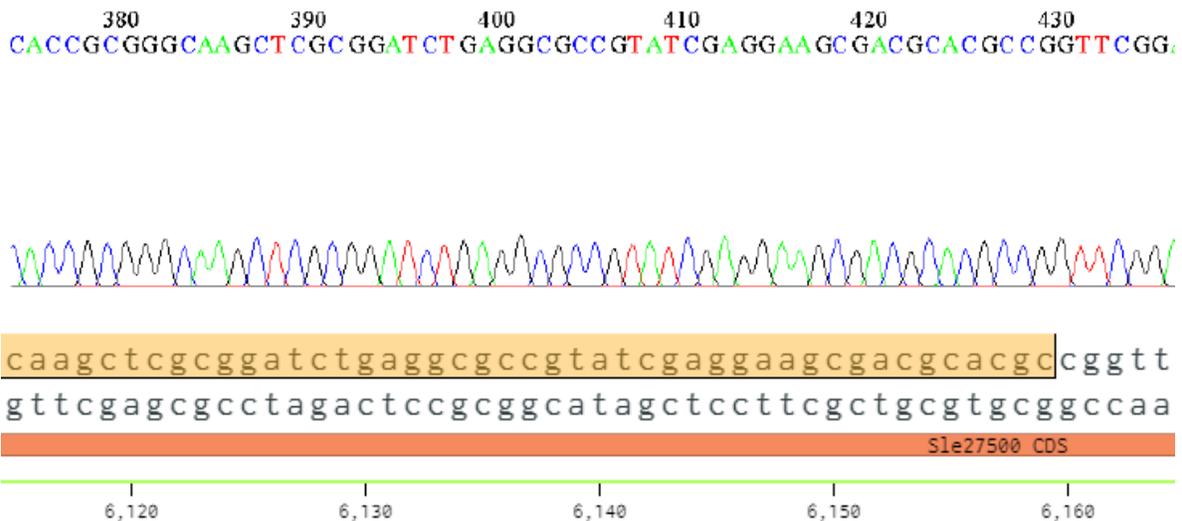


Figura 32: Resultado de la secuenciación del DNA plasmidial de *E. coli* DH5α *Sle27500-Pij12551* amplificada con el partidor forward GBA04 (arriba) y la secuencia del fragmento correspondiente del gen *Sle27500* obtenida desde benchling (abajo).

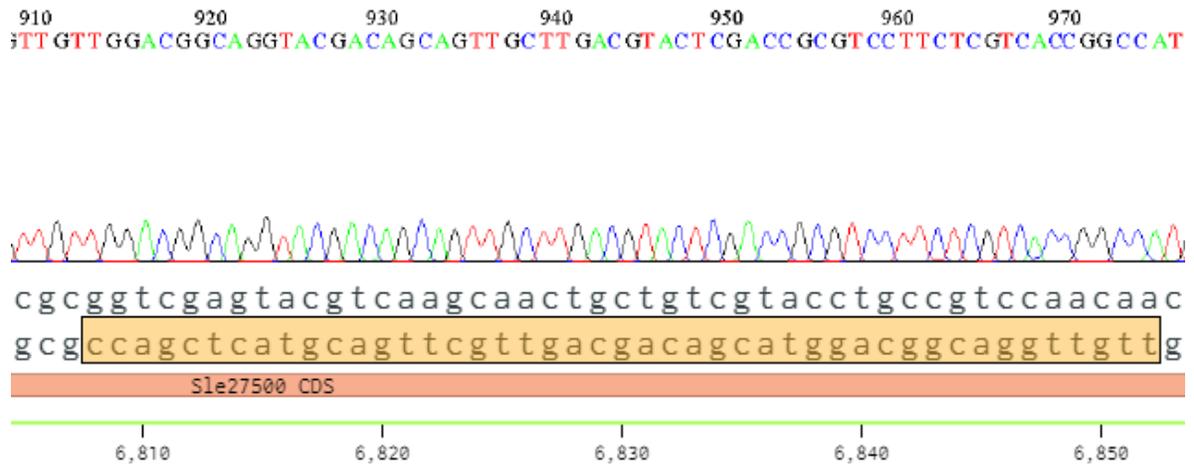


Figura 33: Resultado de la secuenciación del DNA plasmidial de *E. coli* DH5α *Sle27500-Pij12551* amplificada con el partidor reverse *GBA03* (arriba) y la secuencia del fragmento correspondiente del gen *Sle27500* obtenida desde benchling (abajo).

Al igual que en la Figura 31, en la Figura 33 la secuenciación entregada por Macrogen se encuentra en sentido 5' a 3' pero en benchling se visualiza al revés.

I. Información adicional sobre el análisis de perfiles metabólicos

1. Datos estadísticos y pruebas de hipótesis

Promedios y desviaciones estándar

A continuación, se muestran datos complementarios utilizados en el análisis estadístico realizado para evaluar la relevancia de las diferencias de medias entre las abundancias chaxamicinas A - D y chaxalactinas A – D, en las distintas muestras de sobrenadante o extracto metanólico, provenientes de los cultivos de *S. leeuwenhoekii* C34 y *S. leeuwenhoekii* C34 C2.

*Tabla 22: Promedio de abundancia para chaxamicinas A-D, junto con la desviación estándar de los datos (σ), para las muestras provenientes del sobrenadante y extracto metanólico del pellet, de los cultivos de *S. leeuwenhoekii* C34 C2 y *S. leeuwenhoekii* C34.*

	<i>S. leeuwenhoekii</i> C34C2				<i>S. leeuwenhoekii</i> C34			
	Chaxamicina				Chaxamicina			
	A	B	C	D	A	B	C	D
Sobrenadante	3190	6105	8106	15886	4710	12962	20187	212636
σ	2000	1811	2839	21906	1301	2901	4233	14210
MeOH 50%	6049	2310	2835	437	8275	3765	4202	4909
σ	2993	603	352	756	5002	961	1262	4828

*Tabla 23: Promedio de abundancia para chaxalactinas A-C, junto con la desviación estándar de los datos (σ), para las muestras provenientes del sobrenadante y extracto metanólico del pellet, de los cultivos de *S. leeuwenhoekii* C34 C2 y *S. leeuwenhoekii* C34.*

	<i>S. leeuwenhoekii</i> C34C2			<i>S. leeuwenhoekii</i> C34		
	Chaxalactina			Chaxalactina		
	A	B	C	A	B	C
Sobrenadante	316	82	229	1763	933	5226
σ	130	143	231	1083	651	3582
MeOH 50%	807	556	1717	7935	4029	21836
σ	701	482	1169	11377	5249	31212

Resultados de las pruebas de hipótesis para las diferencias de medias de las abundancias de chaxamicinas y chaxalactinas

Adicionalmente, se muestran los resultados de las pruebas de hipótesis recién mencionadas, que fueron calculados utilizando distintos tamaños de muestra, n , y distintas diferencias de abundancia promedio entre ambas cepas, δ . Con un 95% de confianza se rechaza la hipótesis nula si t_p es mayor que t_c , indicando con una "A" si se acepta la hipótesis nula y con una "R" si ésta es rechazada.

Se muestran los parámetros estadísticos y resultados asociados a las pruebas de hipótesis para diferencias de medias, correspondientes a los datos sobre abundancia de chaxamicinas, provenientes de las muestras de sobrenadante (fracción extracelular) y extracto metanólico del *pellet* (fracción intracelular) de los cultivos de ambas cepas, que se encuentran en la Tabla 24 y la Tabla 25, respectivamente.

Tabla 24: Se muestran los parámetros estadísticos y los resultados de las pruebas de hipótesis para las diferencias de medias de las abundancias de chaxamicinas en las muestras de sobrenadante de S. leeuwenhoekii C34 y S. leeuwenhoekii C34 C2.

		Chaxamicinas - Sobrenadante			
		A	B	C	D
δ		10% = 471	20% = 2592	25% = 5046	75% = 88,15
n		15	3	3	3
t_p		1,702	2,16	2,90	2,47
t_c		1701	2132,00	2132,00	2132,00
Resultado		R	R	R	R

Tabla 25: Se muestran los parámetros estadísticos y los resultados de las pruebas de hipótesis para las diferencias de medias de las abundancias de chaxamicinas en las muestras de extracto metanólico del pellet (fracción intracelular) del medio de cultivo de S. leeuwenhoekii C34 y S. leeuwenhoekii C34 C2.

		Chaxamicinas – Extracto metanólico al 50%			
		A	B	C	D
δ		5% = 413	20% = 753	15% = 630	30% = 1472
n		29	9	10	9
t_p		1,674	1,855	1,779	1,840
t_c		1,673	1,746	1,734	1,746
Resultado		R	R	R	R

Se muestran los parámetros estadísticos y resultados asociados a las pruebas de hipótesis para diferencias de medias, correspondientes a los datos sobre abundancia de chaxalactinas, provenientes de las muestras de sobrenadante (fracción extracelular) y extracto metanólico del *pellet* (fracción intracelular) de los cultivos de ambas cepas, que se encuentran en la Tabla 26 y la Tabla 27, respectivamente.

Tabla 26: Se muestran los parámetros estadísticos y los resultados de las pruebas de hipótesis para las diferencias de medias de las abundancias de chaxalactinas en las muestras de sobrenadante del medio de cultivo de *S. leeuwenhoekii* C34 y *S. leeuwenhoekii* C34 C2.

		Chaxalactinas - Sobrenadante		
		A	B	C
δ		10% = 176,3	10% = 93,26	10% = 176,3
n		4	4	3
tp		2,33	2,273	2,16
tc		1,94	1,943	2,13
Resultado		R	R	R

Tabla 27: Se muestran los parámetros estadísticos y los resultados de las pruebas de hipótesis para las diferencias de medias de las abundancias de chaxalactinas en las muestras de extracto metanólico del *pellet* del medio de cultivo de *S. leeuwenhoekii* C34 y *S. leeuwenhoekii* C34 C2.

		Chaxalactinas - MeOH		
		A	B	C
δ		10% = 793	10% = 402	10% = 176,3
n		10	9	10
tp		1,75	1,75	1,81
tc		2,101	2,101	1,734
Resultado		R	R	R