



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN HOSPEDERO PARA LA EXPRESIÓN
HETERÓLOGA DE CLÚSTERES DE METABOLITOS SECUNDARIOS**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:
BRENDA GÓMEZ ORTIZ**

**TUTOR PRINCIPAL
Sergio Sánchez Esquivel
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Romina Rodríguez Sanoja
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM**

**José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio
Facultad de Química, UNAM**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. agosto, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

El siguiente trabajo de tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología Industrial del departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del doctor Sergio Sánchez Esquivel.

Agradecimientos

Al Dr. Sergio Sánchez Esquivel, por el apoyo que nos brinda para la realización de nuestros proyectos y por ser el pilar de una familia de laboratorio que va más allá de un equipo de trabajo, gracias doctor por ser para nosotros un gran ejemplo a seguir.

A la Dra. Beatriz Ruiz Villafán que admiro enormemente, porque a pesar de todas sus ocupaciones siempre está ahí para apoyarnos, asesorarnos y asegurarse de que el laboratorio funcione bien. También por la paciencia que nos tienes y por salvarnos cada que hacemos algo mal. Gracias Betty por el apoyo en muchos de mis experimentos, en la revisión de mi escrito y por tu amistad.

Al M. en C. Omar Jiménez de quien aprendí muchísimo sobre las correctas prácticas de laboratorio, por todo tu apoyo para la obtención de la mutante y por tu amistad.

A Sarai, Dulce y Kath por tantas risas y por su amistad incondicional dentro y fuera del lab.

A la Dra. Silvia Margarita Guzmán Trampe por enseñarme con mucho amor y pasión sobre el mundo de los hospederos, ¡Te extrañamos pirata! También a la Dra. Karol Rodríguez que igual con mucho amor me enseñó sobre la identificación de compuestos naturales.

A la Dra. Romina Rodríguez Sanoja por haber sido parte de mi comité tutorial y por sus valiosas aportaciones, así como a su grupo de trabajo que también me aportó comentarios valiosos en los seminarios de grupo.

Al Dr. Jesús Aguilar Osorio también por haber sido parte de mi comité tutorial y por sus valiosas aportaciones a mi proyecto.

A la Dra. Amelia Farres, al Dr. Adelfo Escalante, al Dr. Horacio Reyes, a la Dra. Ana María Cevallos y a la Dra. Elizabeth Langley por la revisión de este escrito.

Al posgrado de Ciencias Bioquímicas, al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado, PAEP, y a todos mis profesores.

A DGAPA proyecto PAPIIT IN202216 y al programa NUATEI del Instituto de Investigaciones Biomédicas por el financiamiento del proyecto, así como a CONACYT por la beca otorgada durante este periodo.

A todas las personas que fuera de laboratorio también fueron un apoyo incondicional durante mi estancia en el posgrado. Principalmente a mi familia, mi mamá, mi papá, a mi abuela, tías, primas, a Gaby y a Melvin, ¡Gracias por todo su amor!

"Messieurs, c'est les microbes qui auront le dernier mot."

Louis Pasteur

Contenido	i
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	iii
APÉNDICE	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
3. Justificación	10
4. Hipótesis	10
5. Objetivos	10
6. Metodología a seguir	11
6.1 Material biológico	11
6.2 Obtención y titulación de preparaciones densas de esporas de la cepa silvestre (WT) de <i>S. venezuelae</i>	13
6.3 Extracción de compuestos producidos por <i>S. venezuelae</i> en medio GI	14
6.4 Búsqueda de cloranfenicol en los compuestos extraídos de <i>S. venezuelae</i> por cromatografía de capa fina	15
6.5 Evaluación de la actividad bacteriostática de los extractos de <i>S. venezuelae</i> contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas	15
6.6 Análisis de la producción de antibiótico por <i>S. venezuelae</i> WT en medio GI mediante pruebas de antibiosis	16
6.7 Cinética de crecimiento de <i>S. venezuelae</i> WT en medio GI	16
6.8 Análisis de la producción de cloranfenicol por <i>S. venezuelae</i> WT en medio GI mediante UPLC-MS	17
6.9 Diseño de oligonucleótidos para la interrupción de los genes <i>cmlH</i> y <i>cmlI</i> , <i>cmlIH</i> , <i>cmlP</i> y <i>cmlA</i>	18
6.10 Obtención del cósmido pAH91	19
6.11 Generación de células electrocompetentes de <i>Escherichia coli</i> BW25113/ pIJ790	20
6.12 Transformación de <i>E. coli</i> BW25113/ pIJ790 con el cósmido pAH91	21
6.13 Generación de células electrocompetentes de <i>E. coli</i> BW25113/pIJ790/pAH91	22
6.14 Generación de células electrocompetentes de <i>E. coli</i> JM109 y su transformación con el plásmido pIJ778	22
6.15 Obtención del casete de resistencia a espectinomicina	23
6.16 Extensión del casete de resistencia a espectinomicina	24

6.17 Interrupción de los genes <i>cmlH</i> y <i>cmlI</i> , <i>cmlH cmlP</i> y <i>cmlA</i> en <i>E. coli</i> BW25113/ pIJ790/ pAH91	24
6.18 Generación de células electrocompetentes de <i>E. coli</i> ET12567/ (pUZ8002)	26
6.19 Transformación de <i>E. coli</i> ET12567/ (pUZ8002) con el cósmido pAH91/ <i>cmlH</i> :: <i>aadA</i>	26
6.20 Conjugación de <i>E. coli</i> ET12567/ (pUZ8002)/ pAH91/ <i>cmlH</i> :: <i>aadA</i> con <i>S. venezuelae</i> WT	26
6.21 Confirmación de la interrupción del gen <i>cmlH</i> en <i>S. venezuelae</i> por PCR de colonia	28
6.22 Extracción de ADN genómico de <i>S. venezuelae</i>	29
6.23 Confirmación de la interrupción del gen <i>cmlH</i> en <i>S. venezuelae</i> por PCR y secuenciación	30
6.24 Obtención y titulación de preparaciones densas de esporas de <i>S. venezuelae</i> Δ <i>cmlH</i>	31
6.25 Cinética de crecimiento de <i>S. venezuelae</i> Δ <i>cmlH</i> en medio GI	31
6.26 Análisis de la producción de cloranfenicol por <i>S. venezuelae</i> Δ <i>cmlH</i> en medio GI mediante UPLC-MS	31
6.27 Análisis de la producción de antibiótico por <i>S. venezuelae</i> Δ <i>cmlH</i> en medio GI mediante pruebas de antibiosis	31
6.28 Transformación de <i>E. coli</i> ET12567/ (pUZ8002) con el plásmido pIJ6902 y pIJ6902/ <i>alkA</i>	31
6.29 Conjugación de los plásmidos pIJ6902 y pIJ6902/ <i>alkA</i> con <i>S. venezuelae</i> WT y con <i>S. venezuelae</i> Δ <i>cmlH</i>	32
6.30 Confirmación de la inserción de los plásmidos pIJ6902 y pIJ6902/ <i>alkA</i> en <i>S. venezuelae</i> WT y en <i>S. venezuelae</i> Δ <i>cmlH</i> por PCR de colonia	32
6.31 Confirmación de la expresión del gen <i>alkA</i> en <i>S. venezuelae</i> WT y en <i>S. venezuelae</i> Δ <i>cmlH</i> por TLC	33
6.32 Análisis bioinformático para la predicción de clústeres de metabolitos secundarios en <i>S. venezuelae</i> WT	34
7. Resultados	34
7.1 Producción de cloranfenicol por <i>S. venezuelae</i> en medio GI	34
7.2 Determinación de la tasa de crecimiento de <i>S. venezuelae</i> ATCC 10712 (WT) en medio GI	36
7.3 Producción de antibiótico por <i>S. venezuelae</i> ATCC 10712 (WT) en medio GI	37
7.4 Purificación del cósmido pAH91 y del plásmido pIJ778	38
7.5 Obtención y extensión del casete de resistencia a	39

espectinomycinina	
7.6 Evaluación por PCR de las colonias de <i>E. coli</i> BW25113/ pIJ790/ pAH91 transformadas con los casetes extendidos	40
7.7 Obtención de transformantes resistentes a espectinomycinina de <i>S. venezuelae</i>	42
7.8 Determinación de la tasa de crecimiento de <i>S. venezuelae</i> $\Delta cmlH$ en medio GI	44
7.9 Comparación de la tasa de crecimiento de <i>S. venezuelae</i> ATCC 10712 (WT) y <i>S. venezuelae</i> $\Delta cmlH$ en medio GI	45
7.10 Producción de antibiótico de <i>S. venezuelae</i> $\Delta cmlH$ en medio GI	46
7.11 Producción de cloranfenicol por <i>S. venezuelae</i> $\Delta cmlH$ en medio GI	47
7.12 <i>S. venezuelae</i> WT y <i>S. venezuelae</i> $\Delta cmlH$ como hospederos para expresión heteróloga	48
7.13 Análisis bioinformático de los clústeres para la producción de metabolitos secundarios por <i>S. venezuelae</i> WT	51
8. Discusión	52
9. Conclusiones	62
10. Perspectivas	62
11. Literatura citada	63
12. Apéndice	67

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Síntesis del cloranfenicol a partir de la vía del ácido Shikímico	8
Figura 2. Marcos abiertos de lectura (ORFs) adyacentes a <i>pabAB</i>	9
Figura 3. Diseño de oligonucleótidos para PCR- targeting	19
Figura 4. Plásmido pIJ790	20
Figura 5. Plásmido pIJ778	22
Figura 6. Diseño de oligonucleótidos para confirmación	25
Figura 7. Presencia y actividad de los compuestos extraídos de <i>S. venezuelae</i>	35
Figura 8. Detección de cloranfenicol en <i>S. venezuelae</i> WT	36
Figura 9. Cinética de crecimiento de <i>S. venezuelae</i> WT	37
Figura 10. Ensayo de antibiosis de <i>S. venezuelae</i> WT	38
Figura 11. Obtención del cósmido pAH91 y el plásmido pIJ778	39
Figura 12. Digestión del plásmido pIJ778 y purificación del casete de	40

resistencia a espectinomicina	
Figura 13. Evaluación de las colonias transformadas con los casetes extendidos	41
Figura 14. Conjugación de <i>E. coli</i> ET12567/ (pUZ8002)/ pAH91/ <i>cmlH</i> :: <i>aadA</i> con <i>S. venezuelae</i>	43
Figura 15. Evaluación del ADN genómico de <i>S. venezuelae</i> transformado con los casetes extendidos	44
Figura 16. Cinética de crecimiento de <i>S. venezuelae</i> Δ <i>cmlH</i>	45
Figura 17. Comparación de la cinética de crecimiento de <i>S. venezuelae</i> WT y <i>S. venezuelae</i> Δ <i>cmlH</i>	46
Figura 18. Ensayo de antibiosis de <i>S. venezuelae</i> Δ <i>cmlH</i>	47
Figura 19. Detección de cloranfenicol en <i>S. venezuelae</i> Δ <i>cmlH</i>	48
Figura 20. Conjugación de pIJ6902/ <i>alkA</i> con <i>S. venezuelae</i> WT y con <i>S. venezuelae</i> Δ <i>cmlH</i>	49
Figura 21. Análisis de la expresión de <i>alkA</i> por TLC	51
Figura 22. Clústeres potenciales para la producción de metabolitos secundarios de <i>S. venezuelae</i> (ATCC 10712)	52

Tabla 1. Cepas utilizadas durante la realización de este trabajo	11
--	----

APÉNDICE

Medios de cultivo	67
Soluciones	69
Diagrama A1. Estrategia experimental para el diseño y construcción de un hospedero para expresión heteróloga de clústeres de metabolitos secundarios a partir de <i>S. venezuelae</i> ATCC 10712	73
Diagrama A2. Estrategia experimental para interrumpir la vía de síntesis de cloranfenicol por PCR-targeting	74

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>aadA</i>	Casete de resistencia a espectinomicina/ estreptomicina
ADC	Ácido 4-amino-4-deoxicorísmico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Trifosfato de adenosina
BLAST	Basic local alignment search tool
CDA	Antibiótico dependiente de calcio
CPK	Policétido tipo 1
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
H	Horas
HPLC- MS	Cromatografía líquida acoplada a masas
H ₂ O	Agua
Kb	Kilobases
M	Molar
Mg	Miligramos
Min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
MPM	Marcador de peso molecular
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
nt	Nucleótidos
NoA ₂	Nosocomicina A ₂
μl	Microlitros
μg	Microgramos
ORFs	Marcos abiertos de lectura
PAPA	p- aminofenilalanina
PAPS	p- aminofenilserina
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
PKSI	Policétido sintasa tipo I
PKSIII	Policétido sintasa tipo III
SDS	Dodecilsulfato sódico
SSI	Solución salina isotónica
TLC	Cromatografía en capa fina
UFC	Unidades formadoras de colonias
UPLC- MS	Ultra performance liquid chromatography
UV	Luz ultravioleta
V	Voltios
WT	Wild type (tipo silvestre)
x g	Fuerza centrífuga relativa

Resumen

A diferencia de los productos generados por el metabolismo primario, la diversidad de metabolitos secundarios en la naturaleza es muy amplia. Estas sustancias han sido estudiadas y utilizadas con éxito durante muchos años por sus propiedades farmacológicas y su interés industrial, principalmente aquellas producidas por el grupo de las actinobacterias, como es el caso de los antibióticos. Actualmente, es necesario realizar la búsqueda de nuevos antibióticos, ya que algunos de estos presentan toxicidad y los microorganismos patógenos han desarrollado resistencia contra muchos de los que se utilizan en medicina. Para llevar a cabo el descubrimiento y análisis de nuevas moléculas con actividad antibiótica en ocasiones es necesario hacer uso de hospederos heterólogos, ya que muchos microorganismos presentan dificultades de crecimiento en condiciones de laboratorio, o los metabolitos de interés se producen en concentraciones muy bajas para su estudio. Se han diseñado cepas especiales para la expresión heteróloga de metabolitos secundarios, eliminando las vías de síntesis para la producción de los metabolitos endógenos del hospedero para evitar la competencia por los precursores, y para obtener perfiles cromatográficos más sencillos. Sin embargo, los hospederos más importantes hasta ahora disponibles para este fin son propiedad de las instituciones donde se crearon y la obtención de los mismos está limitada y sujeta a una serie de convenios que limitan su empleo. En este trabajo se utilizó a *Streptomyces venezuelae* como modelo para la obtención de un hospedero para expresión heteróloga que sea propiedad de la UNAM. Se eligió a *S. venezuelae* por sus ventajas de crecimiento y de manipulación genética que presenta frente a otras actinobacterias. Haciendo uso de la técnica de PCR-targeting se bloqueó la vía de síntesis del cloranfenicol en dicha cepa. Al hacer una comparación de *S. venezuelae* WT y de la mutante obtenida se demostró que la interrupción de la vía de síntesis afectó la capacidad antibiótica de la cepa, pero no afectó su crecimiento.

Abstract

Unlike products generated by primary metabolism, the diversity of secondary metabolites in nature is wider. These substances have been studied and used successfully for many years for their pharmacological properties and industrial interest, mainly those produced by the group of actinobacteria, as the case of antibiotics. Currently it is necessary to search for new antibiotics, since many of these present toxicity and pathogenic microorganisms have developed resistance against many of those used in medicine. In order to carry out the discovery and analysis of new molecules with antibiotic activity, it is sometimes necessary the use of heterologous hosts, since many microorganisms present growth difficulties under laboratory conditions, or the metabolites of interest are produced in very low concentrations for their study. Some strains have been designed for the heterologous expression of secondary metabolites, blocking the synthesis pathways for the production of endogenous metabolites to avoid competition by precursors, and to obtain simpler chromatographic profiles. However, the most important hosts available for this purpose are property of the institutions where they were created and are limited and subject to agreements that limit their use. In this work, *Streptomyces venezuelae* was used as a model to obtain a host for heterologous expression of secondary metabolites property of UNAM. *S. venezuelae* was chosen for its growth and genetic manipulation advantages over other actinobacteria. Using PCR-targeting technique the chloramphenicol synthesis pathway in this strain was blocked. When comparing *S. venezuelae* WT and the obtained mutant, it was shown that the interruption of the synthesis pathway affected the antibiotic capacity of the strain, but did not affect its growth.

Introducción

Los metabolitos secundarios son moléculas producidas principalmente por plantas, bacterias y hongos que derivan del metabolismo primario y que son sintetizadas únicamente bajo ciertas circunstancias. Estas moléculas son utilizadas entre organismos de la misma o de diferentes especies como señales de comunicación química para interactuar con su medio ambiente dentro de los ecosistemas. Por ejemplo, pueden sintetizarse como defensa contra depredadores, parásitos u otros organismos que crecen alrededor para evitar la competencia por los recursos u otras situaciones que causen algún tipo de estrés y que representen un riesgo para el organismo que los produce (Demain y Fang, 2000; Tracanna *et al.*, 2017).

A diferencia de los productos generados mediante el metabolismo primario, la diversidad de metabolitos secundarios en la naturaleza es muy amplia. Suelen ser moléculas de bajo peso molecular y presentan múltiples funciones, razón por la cual al metabolismo secundario se le conoce también como metabolismo especializado. Estas sustancias han sido estudiadas y aprovechadas con éxito desde hace muchos años por sus propiedades de interés farmacológico e industrial, como es el caso de los antibióticos. La importancia en la salud humana de estos compuestos ha sido tal que desde su uso la expectativa de vida de nuestra especie ha aumentado considerablemente (Demain y Fang, 2000; Demain y Sanchez, 2009).

Las bacterias son una fuente muy rica de producción de antibióticos. Dentro de este dominio se encuentran las actinobacterias, donde se ubica el género *Streptomyces*, el género con mayor número de especies entre las actinobacterias (Shepherd *et al.*, 2010). Estas son bacterias Gram-positivas, formadoras de micelio, con un alto contenido de guanina y citosina (GC) en su genoma. Han sido aislados principalmente de suelos y son responsables de la producción de más del 75% de los antibióticos de interés industrial, por ejemplo, la estreptomicina y las tetraciclinas (Baltz, 2008; Demain y Fang, 2000; Enany, 2018).

A partir de estas bacterias se han logrado aislar más de 8 000 moléculas bioactivas (Enany, 2018), sin embargo, es necesaria la búsqueda de nuevas moléculas con

bioactividad, ya que los microorganismos patógenos han desarrollado resistencia contra muchas de las que se utilizan en la actualidad, o presentan toxicidad (Sánchez y Demain, 2015).

Para realizar la búsqueda de estos principios bioactivos novedosos recientemente se han aislado estos microorganismos a partir de fuentes no convencionales, por ejemplo, sedimentos marinos, cuevas, géiseres, plantas, etc. (Demain *et al.*, 2019; Sánchez y Demain, 2015). También se ha utilizado, como alternativa, la minería genómica para buscar clústeres crípticos para la producción de metabolitos secundarios en los genomas de los estreptomicetos que ya conocemos (Challis, 2008; Lee *et al.*, 2020).

La minería genómica consiste en el análisis de secuencias para el descubrimiento de productos naturales (Challis, 2008). Para ello, se utilizan una serie de programas de cómputo que han sido diseñados para predecir las rutas metabólicas para la síntesis de metabolitos secundarios, a partir de los genes codificadores presentes en los genomas. La disponibilidad de los genomas completos de algunos estreptomicetos y su análisis a través de la minería genómica, nos han enseñado que estos microorganismos producen muchos más metabolitos secundarios de los que se pensaba. Lo cual indica que los estreptomicetos continúan siendo una fuente muy rica para el descubrimiento de moléculas de interés (Lee *et al.*, 2020). Adicionalmente, hemos aprendido que los genes requeridos para la regulación, biosíntesis y transporte de estos metabolitos secundarios se encuentran, por lo general, dentro de clústeres en el genoma del organismo que los produce (Baltz, 2008; Gómez-Escribano y Bibb, 2012).

A pesar de esto, caracterizar los metabolitos secundarios desconocidos predichos mediante minería genómica puede no ser sencillo, ya que hay especies que son muy difíciles de crecer en condiciones de laboratorio, de manipular genéticamente, o puede suceder que los metabolitos de interés se sinteticen en concentraciones muy bajas para su estudio (Baltz, 2008; Kim *et al.*, 2015). Una solución a este tipo de problemas consiste en realizar expresión heteróloga en hospederos más manipulables genéticamente y cultivables, ya que estandarizar las condiciones para

un óptimo crecimiento y la obtención de los productos en su hospedero original puede requerir mucho tiempo de investigación y experimentación (Gómez-Escribano y Bibb, 2012; Kim *et al.*, 2015).

2. Antecedentes

La expresión heteróloga consiste en expresar genes de un organismo en otro diferente, y esto tiene mejores resultados si se realiza en hospederos diseñados especialmente para este fin. Para realizar dicha expresión, las técnicas más utilizadas consisten en clonar el clúster o los genes de interés en un vector adecuado, seleccionar un hospedero filogenéticamente cercano al microorganismo productor e introducir el clúster o los genes de interés al mismo, para luego crecer a la cepa recombinante en condiciones apropiadas y posteriormente se puede analizar la expresión del producto (Gómez-Escribano y Bibb, 2012).

Recientemente se ha buscado crear hospederos para realizar expresión heteróloga a partir de diferentes especies de *Streptomyces* (Baltz, 2010). Estas bacterias funcionan como buenos hospederos para sintetizar de manera más eficiente metabolitos de interés de microorganismos relacionados filogenéticamente entre sí, como pueden ser otras especies del mismo género u otras actinobacterias. Otros microorganismos modelo como *Escherichia coli* no son recomendables para este fin, ya que las proteínas expresadas pueden presentar problemas de solubilidad, de modificaciones postraduccionales, o la bacteria puede no sintetizar los precursores necesarios para llevar a cabo la vía de síntesis de ciertos metabolitos como policétidos, péptidos no ribosomales, bacteriocinas, terpenoides, derivados de la vía del ácido shikímico y aminoglucósidos, entre otros productos naturales. Sin embargo, una desventaja que presentan los sistemas de expresión heteróloga es que la síntesis del metabolito de interés a la vez compite por los precursores para la síntesis de los metabolitos endógenos del hospedero (Gómez-Escribano y Bibb, 2012; Komatsu *et al.*, 2013, Moore *et al.*, 2017).

Para evitar esta competencia por los precursores y también para poder determinar la producción del metabolito exógeno de manera más clara, se han diseñado cepas especiales para la expresión heteróloga de clústeres, eliminando los clústeres para la producción de los metabolitos endógenos del hospedero (Gómez-Escribano y Bibb, 2012; Myronovski *et al.*, 2018).

Por ejemplo, en 2011, Gómez-Escribano y Bibb crearon la cepa M1154 (y otros derivados) de *S. coelicolor* a partir de la cepa M145. Para evitar la competencia por fuentes de carbono y nitrógeno necesarias para la producción de metabolitos secundarios del hospedero, se eliminó la vía de síntesis de 4 metabolitos con actividad antibiótica producidos por *S. coelicolor*, la actinorrodina, la undecilprodigosina, el CPK (policétido tipo 1) y el CDA (antibiótico dependiente de calcio). Además, se introdujeron mutaciones puntuales en los genes *rpoB* y *rpsL*, los cuales codifican para la subunidad beta de la ARN polimerasa y la proteína ribosomal S12, respectivamente. Esta última técnica mencionada es conocida como ingeniería del ribosoma, y se ha observado que al introducir este tipo de mutaciones puede ser posible potenciar de manera importante la producción de algunos metabolitos en *Streptomyces* (Liu *et al.*, datos no publicados).

La mutante M1154 de *S. coelicolor* logró sobre-expresar metabolitos endógenos de manera significativa, lo cual se demostró al reintroducir e inducir la expresión de los genes necesarios para la producción de actinorrodina a la cepa. También logró sobre-expresar metabolitos exógenos, lo cual se demostró al introducir los clústeres para la biosíntesis del cloranfenicol de *S. venezuelae* y la congocidina de *S. ambofaciens*. Por lo tanto, las ventajas que brinda la construcción de hospederos no solamente se limitan a la expresión de clústeres de organismos que no se logran cultivar en el laboratorio, sino que además se pueden obtener mayores concentraciones de algunos compuestos de interés que normalmente se sintetizan en cantidades bajas en su hospedero natural, lo cual facilita su caracterización química (Gómez-Escribano y Bibb, 2011; Komatsu *et al.*, 2010; Myronovski *et al.*, 2018).

Otra de las ventajas de eliminar clústeres endógenos de hospederos para expresión heteróloga es que se ha observado que estas cepas presentan perfiles cromatográficos más simples de sus metabolitos endógenos, lo cual puede facilitar la identificación y caracterización de nuevos compuestos (Gómez-Escribano y Bibb, 2011 Myronovski *et al.*, 2018).

También se ha buscado diseñar hospederos a partir de *S. avermitilis*, ya que esta cepa presenta ciertas ventajas durante la producción de metabolitos secundarios a nivel industrial, en comparación a otras cepas modelo como *S. coelicolor*, por ejemplo, una mayor tolerancia a situaciones de estrés como altas temperaturas y condiciones hipertónicas (Komatsu *et al.*, 2010; Komatsu *et al.*, 2013). Otros hospederos han sido diseñados a partir de *S. albus* por sus ventajas de crecimiento y de manipulación genética (Myronovski *et al.*, 2018).

S. venezuelae WT (ATCC 10712) también se ha utilizado como modelo para realizar expresión heteróloga, ya que al igual que las cepas antes mencionadas, presenta ciertas ventajas frente a otras actinobacterias. Por ejemplo, su rápido crecimiento, su capacidad de esporular en medio líquido y presentar poca agregación en el mismo, lo cual es una ventaja durante la producción de compuestos de interés en un biorreactor, ya que la formación de un micelio denso afecta la oxigenación de los cultivos, lo cual es una desventaja que presentan muchas otras especies de estreptomicetos. Además, su manipulación genética resulta más sencilla en comparación a otras especies, ya que presenta una alta tasa de transformación por electroporación y de conjugación con *E. coli*, un modelo ampliamente utilizado en diferentes técnicas de biología molecular. Adicionalmente, su genoma, que mide más de 8 000 kilobases, se encuentra público y existe una biblioteca de cósmidos así como de plásmidos integrativos disponibles (Kim *et al.*, 20015, Moore *et al.*, 2017, Tschowri, 2016). Su ciclo de vida, como el del resto de los estreptomicetos, consiste en la germinación de una spora, formación de un micelio vegetativo, formación de un micelio aéreo y finalmente la esporulación, que presenta un fenotipo azul-verdoso, y que permite que el ciclo se repita (Kim *et al.*, 20015; Tschowri, 2016).

Otra cepa de *S. venezuelae* que ha sido utilizada para realizar expresión heteróloga, por presentar ventajas de crecimiento, es la ATCC 15439, en la cual se han logrado producir policétidos, híbridos de policétidos y péptidos no ribosomales, así como aminoglucósidos (Kim *et al.*, 2015).

En 2006, a partir de *S. venezuelae* ATCC 15439 se creó la cepa DHS2001, en la cual se bloqueó la vía de síntesis de un metabolito producido a través de un sistema PKS I (policétido sintasa tipo I), la picromicina, esto tras la eliminación de los genes *pikA* en *S. venezuelae* ATCC 15439. DHS2001 fue utilizada con éxito para la producción heteróloga de compuestos sintetizados mediante policétidos sintasas, como la tilactona, precursor para la síntesis de la tilosina, un antibiótico de uso veterinario para el tratamiento de neumonía y otras enfermedades. Dicha mutante fue capaz de producir 0.5 mg/l de tilactona tras 4 días de cultivo, lo cual es una mayor concentración en comparación a la cantidad sintetizada por su hospedero nativo, *S. fradiae*, y por otros estreptomicetos utilizados como hospederos heterólogos (Jung *et al.*, 2006).

Actualmente, se sabe que la cepa ISP5230 (ATCC 10712, WT) es capaz de crecer más rápido que la cepa ATCC 15439, de modo que se ha buscado diseñar hospederos utilizando este modelo (Fan *et al.*, 2012, Yin *et al.*, 2016).

En 2012, Fan y colaboradores crearon una mutante a partir de *S. venezuelae* ISP5230 (ATCC 10712, WT) a la cual se le deletó gran parte del clúster que contiene los genes para la biosíntesis de la jadomicina, una aglicona producida bajo condiciones de estrés. En 2016, Yin y colaboradores probaron esta cepa, denominada WVR2006, como hospedero para la expresión heteróloga de una oxitetraciclina, un antibiótico de alto espectro utilizado en veterinaria y acuicultura como aditivo en los alimentos. Dado las ventajas de crecimiento de *S. venezuelae* reportaron que este hospedero logró producir en 48 h la cantidad del metabolito producido durante 8 días en su hospedero natural, *S. rimosus*.

La cepa de *S. venezuelae* ISP5230 (ATCC 10712, WT) también ha sido utilizada para expresar de manera heteróloga el clúster de la nosocomicina A₂ (NoA₂)

producido de manera natural por *S. ghanaensis*. En 2014, Lapatniuk y colaboradores expresaron heterológamente este clúster en diferentes hospederos. Para expresar este fosfo-glicolípido perteneciente a la familia de las moenomycinas, que tienen la capacidad de inhibir enzimas que participan en la formación de la pared bacteriana de algunos microorganismos, utilizaron las cepas M145, M1152 y M1154 de *S. coelicolor*, *S. albus*, *S. thermospinosporus*, y *S. venezuelae* (WT). En este trabajo, observaron que *S. venezuelae* presentó un óptimo crecimiento en las condiciones de producción de la nosocomicina y una elevada actividad antibiótica usando ensayos de difusión en disco. Sin embargo, esto no fue debido a una sobre producción de nosocomicina sino a la co-expresión del cloranfenicol, de acuerdo a los resultados obtenidos por HPLC-MS.

El cloranfenicol es un metabolito secundario producido y excretado por ciertas actinobacterias como *S. venezuelae* bajo ciertas condiciones, por ejemplo, cuando se empiezan a agotar los nutrientes en su medio, o bajo situaciones de estrés. Esta molécula pertenece a los fenicoles, y presenta actividad bacteriostática contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, es decir, no produce la muerte de estas bacterias, pero si impide su proliferación, ya que inhibe la síntesis proteica uniéndose a la subunidad 50S ribosomal (Fernández-Martínez *et al.*, 2014; He *et al.*, 2001).

La síntesis del cloranfenicol comienza por la vía metabólica del shikimato o del ácido shikímico, donde se forma el anillo aromático que lo compone (Figura 1). Esta vía se encuentra principalmente en bacterias y plantas y es responsable de la síntesis de aminoácidos aromáticos como la fenilalanina, la tirosina y el triptófano, además de otros compuestos. A partir del ácido shikímico se forma el ácido corísmico, y a partir de éste se da la reacción inicial de la síntesis del cloranfenicol. Para ello, este precursor se convierte en ácido 4-amino-4-deoxicorísmico (ADC) por la acción de un complejo enzimático formado por la asociación de los productos de los genes *pabA* y *pabB*. Luego el ADC forma ácido 4-amino 4-desoxiprefénico y éste produce el ácido p-aminofenilpirúvico. Este último intermediario se convierte en p-aminofenilalanina (PAPA) que sirve como precursor para la formación de p-

aminofenilserina (PAPS). Finalmente, PAPS es convertido en p-nitrofenilserinol, y éste es utilizado para la formación del producto final, el cloranfenicol (He *et al.*, 2001).

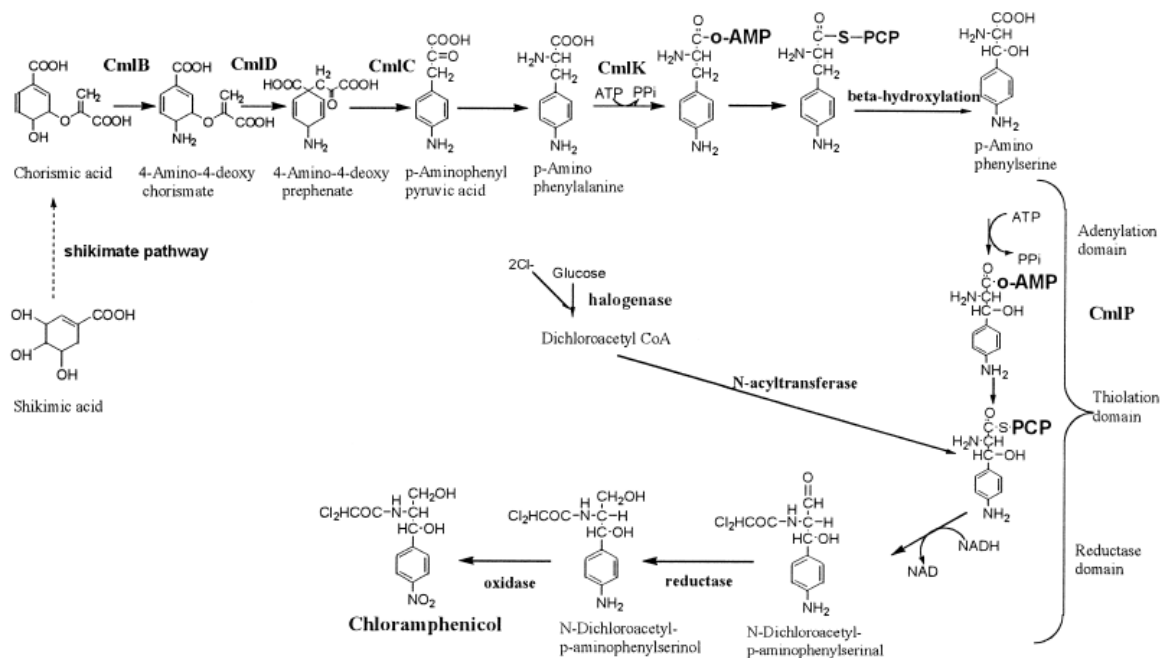


Figura 1. Síntesis del cloranfenicol a partir de la vía del ácido shikímico. (Tomada de: He *et al.*, 2001).

En un estudio realizado por He y colaboradores en 2001, se analizaron regiones en el cromosoma de *S. venezuelae* adyacentes a *pabAB* (CmlB). Mediante un análisis bioinformático por BLAST se buscaron similitudes entre ORFs adyacentes a *pabAB* y secuencias de aminoácidos contenidas en la base de datos GenBank. De esta forma, se determinó que los productos de tres genes que se encuentran río abajo de *pabAB*, *cmIE*, *cmID* y *cmIC*, se asemejan a proteínas que participan en la vía de síntesis del ácido shikímico, y que la secuencia de *cmIF*, que también se encuentra río abajo, muestra similitud con proteínas de membrana involucradas en el transporte del cloranfenicol en otros microorganismos como *Rhodococcus fascians* y *S.*

lividans (He *et al.*, 2001). Río arriba de *pabAB*, fueron identificados otros genes relacionados a la vía de síntesis del cloranfenicol. Dentro de ellos, *cmIP* mostró similitud con una péptido sintetasa no ribosomal monomodular, *cmII* mostró similitud con un casete de unión a ATP de un transportador tipo ABC, *cmIJ* mostró similitud con una ceto-reductasa de cadena corta, *cmIK* con una coenzima A ligasa y *cmIH*, que a pesar de que no se logró relacionar con el producto para el cual codifica mediante BLAST, por ensayos de mutagénesis se demostró que cumple un papel importante en la biosíntesis de este antibiótico (Figura 2) (He *et al.*, 2001).

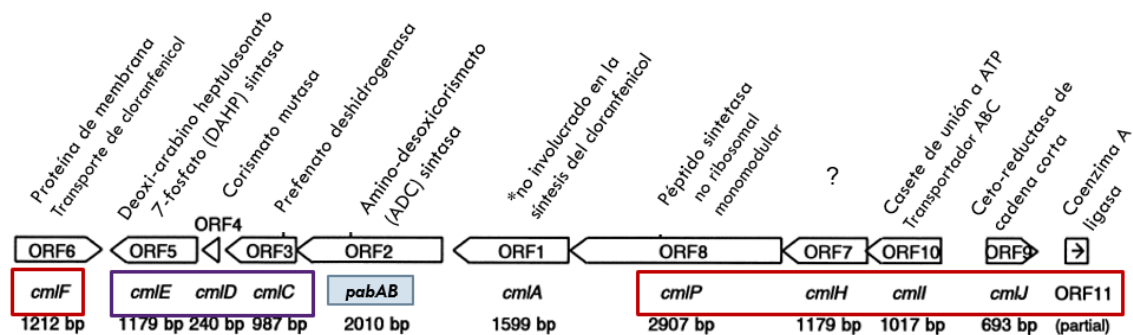


Figura 2. Marcos abiertos de lectura (ORFs) adyacentes a *pabAB*. En el recuadro morado se señalan los genes cuyo producto está relacionado con proteínas que participan en la vía del ácido shikímico, mientras que, en el rojo, aquéllos cuyo producto está relacionado con la síntesis o transporte del cloranfenicol. (Tomado y modificado de: He *et al.*, 2001).

Dicho grupo de investigación obtuvo mutantes de algunos de los genes contenidos dentro de ese clúster, y observaron que en el caso de *cmIP*, al ser interrumpido con un casete de resistencia a ampicilina la cepa ya no era capaz de producir p-aminofenilalanina (PAPA) ni cloranfenicol. De la misma manera, demostraron que al interrumpir el gen *cmIH* la cepa no era capaz de producir cloranfenicol en condiciones en donde la cepa tipo silvestre lo sintetizaba (He *et al.*, 2001).

3. Justificación

Para la producción industrial de metabolitos secundarios es conveniente el uso de hospederos heterólogos. Los hospederos más importantes hasta ahora disponibles para este fin son propiedad de las instituciones donde se crearon y la obtención de estos está limitada y sujeta a una serie de convenios que limitan su empleo. El desarrollo de nuevos hospederos para la expresión de metabolitos secundarios con actividad farmacológica potencial, que sean propiedad de la UNAM y que eventualmente puedan formar parte de paquetes tecnológicos para ser ofrecidos a la industria, representa un reto interesante por resolver. En este trabajo se utilizará a *S. venezuelae* como modelo por las ventajas de crecimiento que presenta frente a otras Actinobacterias.

4. Hipótesis

El bloqueo de la síntesis del cloranfenicol en *Streptomyces venezuelae* facilitará la identificación de metabolitos secundarios expresados heterológicamente en esta cepa.

5. Objetivos

General:

Desarrollar una cepa hospedera que eventualmente pueda ser utilizada como vehículo de expresión de clústeres novedosos para la producción de metabolitos secundarios de interés farmacéutico o industrial utilizando a *Streptomyces venezuelae*.

Particulares:

Corroborar la producción de cloranfenicol en la cepa ATCC 10712 (WT) de *S. venezuelae*

Caracterizar la tasa de crecimiento y producción de antibiótico en *S. venezuelae* ATCC 10712

Bloquear la vía de síntesis de cloranfenicol en la cepa mencionada

Caracterizar la tasa de crecimiento y producción de antibiótico de la mutante obtenida

Realizar expresión heteróloga en la mutante obtenida

6. Metodología a seguir

6.1 Material Biológico

La construcción del hospedero se realizará a partir de la cepa ATCC 10712 (WT) de *S. venezuelae*. Un diagrama general para el diseño, construcción y evaluación del mismo se encuentra en la sección de apéndice (Diagrama A1).

Para las pruebas de bioautografía y antibiosis se utilizará a *Micrococcus luteus*, la cepa K12 de *E. coli* (WT) y a *Bacillus subtilis*.

La cepa de *E. coli* DH5 α será empleada para mantener el cósmido pAH91 que contiene el clúster para la síntesis de cloranfenicol de *S. venezuelae*, el cual nos fue donado por el doctor Juan Pablo Gómez Escribano del John Innes Centre, Norwich, Inglaterra.

Se utilizará la cepa JM109 de *E. coli* para la proliferación del plásmido pIJ778, del cual se va a obtener el casete de resistencia a espectinomicina que será utilizado para interrumpir los genes de interés en *S. venezuelae* y como marcador de selección en la cepa modificada. Para otros fines de la obtención de la mutante se utilizará la cepa de *E. coli* BW25113/pIJ790 y la cepa no metilante de *E. coli* ET12567/pUZ8002.

Una lista más detallada de las cepas utilizadas en este trabajo y sus especificaciones se muestra a continuación (Tabla 1).

Tabla 1. Cepas utilizadas durante la realización de este trabajo.

Cepas	Genotipo	Resistencia	Referencia
<i>B. subtilis</i>	Silvestre		IIB, UNAM
<i>M. luteus</i>	Silvestre		IIB, UNAM
<i>E. coli</i> K12	Silvestre		IIB, UNAM
<i>E. coli</i> DH5 α / pAH91	Contiene el cósmido con los genes para la síntesis del cloranfenicol	Apramicina y ampicilina	Gómez-Escribano, John Innes Centre
<i>E. coli</i> JM109/ pIJ778	Contiene el plásmido de donde se obtuvo el casete de resistencia a espectinomicina	Espectinomicina y estreptomomicina	Este trabajo
<i>E. coli</i> BW25113/ pIJ790	BW25113 no consume arabinosa, pIJ790 contiene el sistema de recombinación λ RED el cual se induce con arabinosa t ^s , sensible a temperaturas mayores a 30°C	Cloranfenicol	Gust <i>et al.</i> , 2002
<i>E. coli</i> BW25113/ pIJ790/ pAH91	BW25113 no consume arabinosa, pIJ790 contiene el sistema de recombinación λ RED el cual se induce con arabinosa, pAH91 contiene los genes necesarios para llevar a cabo la síntesis del cloranfenicol t ^s , sensible a temperaturas mayores a 30°C	Cloranfenicol, apramicina y ampicilina	Este trabajo
<i>E. coli</i> BW25113/ pIJ790/ pAH91/ <i>cmlH:: aadA</i>	BW25113 no consume arabinosa, pIJ790 contiene el sistema de recombinación λ RED el cual se induce con arabinosa, contiene el cósmido pAH91 con el gen <i>cmlH</i> interrumpido t ^s , sensible a temperaturas mayores a 30°C Sensible a ácido nalidíxico (20 μ g/ ml)	Cloranfenicol, apramicina, ampicilina y estreptomomicina	Este trabajo
<i>E. coli</i> ET12567/ pUZ8002	Cepa no metilante que permite la conjugación con <i>S. venezuelae</i>	Kanamicina y cloranfenicol	Gust <i>et al.</i> , 2002
<i>E. coli</i> ET12567/ pUZ8002 pAH91/ <i>cmlH:: aadA</i>	Cepa no metilante que permite la conjugación con <i>S. venezuelae</i> y que contiene el cósmido pAH91 con el gen <i>cmlH</i> interrumpido	Kanamicina, cloranfenicol, ampicilina, apramicina estreptomomicina	Este trabajo
<i>E. coli</i> ET12567/ pUZ8002/ pIJ6902	Cepa no metilante que permite la conjugación con <i>S. venezuelae</i> , pIJ6902, vector de clonación	Apramicina, kanamicina y cloranfenicol	Jiménez R, IIB UNAM
<i>E. coli</i> ET12567/ pUZ8002/ pIJ6902/ <i>alkA</i>	Cepa no metilante que permite la conjugación con <i>S. venezuelae</i> , pIJ6902, vector de clonación con capacidad de expresar un alquilresorcinol	Apramicina, kanamicina y cloranfenicol	Jiménez R, IIB UNAM

<i>S. cerevisiae</i>	Silvestre		IIB, UNAM
<i>S. venezuelae</i> ATCC 10712	Silvestre		IIB, UNAM
<i>S. venezuelae</i> ATCC 10712/ pIJ6902	Cepa silvestre transformada con un vector de clonación	Apramicina	Este trabajo
<i>S. venezuelae</i> ATCC 10712/ pIJ6902/ <i>alkA</i>	Cepa silvestre transformada con el vector de clonación con el gen necesario para la síntesis de un alquilresorcinol	Apramicina	Este trabajo
<i>S. venezuelae</i> Δ <i>cmlH</i>	Cepa no productora de cloranfenicol	Espectinomicina	Este trabajo
<i>S. venezuelae</i> Δ <i>cmlH</i> / pIJ6902	Cepa no productora de cloranfenicol transformada con un vector de clonación	Apramicina y espectinomicina	Este trabajo
<i>S. venezuelae</i> Δ <i>cmlH</i> / pIJ6902/ <i>alkA</i>	Cepa no productora de cloranfenicol transformada con el vector de clonación con el gen necesario para la síntesis de un alquilresorcinol	Apramicina y espectinomicina	Este trabajo

6.2 Obtención y titulación de preparaciones densas de esporas de la cepa silvestre (WT) de *S. venezuelae*

Para obtener y aislar esporas de *S. venezuelae* ATCC 10712 (WT) se inocularon 200 μ l de un stock de esporas en 20 ml de H₂O Milli-Q estéril, para a partir de esa dilución inocular 20 cajas de Petri de forma confluyente en medio MYM (Maltose-Yeast Extract medium) suplementado con elementos traza R2 (1 ml por caja). Las cuales se incubaron durante 3 días a 29°C. En este medio *S. venezuelae* es capaz de diferenciarse en micelio aéreo y posteriormente esporular.

Una vez que la cepa esporuló se agregaron a cada caja 5 ml de solución salina isotónica (SSI) al 0.85 % y con ayuda de un asa bacteriológica se raspó la superficie para separar las esporas del micelio. Se recuperaron los 5 ml de SSI al 0.85% de cada caja en tubos estériles y se homogenizó por vortex para liberar las esporas del micelio. La SSI al 0.85 % con las esporas se pasó a través de una trampa de algodón y se recuperó en otro tubo. Los filtros se enjuagaron con 5 ml de SSI al 0.85% para poder recuperar la mayor cantidad de esporas. El filtrado se centrifugó a 1 295 x g

durante 10 min a 4°C (Heraeus Megafuge 16R Centrifuge, Thermo Scientific). Se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 35 ml de SSI al 0.85% para centrifugar una vez más a 1 295 x g durante 10 min a 4°C. Se descartó nuevamente el sobrenadante, se realizó un lavado más para eliminar los restos del medio, centrifugando y descartando el sobrenadante de la misma manera, se resuspendió el paquete de esporas en 3 ml de glicerol al 20% (diluido en H₂O destilada) y finalmente, se realizaron alícuotas de las mismas para almacenarlas a -80°C para su posterior uso.

Para llevar a cabo su titulación, del stock resultante de la cosecha de esporas se tomaron 10 µl (se realizó por triplicado) y se transfirieron a un tubo de 1.5 ml con 990 µl de H₂O Milli-Q para obtener una dilución de 10⁻². Se mezcló esta dilución en vortex y se transfirieron 100 µl de esta dilución a otro tubo con 900 µl de H₂O Milli-Q para obtener una dilución de 10⁻³. Y este procedimiento se repitió hasta obtener una dilución de 10⁻¹⁰. Posteriormente cada dilución se inoculó en medio MYM sólido y se incubaron a 29°C. Pasadas 48 h se llevó a cabo el conteo de las UFC obtenidas por ml y µl.

6.3 Extracción de compuestos producidos por *S. venezuelae* en medio GI

Se inocularon 4 matraces bafleados con 500 esporas por cada matraz en 50 ml de medio líquido GI durante 6 días a 29°C en agitación constante. En dicho medio de cultivo se ha reportado que la cepa de cepa de *S. venezuelae* WT produce cloranfenicol en cantidades detectables (Chatterjee y Vining, 1982). Posterior a eso se realizó la extracción de compuestos tanto de la biomasa como del sobrenadante. Para esto, pasados los 6 días se colocó todo el cultivo en tubos de 50 ml, los cuales fueron centrifugados a 2 800 x g durante 5 min (Heraeus Megafuge 16R Centrifuge, Thermo Scientific) separando así el sobrenadante de la biomasa. La biomasa se colocó en un frasco de boca ancha para ser macerada con la ayuda del pistilo de un mortero, y el sobrenadante se filtró para eliminar los restos de biomasa y se colocó en un matraz. Una vez que se separó la biomasa y el sobrenadante se realizó la extracción de compuestos con acetato de etilo (CH₃-COO-CH₂-CH₃) utilizando el rotavapor Buchi R-215.

6.4 Búsqueda de cloranfenicol en los compuestos extraídos de *S. venezuelae* por cromatografía de capa fina

Para detectar la presencia del cloranfenicol en los extractos de biomasa y sobrenadante se realizó una cromatografía en capa fina (TLC). Esta técnica permite separar moléculas contenidas en una mezcla con base en su polaridad utilizando una fase estacionaria y una fase móvil. De acuerdo a las características no polares de la molécula de cloranfenicol (Lorian, 2005), como fase estacionaria se utilizó una placa de sílice gel 60F₂₅₄ con base de aluminio (Merck-Millipore), y como fase móvil, tras evaluar diferentes condiciones de separación, se eligió una solución de 9.6 ml de diclorometano (CH₂Cl₂) y 0.4 ml de metanol (CH₃OH), (96:4). A la placa de sílice se le aplicaron 5 µl (8.4 mg/ml) de extracto de biomasa, 5 µl (5.6 mg/ml) de extracto de sobrenadante y se utilizaron 5 µl (1 mg/ml) de cloranfenicol-C0378 (Sigma) como control. Posteriormente, se expuso la placa a 254 nm con una lámpara de UV (UVGL-55 Hand-held UV lamp) para detectar la presencia de los compuestos extraídos.

6.5 Evaluación de la actividad bacteriostática de los extractos de *S. venezuelae* contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas

Para probar la actividad de los extractos contra bacterias Gram-positivas por bioautografía, se inoculó a *M. luteus* en medio TSB (Tryptone Soya Broth) sólido durante 48 h. Para tener un estándar de la concentración de microorganismos contenidos en cada una de las pruebas se preparó la solución 0.5 McFarland que equivale a un patrón de turbidez de 1.5×10^8 células de *E. coli* por ml³ si se lee a 0.08-0.10 de absorbancia a 625 nm. Pasadas las 48 h se realizó una cromatografía en capa fina de los extractos de biomasa y sobrenadante de *S. venezuelae* utilizando cloranfenicol (Sigma) como control positivo. Esta placa de TLC se colocó en una caja Petri de vidrio. Se preparó una suspensión de solución salina y *M. luteus* equivalente a la turbidez de McFarland (+/- 0.005). Se agregó 1 ml de esta solución en 80 ml de medio sólido TSB y se vertió sobre la caja de Petri con la placa de TLC. Se incubó a 37°C y se observó la actividad de los extractos y el control a las 48 h.

Para probar la actividad de los extractos contra bacterias Gram-negativas, se inoculó a *E. coli* cepa K12 en medio LB sólido durante 24 h. Pasadas las 24 h se realizó una cromatografía en capa fina de los extractos de biomasa y sobrenadante utilizando cloranfenicol (Sigma) como control, se colocó la placa de TLC en una caja Petri de vidrio y se preparó una suspensión de solución salina y *E. coli* equivalente a la turbidez de McFarland (+/- 0.005). Se agregó 1 ml de esta solución en 80 ml de medio sólido LB y se vertió sobre la caja de Petri con la TLC. Se incubó a 37°C y después de 24 h se realizó una tinción vital con KOH 0.01% + 0.1% de azul de metileno para observar la actividad de los extractos y el control. Esta solución mantiene una coloración azul cuando se inhibe el crecimiento bacteriano, y desaparece en donde sí hay presencia bacteriana ya que puede ser metabolizada por *E. coli*.

6.6 Análisis de la producción de antibiótico por *S. venezuelae* WT en medio GI mediante pruebas de antibiosis

Utilizando un asa bacteriológica a partir del stock de esporas de *S. venezuelae* ATCC 10712 (WT) se estriaron placas con medio GI y se incubaron a 29° C. Una vez que se observó que la cepa presentó un óptimo crecimiento bajo estas condiciones se realizó el mismo procedimiento estriando a *E. coli* K12, *M. luteus*, *Saccharomyces cerevisiae* y *B. subtilis* a partir de gliceroles e incubando nuevamente a 29° C. Dado su óptimo crecimiento bajo las condiciones mencionadas se eligió a *B. subtilis* y a *E. coli* K12 para llevar a cabo las pruebas de antibiosis contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

Las pruebas de antibiosis se realizaron estriando a *S. venezuelae* en medio GI, se incubó a 29° C durante 72 h y pasadas las 72 h en esa misma placa se estrió a *B. subtilis* (Gram-positivo) y a *E. coli* K12 (Gram-negativo). Las placas se continuaron incubando a 29° C y pasadas 48 h se evaluó la inhibición del crecimiento de *B. subtilis* y de *E. coli* K12.

6.7 Cinética de crecimiento de *S. venezuelae* WT en medio GI

Para determinar la tasa de crecimiento de *S. venezuelae* ATCC 10712 (WT) en medio GI, primero se realizó un pre-inóculo de la cepa en 50 ml de medio MYM. Se inocularon 1 µl de esporas (2×10^8 UFC por µl) por matraz, y se incubó en agitación constante a 29 °C durante 48 h. Pasadas las 48 h, se sacaron 3 matraces y de cada matraz bafleado se apartaron 10 ml en un tubo Falcon para determinar la biomasa presente.

El contenido del resto de los matraces se centrifugó a 12 000 x g durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Las pastillas se resuspendieron en 20 ml de SSI al 0.85% cada una y nuevamente se centrifugaron a 12 000 x g durante 10 minutos. Se descartó nuevamente el sobrenadante, se realizó un lavado más con SSI al 0.85 %, centrifugando y descartando el sobrenadante de la misma manera; finalmente, las pastillas se resuspendieron en 5 ml de SSI.

Del pre-inóculo resuspendido en SSI (0.095 mg/ml de biomasa) se tomó 1 ml para inocular en medio GI (1 ml por cada 50 ml de medio) y se incubó a 29° C en agitación constante. Pasadas 24, 48, 72, 96, 120 y 168 h de incubación se sacaron 3 matraces bafleados por cada tiempo, y de cada matraz se apartaron 10 ml en un tubo Falcon para determinar la biomasa presente.

Para llevar a cabo la determinación de la biomasa se utilizó papel filtro Whatman del número 1. Se enumeraron los filtros y se metieron en una estufa para eliminar la humedad presente en ellos. Una vez que no presentaron humedad y sus pesos fueron constantes, los 10 ml de cada muestra se filtraron al vacío utilizando estos filtros, los cuales posteriormente se metieron a la estufa para eliminar la humedad hasta que sus pesos fueron constantes. Finalmente se determinó la relación de los pesos con y sin biomasa, y la relación de mg peso seco/ ml.

6.8 Análisis de la producción de cloranfenicol por *S. venezuelae* WT en medio GI mediante UPLC-MS

De la cinética de crecimiento de *S. venezuelae* ATCC 10712 (WT) en medio GI (punto 6.7) se apartaron 40 ml de las 48 y 120 h (por triplicado). Se separó la

biomasa del sobrenadante de cada muestra por filtración y ya que se obtuvieron los sobrenadantes libres de biomasa se llevó a cabo la extracción de sus compuestos con acetato de etilo utilizando el rotavapor Buchi R-215. Una vez que se obtuvieron los compuestos fueron analizados por UPLC-MS (Ultra performance liquid chromatography- mass spectrometer) por la doctora Silvia Ivonne Mora del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Se buscó detectar la producción de cloranfenicol en la cepa con una masa aproximada de 321.004 g/mol. Se utilizó cloranfenicol-C0378 (Sigma) como estándar.

6.9 Diseño de oligonucleótidos para la interrupción de los genes *cmlH* y *cmlI*, *cmlIH*, *cmlP* y *cmlA*

Para llevar a cabo la interrupción de los genes blanco, y con ello la vía de síntesis del cloranfenicol, se utilizó la técnica de PCR-targeting reportada por Gust *et al.*, en 2002. Un diagrama general de la estrategia experimental con los pasos a seguir se encuentra en la sección de apéndice (Diagrama A2).

Esta técnica fue desarrollada para reemplazar genes mediante recombinación utilizando un casete de resistencia a un determinado antibiótico. Para este fin se diseñaron dos pares de oligonucleótidos diferentes, de 59 y 58 nucleótidos cada par, ya que se buscó realizar dos mutantes. En una de ellas se buscó interrumpir el gen *cmlH* (1.179 kb), el cual se ha demostrado que tras su interrupción se bloquea por completo la síntesis del cloranfenicol. En la segunda mutante se buscó interrumpir el gen *cmlH* con el mismo fin, y los genes *cmlI*, *cmlP* y *cmlA* (5.685 kb) para evitar la síntesis de otros intermediarios.

Los pares de oligonucleótidos fueron diseñados con base en lo sugerido en el manual creado por Gust y colaboradores (Figura 3), presentando homología hacia los genes blanco, así como a un casete de resistencia a espectinomicina.

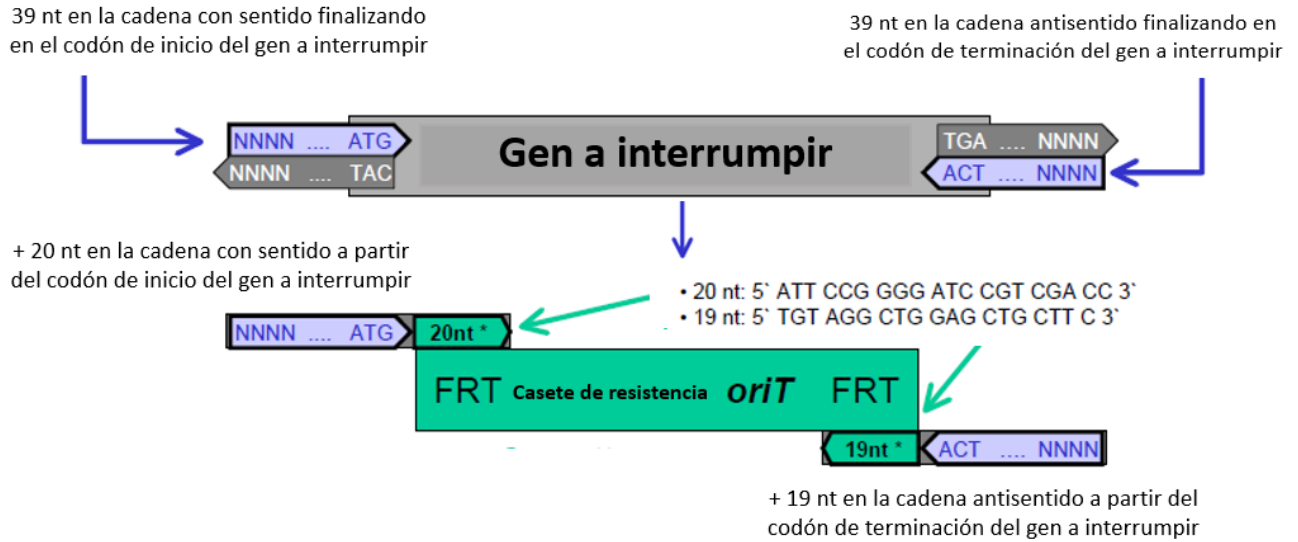


Figura 3. Diseño de oligonucleótidos para llevar a cabo interrupciones génicas en *Streptomyces* mediante PCR-targeting. (Tomado y modificado de: Gust *et al.*, 2002).

Oligonucleótidos *cmlH*

5'CGTCCGCGGTGGCGCCGGAAGAGGTCCGGTCAACAGGTCAATTCCGGGGAT
CCGTCGACC3' y

5'CCAGGTCGAGTTCGGCTGGGGCACGACGGTGACCCGATGTGTAGGCTGGA
GCTGCTTC3'

Oligonucleótidos *cmlI*, *cmlH*, *cmlP*, *cmlA*

5'CGGATCGCCGCGCCCCGGCCGCGGGCGTCCGCTCGCTCAATTCCGGGGA
TCCGTCGACC3' y

5'AGAGCCCGCAAAGGGAAGTGAAGGAAGGGGTGGGCCATGTGTAGGCTGGA
GCTGCTTC3'

6.10 Obtención del cósmido pAH91

La interrupción de los genes de interés se llevó a cabo sobre el cósmido pAH91. El cual contiene genes de resistencia a ampicilina (funcional para *E. coli*), genes de resistencia a apramicina (funcional para *E. coli* y para *Streptomyces*) y el clúster con los genes necesarios para la síntesis del cloranfenicol.

El cósmido se extrajo a partir de *E. coli* DH5 α mediante la técnica de lisis alcalina, que consiste en desnaturalizar el ADN de alto peso molecular presente en una muestra, lo cual a su vez nos permite obtener ADN de bajo peso molecular como cósmidos y plásmidos. Posteriormente, se visualizó en un gel de agarosa al 0.8 %. Estos gels actúan como un tamiz molecular que nos permite separar moléculas cargadas en función de su tamaño bajo la influencia de un campo eléctrico, de modo que para visualizar el cósmido se le aplicaron 90 V durante 1 h.

6.11 Generación de células electrocompetentes de *Escherichia coli* BW25113/pIJ790

Se generaron células electrocompetentes libres de iones de *E. coli* BW25113/pIJ790. Esta cepa de *E. coli* no consume arabinosa y contiene el plásmido pIJ790, el cual contiene genes de resistencia a cloranfenicol, un sistema de recombinación λ RED bajo el control de un promotor que se induce con arabinosa (pBAD) y es sensible a la temperatura, impidiendo su replicación a temperaturas mayores a 30° C (Figura 4).

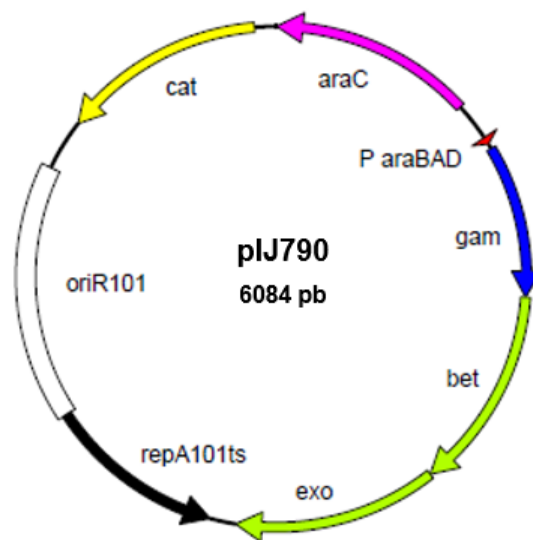


Figura 4. Plásmido pIJ790. P araBAD (promotor inducible con L-arabinosa), *araC*, *gam*, *bet*, *exo*: sistema de recombinación λ RED. *cat*: gen de resistencia a cloranfenicol. repA101ts: replicación sensible a temperatura. oriR101: origen de replicación. (Tomado y modificado de: Gust *et al.*, 2002).

Se inocularon 10 μ l de un stock de dichas células en 200 ml de medio YeNB líquido con 25 μ g/ml de cloranfenicol y se incubó a 30°C en agitación constante durante 24 h. Pasadas las 24 h se tomaron 10 ml de este preinóculo y se inocularon en 200 ml de medio YeNB líquido con 25 μ g/ml de cloranfenicol. Posteriormente, se incubó a 30°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 a 600 nm de longitud. Una vez alcanzada la densidad óptica se centrifugaron los 200 ml de este medio a 12 000 x g durante 15 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se realizó un lavado de la pastilla con agua Milli-Q fría. Se volvió a centrifugar de la misma manera y se descartó el sobrenadante. Se realizó un lavado más, se descartó el sobrenadante y finalmente se resuspendió la pastilla en 1 ml de glicerol al 10%.

6. 12 Transformación de *E. coli* BW25113/ pIJ790 con el cósmido pAH91

Ya que se obtuvieron las células electrocompetentes de *E. coli* BW25113/pIJ790 se llevó a cabo su transformación por choque térmico con el cósmido pAH91, para sobre él llevar a cabo el reemplazo de los genes de interés.

Para esto se agregó en un tubo Eppendorf 50 μ l de las células electrocompetentes y 3 μ l del cósmido puro (1 234.4 ng/ μ l) El contenido se transfirió a una celda para electroporar fría y se le aplicó un voltaje de 1250 V durante 5 milisegundos. Inmediatamente se agregó a la celda 900 μ l de medio de cultivo SOC frío. Se homogenizó el contenido y se transfirió nuevamente al tubo Eppendorf para incubarse a 30° C en agitación constante durante 1 h. Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron diluciones con medio SOC y se plaquearon en medio LB con ampicilina (100 μ g/ml) y apramicina (50 μ g/ml) como antibióticos de selección. Finalmente, se incubó a 30° C durante 24 h.

6.13 Generación de células electrocompetentes de *E. coli* BW25113/ pIJ790/pAH91

Las colonias de *E. coli* BW25113/pIJ790 que fueron capaces de crecer en presencia de ampicilina y apramicina se picaron en medio YeNB con 25 µg/ ml de cloranfenicol, 100 µg/ ml de ampicilina y 50 µg/ ml de apramicina, y se incubaron a 30°C durante 24 h para realizar células electrocompetentes siguiendo la misma metodología mencionada en el apartado 6.11. Agregando arabinosa 10 mM mientras el cultivo alcanza una densidad óptica de 0.5 a 600 nm de longitud para inducir el sistema de recombinación λ RED.

6.14 Generación de células electrocompetentes de *E. coli* JM109 y su transformación con el plásmido pIJ778

Para llevar a cabo el reemplazo de los genes de interés se utilizó un casete de resistencia a espectinomicina (*aadA*), el cual está contenido en el plásmido pIJ778, flanqueado por los sitios de restricción *Hind*III y *Eco*RI. A su vez, *aadA* confiere resistencia a estreptomomicina (Figura 5).

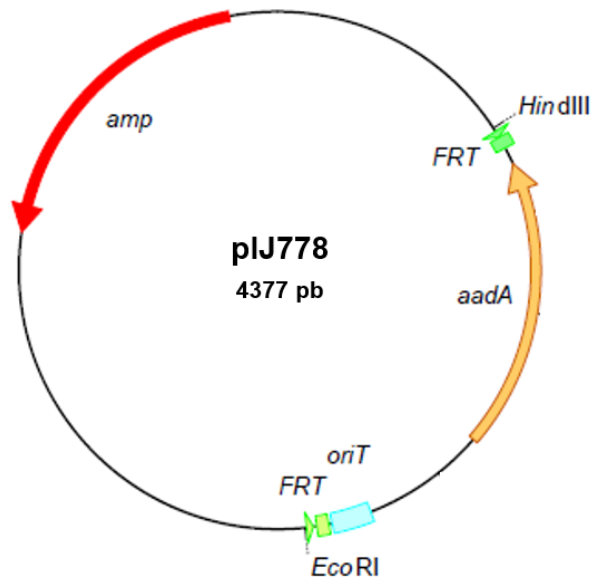


Figura 5. Plásmido pIJ778. *aadA*: gen de resistencia a estreptomicina y espectinomicina. *oriT*: origen de transferencia. Sitios *FRT*: permiten la eliminación de *aadA* tras su inserción. Sitios de restricción: *EcoRI* y *HindIII*. (Tomado y modificado de: Gust *et al.*, 2002).

Para llevar a cabo la propagación de este plásmido y obtener el casete (*aadA*) se generaron células electrocompetentes, libres de iones, de *E. coli* JM109 inoculando 10 µl de un stock de estas células en 200 ml de medio YeNB líquido que posteriormente se incubó a 37° C en agitación durante 24 h. Pasadas las 24 h se tomaron 10 ml de este preinóculo y se inocularon en 200 ml de medio YeNB líquido que posteriormente se incubó a 37° C en agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 a 600 nm de longitud. Una vez que se alcanzó la densidad óptica se centrifugaron los 200 ml de este medio a 12 000 x g durante 15 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se realizó un lavado de la pastilla con agua Milli-Q fría. Se volvió a centrifugar de la misma manera y se descartó nuevamente el sobrenadante. Se realizó un lavado más, y una vez que se descartó el sobrenadante se resuspendió la pastilla en 1 ml de glicerol al 10%.

Ya que se obtuvieron las células electrocompetentes de *E. coli* JM109 se llevó a cabo su transformación por choque térmico con el plásmido pIJ778. Para esto se agregó en un tubo Eppendorf 50 µl de las células electrocompetentes y 2 µl del plásmido puro. El contenido se transfirió en una celda para electroporar fría y se aplicó un voltaje de 1250 V durante 5 milisegundos. Inmediatamente se agregó a la celda 900 µl de medio de cultivo SOC frío. Se homogenizó el contenido y se transfirió nuevamente al tubo Eppendorf para incubarse a 37° C en agitación constante durante 1 h. Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron diluciones con medio SOC, se plaquearon en medio LB con estreptomicina (30 µg/ ml) como antibiótico de selección y se incubaron a 37° C durante 24 h.

6.15 Obtención del casete de resistencia a espectinomicina

Una vez que se obtuvieron colonias aisladas que fueron capaces de crecer en presencia de estreptomicina se picaron en 5 ml de medio LB con estreptomicina (30

µg/ ml) y se incubaron a 37° C durante 16 h. Pasadas las 16 h a partir de este pre inóculo se llevó a cabo la extracción del plásmido mediante lisis alcalina y una digestión del mismo con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* para obtener el casete de resistencia a espectinomicina. Posteriormente, se analizó el resultado de la reacción en un gel de agarosa al 0.8%, aplicando 90 V durante 1 h. Una vez que se obtuvo una banda correspondiente al peso molecular esperado para el casete de resistencia, la banda se cortó y se purificó utilizando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega.

6.16 Extensión del casete de resistencia a espectinomicina

Una vez que se obtuvo el casete de resistencia a espectinomicina se llevó a cabo su extensión por PCR aplicando un gradiente de temperatura y utilizando la enzima Phusion High Fidelity DNA Polymerase de Thermo Scientific. Esto significa que al casete se le agregó a sus extremos nucleótidos que flanquean a los genes de interés que se buscó interrumpir. Para esto se diseñaron un par de oligonucleótidos (oligos diseñados en el punto 6.9), los cuales es importante que no presenten homología por ninguna otra región del genoma, ni formen dímeros entre sí.

La reacción de PCR se visualizó en un gel de agarosa al 0.8 % al cual se le aplicaron 90 V durante 1 h. Cuando se obtuvieron los amplicones correspondientes al peso molecular esperado para los casetes extendidos para interrumpir los genes *cmIH* y *cmII*, *cmIH cmIP* y *cmIA* se purificaron de banda utilizando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega.

6.17 Interrupción de los genes *cmIH* y *cmII*, *cmIH cmIP* y *cmIA* en *E. coli* BW25113/ pIJ790/ pAH91

Los casetes extendidos puros se transformaron por choque térmico en las células electrocompetentes de *E. coli* BW25113/ pIJ790/ pAH91 siguiendo la misma metodología mencionada en el punto 6. 14. Utilizando ampicilina (100 µg/ ml), apramicina (50 µg/ ml) y estreptomycin (50 µg/ ml) como antibióticos de selección.

A las colonias obtenidas capaces de crecer en ampicilina, apramicina y estreptomycinina se les realizó un segundo pase, y aquellas colonias que volvieron a crecer en presencia de los antibióticos de selección se evaluaron por PCR de colonia utilizando la enzima Phire plant direct PCR kit de Thermo Scientific y un par de oligonucleótidos de confirmación, diseñados aproximadamente 100 pares de bases río arriba y río abajo del sitio de recombinación (Figura 6).



Figura 6. Diseño de oligonucleótidos para confirmar la interrupción del gen de interés con el casete de resistencia *aadA*.

Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa 0.8% al que se le aplicaron 90 V durante 60 min. Se descartaron los falsos positivos y ya que se obtuvo un amplicón con el peso molecular esperado para la mutante se llevó a cabo la extracción del cósmido a partir de esa colonia.

En este punto se descartó la mutante *cmII*, *cmIH*, *cmIP* y *cmIA* al no obtenerse el amplicón esperado en las pruebas de PCR, y se continuó trabajando únicamente con la colonia transformada con el casete extendido para interrumpir el gen *cmIH*

que mostró el peso molecular esperado. Dicha colonia se picó en 5 ml de medio YeNB con ampicilina (100 µg/ ml), apramicina (50 µg/ ml), estreptomycin (50 µg/ ml) y se incubó a 37° C durante 16 h. Pasadas las 16 h a partir de este pre inóculo se llevó a cabo su extracción mediante lisis alcalina.

Ya que se extrajo el cósmido puro, se repitió el PCR utilizando la enzima Phire plant direct PCR kit de Thermo Scientific y los oligonucleótidos de confirmación. Una vez obtenido el amplicón con el peso molecular esperado para la mutante, se purificó de banda utilizando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega para corroborar mediante secuenciación el reemplazo del gen de interés con el casete de resistencia a espectinomicina. La secuenciación del amplicón se realizó en la unidad de secuenciación del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM por la doctora Patricia de la Torre.

6.18 Generación de células electrocompetentes de *E. coli* ET12567/ (pUZ8002)

Se generaron células electrocompetentes, libres de iones de *E. coli* ET12567/ (pUZ8002). Esta cepa contiene genes de resistencia a kanamicina y cloranfenicol, y no metila su ADN, lo cual permite que se pueda llevar a cabo la conjugación con cepas de *Streptomyces*, que cuentan con sistemas de restricción para ADN metilado. Se realizó la misma metodología mencionada en el punto 6. 14, utilizando kanamicina (50 µg/ ml) y cloranfenicol (25 µg/ ml) como antibióticos de selección.

6.19 Transformación de *E. coli* ET12567/ (pUZ8002) con el cósmido pAH91/ *cmlH:: aadA*

Ya que se corroboró mediante secuenciación la interrupción del gen *cmlH* en el cósmido pAH91/ *cmlH:: aadA* se transformó en las células electrocompetentes de *E. coli* ET12567 (pUZ8002), siguiendo la misma metodología mencionada en el punto 6. 14. Utilizando ampicilina (100 µg/ ml), apramicina (50 µg/ ml), kanamicina (50 µg/ ml), cloranfenicol (25 µg/ ml) y espectinomicina (50 µg/ ml) como antibióticos de selección.

6.20 Conjugación de *E. coli* ET12567/ (pUZ8002)/ pAH91/ *cmlH:: aadA* con *S. venezuelae* WT

Ya que se obtuvieron colonias capaces de crecer en ampicilina, apramicina, kanamicina, cloranfenicol y espectinomicina se picaron en 5 ml de medio LB utilizando los mismos antibióticos de selección y se incubó a 37° C en agitación constante durante 24 h para realizar su conjugación con esporas de *S. venezuelae* WT.

Pasadas las 24 h, el pre inóculo se inoculó en un matraz bafleado de 500 ml con 50 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ ml), apramicina (50 µg/ ml), kanamicina (50 µg/ ml), cloranfenicol (25 µg/ ml) y espectinomicina (50 µg/ ml) como antibióticos de selección, y se incubó a 37° C en agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 a 600 nm de longitud. Una vez que se alcanzó la densidad óptica, se centrifugaron los 50 ml de medio a 6 800 x g durante 10 min a 4° C, se descartó el sobrenadante y se realizó un lavado de la pastilla con medio LB frío. Se volvió a centrifugar de la misma manera y se descartó nuevamente el sobrenadante. Se realizó un lavado más con medio LB frío, se centrifugó y se descartó el sobrenadante. El pellet obtenido se resuspendió en 500 µl de medio LB frío y se transfirió a un tubo Eppendorf.

En otro tubo Eppendorf se agregó 1 µl de esporas de *S. venezuelae* WT y 500 µl de medio 2XYT. Posteriormente, se mezcló el contenido de ambos tubos y se homogenizó por vortex. Se centrifugó a 6 800 x g durante 30 segundos y se descartó el sobrenadante con la punta de una pipeta.

Al pellet, que contenía aun aproximadamente 100 µl de medio, se le agregaron 900 µl de H₂O Milli-Q estéril para obtener una dilución 1x10⁻¹, se homogenizó por vortex y se transfirieron 100 µl de esta dilución en un tubo Eppendorf con 900 µl de H₂O Milli-Q estéril para obtener una dilución 1x10⁻². Se homogenizó por vortex y se repitió el mismo procedimiento hasta obtener una dilución 1x10⁻⁵. Finalmente, las diluciones se plaquearon en medio GS+ 60 mM de CaCl₂ y se incubaron a 29° C.

Después de 12 h de haber plaqueado en medio GS+ 60 mM de CaCl₂ se agregó a cada placa 1 ml de H₂O Milli-Q estéril con ácido nalidíxico (20 µg/ ml) para evitar la proliferación de *E. coli* ET12567/ (pUZ8002)/ pAH91/ *cmIH:: aadA*, y

espectinomicina (500 µg/ ml) para seleccionar las colonias de *S. venezuelae* resistentes a espectinomicina. Una vez agregados los antibióticos de selección se continuó incubando a 29° C.

6.21 Confirmación de la interrupción del gen *cmlH* en *S. venezuelae* por PCR de colonia

Ya que se obtuvieron colonias capaces de crecer en presencia de ácido nalidíxico y espectinomicina se plaquearon en medio MYM utilizando los mismos antibióticos de selección y se incubaron a 29°C. A las colonias que crecieron se les realizó un segundo pase inoculando en medio MYM con los mismos antibióticos de selección y en medio MYM con ácido nalidíxico (20 µg/ ml), espectinomicina (500 µg/ ml), ampicilina (100 µg/ ml) y apramicina (50 µg/ ml). Posteriormente se incubaron a 29° C. A las colonias que volvieron a crecer en medio MYM con ácido nalidíxico y espectinomicina se les realizó un tercer pase inoculando en medio MYM con los mismos antibióticos de selección y en medio MYM con ácido nalidíxico (20 µg/ ml), espectinomicina (500 µg/ ml), ampicilina (100 µg/ ml) y apramicina (50 µg/ ml). Posteriormente, se incubaron a 29° C, y a las colonias que volvieron a crecer en medio MYM con ácido nalidíxico y espectinomicina se les realizó un cuarto pase inoculando en medio MYM con los mismos antibióticos de selección y en medio MYM con ácido nalidíxico (20 µg/ ml), espectinomicina (500 µg/ ml), ampicilina (100 µg/ ml) y apramicina (50 µg/ ml). Posteriormente, se incubaron a 29° C.

Finalmente, las colonias que fueron capaces de crecer en medio con espectinomicina y ácido nalidíxico, pero no en medio con espectinomicina, ácido nalidíxico, ampicilina y apramicina se evaluaron por PCR de colonia utilizando la enzima Phire plant direct PCR kit de Thermo Scientific y el par de oligonucleótidos de confirmación utilizados en el punto 6.17.

Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa 0.8% al que se le aplicaron 90 V durante 60 min. Se descartaron los falsos positivos y las colonias en las que se obtuvo el amplicón con el peso molecular esperado para la mutante se replaquearon en medio MYM con ácido nalidíxico (20 µg/ ml) y espectinomicina (500

µg/ ml), y en medio MYM con ácido nalidíxico (20 µg/ ml), espectinomicina (500 µg/ ml), ampicilina (100 µg/ ml) y apramicina (50 µg/ ml). Posteriormente se incubaron a 29° C.

6. 22 Extracción de ADN genómico de *S. venezuelae*

Aquellas colonias que nuevamente fueron capaces de crecer en medio con espectinomicina y ácido nalidíxico, pero no en medio con espectinomicina, ácido nalidíxico, ampicilina y apramicina se inocularon en 50 ml de medio líquido MYM con ácido nalidíxico (20 µg/ ml) y espectinomicina (500 µg/ ml) en matraces bafleados, y se incubaron a 29° C en agitación constante durante 24 h para realizar la extracción de su ADN genómico.

Pasadas las 24 h se centrifugó el contenido de los matraces a 11 000 x g durante 15 min, se descartó el sobrenadante y se realizaron dos lavados de las pastillas obtenidas con SSI 0.85%. Centrifugando y descartando el sobrenadante de la misma manera. Las pastillas obtenidas se inocularon nuevamente en 50 ml de medio líquido MYM con ácido nalidíxico (20 µg/ ml) y espectinomicina (500 µg/ ml) en matraces bafleados. Adicionando glicina 0.5% para desestabilizar las estructuras alfa hélice de la pared celular de *S. venezuelae*. Posteriormente se incubaron a 29°C en agitación constante durante 24 h.

Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó cada matraz durante 15 min a 11 000 x g, se descartó el sobrenadante, y se realizaron dos lavados de las pastillas obtenidas con 20 ml de sacarosa al 10.3% cada uno, centrifugando y descartando el sobrenadante de la misma manera. Las pastillas obtenidas se resuspendieron en buffer P (5 ml por cada 50 ml de medio inicial), 5 mg de lisozima y se incubó a 37° C hasta obtener protoplastos.

Una vez que se obtuvieron protoplastos de *S. venezuelae* se centrifugó a 4 500 x g durante 20 min a 4° C, se descartaron los sobrenadantes y se realizó un lavado de las pastillas obtenidas con 20 ml de sacarosa al 10.3%, centrifugando y descartando el sobrenadante de la misma manera. A las pastillas se les agregó 5 ml de sacarosa

10.3%, 200 µl de EDTA 500 mM pH 8 y 4 ml de solución SDS 10 %, se mezcló por inversión y se les adicionó 15 ml de NaCl 6 M. Se mezcló nuevamente por inversión y se incubó durante 30 min a 4° C. Transcurrido el tiempo de incubación se centrifugó a 12 000 x g durante 30 min a 4° C. Los sobrenadantes se transfirieron a un tubo limpio, se les agregó un volumen de isopropanol y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min.

Transcurridos los 15 min se centrifugó a 12 000 x g durante 15 min y se descartaron los sobrenadantes. Se agregó 1 volumen de etanol al 70% y se les aplicó vortex para despegar las pastillas. Se centrifugó a 12 000 x g durante 10 minutos, se descartaron los sobrenadantes y una vez que el etanol se evaporó por completo de las muestras, las pastillas se resuspendieron en 200 µl de H₂O Milli-Q estéril. Finalmente, a cada muestra se le agregó 1.2 ml de Tris HCl 10 mM pH 8 y 1 µl de RNAsa, y se incubaron a 37° C durante 1 h.

Transcurrido el tiempo de incubación las muestras se visualizaron en un gel de agarosa 0.8% al cual se le aplicaron 90 V durante 60 min.

Se llevó a cabo el mismo procedimiento para extraer el ADN genómico de *S. venezuelae* ATCC 10712 (WT) que fue utilizado como control, en ausencia de ácido nalidíxico y espectinomicina.

6.23 Confirmación de la interrupción del gen *cmIH* en *S. venezuelae* por PCR y secuenciación

Tras obtener el ADN genómico de las muestras se realizó nuevamente el PCR utilizando la enzima Phire plant direct PCR kit de Thermo Scientific y los oligonucleótidos de confirmación utilizados en el punto 6.17.

Una vez obtenido el amplicón con el peso molecular esperado para la mutante se purificó de banda utilizando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega para corroborar mediante secuenciación el reemplazo del gen de interés con el casete de resistencia a espectinomicina. La secuenciación del amplicón

nuevamente se realizó en la unidad de secuenciación del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM por la doctora Patricia de la Torre.

6.24 Obtención y titulación de preparaciones densas de esporas de *S. venezuelae* $\Delta cmlH$

Una vez que los resultados de la secuenciación confirmaron el reemplazo del gen *cmlH* con el casete de resistencia a espectinomicina se generaron esporas de la cepa *S. venezuelae* $\Delta cmlH$ siguiendo la misma metodología mencionada en el punto 6. 2. Adicionando espectinomicina (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) como antibiótico de selección.

6.25 Cinética de crecimiento de *S. venezuelae* $\Delta cmlH$ en medio GI

Para determinar la tasa de crecimiento de *S. venezuelae* $\Delta cmlH$ en medio GI se llevó a cabo la misma metodología mencionada en el punto 6.7.

6.26 Análisis de la producción de cloranfenicol por *S. venezuelae* $\Delta cmlH$ en medio GI mediante UPLC-MS

Para analizar la capacidad de producción de cloranfenicol en *S. venezuelae* $\Delta cmlH$ se llevó a cabo la misma metodología mencionada en el punto 6.8.

6.27 Análisis de la producción de antibiótico por *S. venezuelae* $\Delta cmlH$ en medio GI mediante pruebas de antibiosis

Con la finalidad de observar el impacto en cuanto a la producción de antibiótico tras la interrupción del gen *cmlH* en *S. venezuelae* en medio GI se llevó a cabo la misma metodología mencionada en el punto 6.6.

6.28 Transformación de *E. coli* ET12567/ (pUZ8002) con el plásmido pIJ6902 y pIJ6902/*alkA*

Para probar la cepa *S. venezuelae* $\Delta cmlH$ y a *S. venezuelae* WT como hospederos para expresión heteróloga, se llevó a cabo la transformación de las células electrocompetentes de *E. coli* ET12567/ (pUZ8002) con el vector de clonación

pIJ6902 y con la construcción pIJ6902/*alkA* realizada por el M. en C. Jiménez R. del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, siguiendo la misma metodología mencionada en el punto 6. 14. Utilizando apramicina (50 µg/ ml), kanamicina (50 µg/ ml) y cloranfenicol (25 µg/ ml) como antibióticos de selección. Tanto pIJ6902 como la construcción pIJ6902/*alkA* presentan genes de resistencia a apramicina. La construcción pIJ6902/*alkA* ha sido utilizada para la síntesis de un alquilresorcinol con propiedades antioxidantes expresado por *alkA*.

6.29 Conjugación de los plásmidos pIJ6902 y pIJ6902/*alkA* con *S. venezuelae* WT y con *S. venezuelae* Δ *cmlH*

Una vez que se obtuvieron colonias capaces de crecer en apramicina, kanamicina y cloranfenicol se picaron en 5 ml de medio LB utilizando los mismos antibióticos de selección y se incubó a 37° C en agitación constante durante 24 h para realizar su conjugación con esporas de *S. venezuelae* WT y con esporas de *S. venezuelae* Δ *cmlH*. Se llevó a cabo la misma metodología descrita en el punto 6.20. Utilizando apramicina (50 µg/ ml), kanamicina (50 µg/ ml) y cloranfenicol (25 µg/ ml) como antibióticos de selección.

Después de 12 horas de haber plaqueado en medio GS+ 60 mM de CaCl₂ se agregó a cada placa 1 ml de H₂O Milli-Q estéril con ácido nalidíxico (20 µg/ ml) y apramicina (50 µg/ ml) para seleccionar las colonias de *S. venezuelae* WT y *S. venezuelae* Δ *cmlH* resistentes a apramicina, y se continuó incubando a 29° C.

6.30 Confirmación de la inserción de los plásmidos pIJ6902 y pIJ6902/*alkA* en *S. venezuelae* WT y en *S. venezuelae* Δ *cmlH* por PCR de colonia

Ya que se obtuvieron colonias capaces de crecer en presencia de ácido nalidíxico y apramicina se plaquearon en medio MYM utilizando los mismos antibióticos de selección, y se incubaron a 29°C. Aquellas colonias que crecieron nuevamente en presencia de ácido nalidíxico y apramicina se evaluaron por PCR de colonia utilizando la enzima Phire plant direct PCR kit de Thermo Scientific y un par de

oligonucleótidos que fueron diseñados para unirse al plásmido pIJ6902 por el M. en C. Jiménez R.

Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa 0.8% al que se le aplicaron 90 V durante 60 min. Se descartaron los falsos positivos y las colonias en las que se obtuvo el amplicón con el peso molecular esperado se replaquearon en medio MYM con apramicina (50 µg/ ml). Posteriormente se incubaron a 29° C.

6.31 Confirmación de la expresión del gen *alkA* en *S. venezuelae* WT y en *S. venezuelae* Δ *cmlH* por TLC

Aquellas colonias en las que se obtuvo el amplicón con el peso molecular esperado para la inserción de pIJ6902/*alkA* se evaluaron por TLC para corroborar la expresión del gen *alkA* en *S. venezuelae* WT y en *S. venezuelae* Δ *cmlH*.

Para esto se picaron las colonias por cuadruplicado en 50 ml de medio MYM y se incubaron a 29° C en agitación constante utilizando matraces bafleados. 48 h después de haber inoculado se sacaron 2 matraces de cada colonia y se centrifugaron a 18 000 x g durante 12 min para separar la biomasa del sobrenadante. Al resto de los matraces se les agregó 10 µl de thiostrepton (50 µg/ml) para inducir la expresión de *alkA* y se incubaron nuevamente a 29° C. 120 h después de haber sido inoculados se sacaron 2 matraces de cada colonia y se centrifugaron a 18 000 x g durante 12 min para separar la biomasa del sobrenadante.

A partir de las biomásas obtenidas se realizó la extracción de compuestos mediante sonicación (5 minutos de tiempo efectivo por muestra) utilizando acetato de etilo. Finalmente, los extractos fueron analizados mediante TLC utilizando como fase móvil una solución con diclorometano y acetato de etilo (9:1), y como fase estacionaria una placa de sílice a la cual se le aplicaron 15 µl de cada extracto de biomasa. Las placas fueron reveladas con la solución Fast Blue B y Folin Ciocalteau para detectar la expresión de *alkA* en las muestras.

6.32 Análisis bioinformático para la predicción de clústeres de metabolitos secundarios en *S. venezuelae* WT

Con la finalidad de conocer la variedad de metabolitos secundarios producidos por *S. venezuelae* y visualizar nuevas vías de síntesis por bloquear en *S. venezuelae* $\Delta cmlH$ a futuro, se utilizó el enfoque de la minería genómica. El análisis bioinformático se realizó introduciendo el genoma de *S. venezuelae* ATCC10712 al programa AntiSmash. Este programa permite predecir los clústeres potenciales para la producción de metabolitos secundarios en un genoma.

7. Resultados

7.1 Producción de cloranfenicol por *S. venezuelae* en medio GI

Para asegurar que *S. venezuelae* ATCC 10712 (WT) produce cloranfenicol bajo las condiciones de cultivo establecidas, se analizaron extractos de biomasa y de sobrenadante mediante cromatografía en capa fina (TLC) y por bioautografía. En la figura 7 se puede observar en la TLC la presencia de un compuesto en el sobrenadante (S) que se comporta de la misma manera que el control (Cloranfenicol-C0378, Sigma) en cuanto a polaridad (Fig. 7A y 7C), y en la bioautografía se demuestra que este compuesto también se comporta como el control (C) en cuanto a su actividad contra bacterias Gram-positivas como *M. luteus* y Gram-negativas como *E. coli* (Fig. 7B y 3D). De manera mínima también se puede observar en la biomasa (B) la presencia de un compuesto que se comporta de la misma manera que el control en las pruebas de TLC, lo cual podría deberse a una separación no total de ambas fases, ya que los datos reportados indican que el cloranfenicol una vez que es producido es expulsado de la célula.

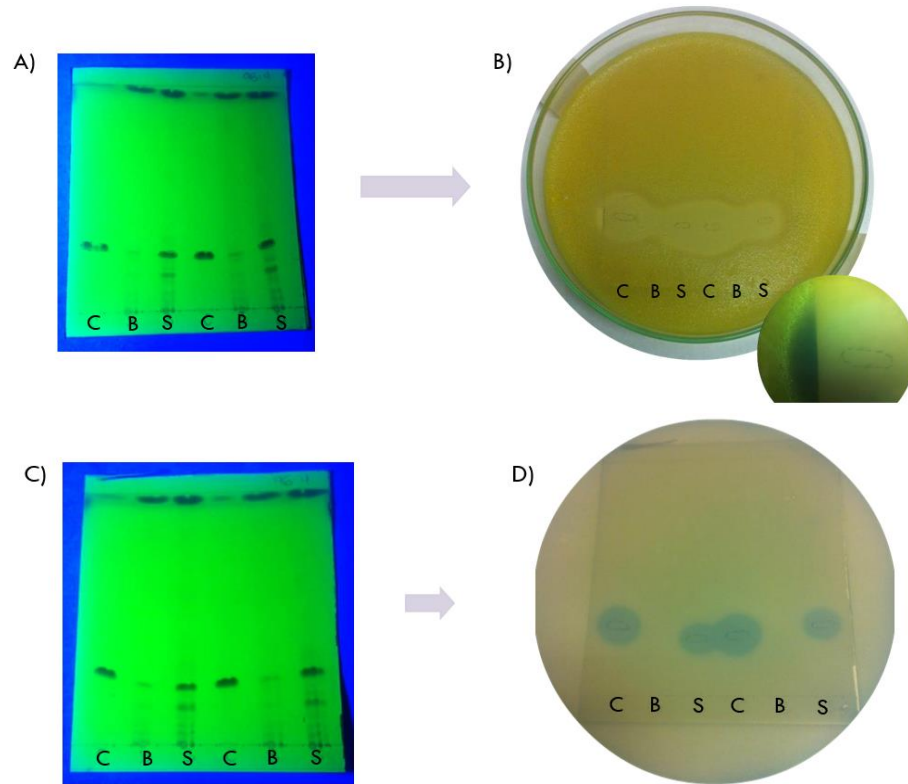


Figura 7. Presencia y actividad de los compuestos extraídos de *S. venezuelae*. A) Cromatografía en capa fina de los compuestos presentes en biomasa y sobrenadante. B) Bioautografía contra *M. luteus* C) Cromatografía en capa fina de los compuestos presentes en biomasa y sobrenadante. D) Bioautografía y tinción vital contra *E. coli* K12 (WT). C: cloranfenicol- C0378, Sigma (1 mg/ml), B: Biomasa (8.4 mg/ml), S: sobrenadante (5.6 mg/ml).

Para determinar de manera certera que el compuesto que se comporta como el control en cuanto a polaridad y actividad realmente es cloranfenicol, los extractos de sobrenadante se analizaron por UPLC-MS. Lo cual demostró la presencia del cloranfenicol tanto a las 48 h de crecimiento como a las 120 h en medio GI, con una masa aproximada de 321.0079 g/mol, como se puede observar en el cromatograma de la figura 8.

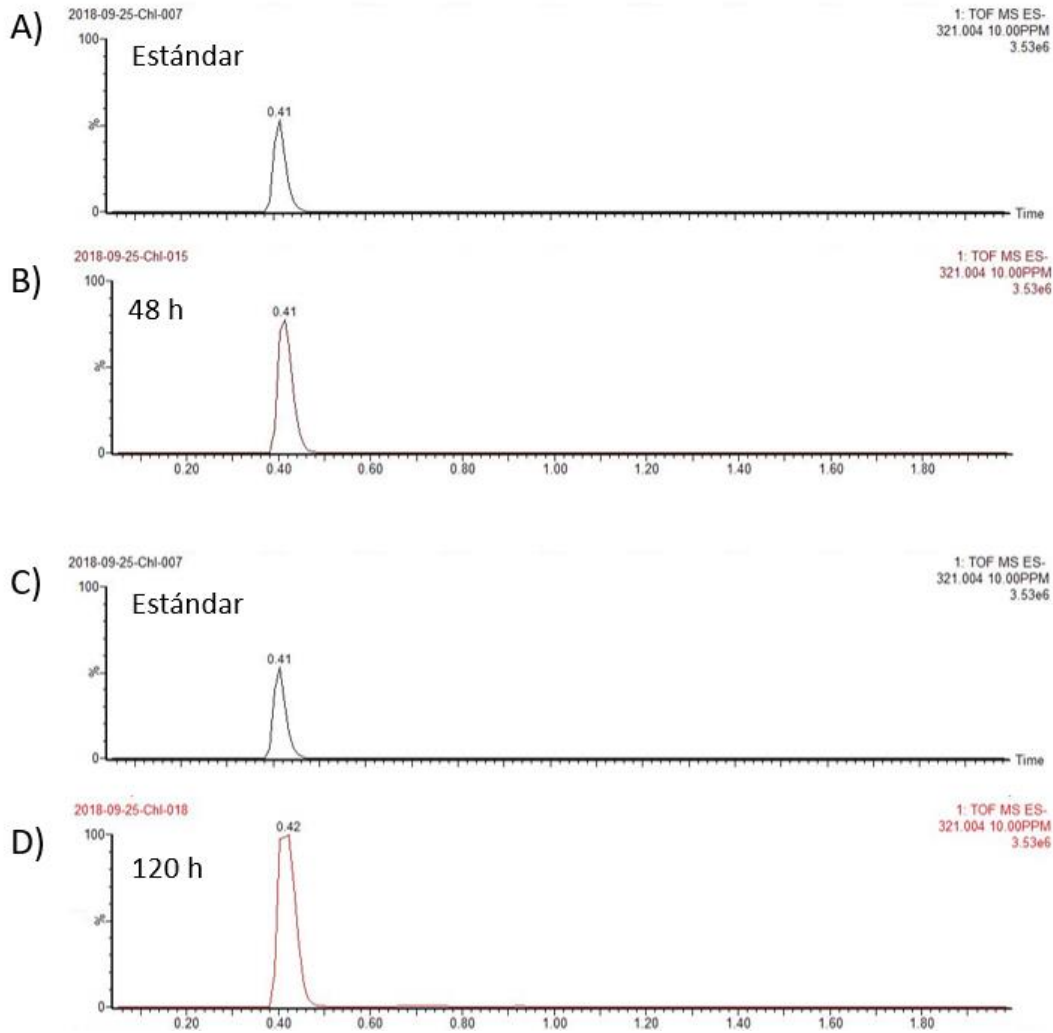


Figura 8. Detección de cloranfenicol en *S. venezuelae* WT. A y C) Estándar, cloranfenicol-C0378, Sigma. B) Extracto de sobrenadante a las 48 h. D) Extracto de sobrenadante a las 120 h.

7.2 Determinación de la tasa de crecimiento de *S. venezuelae* ATCC 10712 (WT) en medio GI

Para conocer la tasa de crecimiento de *S. venezuelae* ATCC 10712 (WT) en medio GI se inocularon matraces con 1 μ l de esporas (2×10^8 esporas por μ l), en 50 ml de medio, y se obtuvo la biomasa a diferentes tiempos para determinar el peso seco.

En la figura 9 se observa una gráfica que representa la cinética de crecimiento de *S. venezuelae*, en el eje de las X se indican las horas a las cuales se tomaron las muestras y en el eje de las Y los miligramos de peso seco generados por mililitro de cultivo.

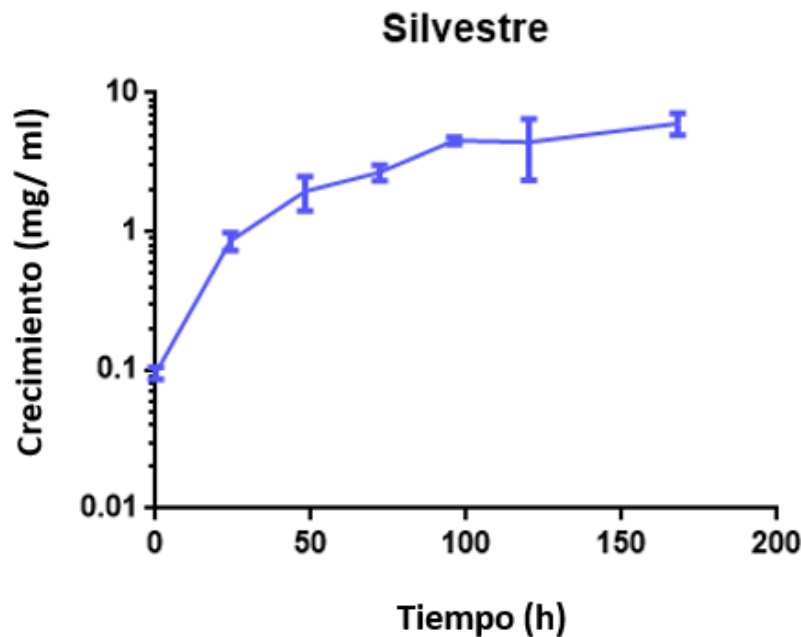


Figura 9. Cinética de crecimiento de *S. venezuelae* WT a las 0, 24, 48, 72, 96, 120 y 168 h de incubación.

7. 3 Producción de antibiótico por *S. venezuelae* ATCC 10712 (WT) en medio GI

Para evaluar la actividad de *S. venezuelae* ATCC 10712 (WT) contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas en medio GI se realizó una prueba de antibiosis frente a *B. subtilis* y *E. coli*. Se eligieron estas cepas ya que ambas fueron capaces de crecer en dicho medio, a diferencia de *M. luteus* y *S. cerevisiae*, como se muestra en la figura 10A. Los resultados de esta prueba demostraron que *S. venezuelae* WT inhibe el crecimiento de ambos microorganismos, como se muestra en la figura 10B.

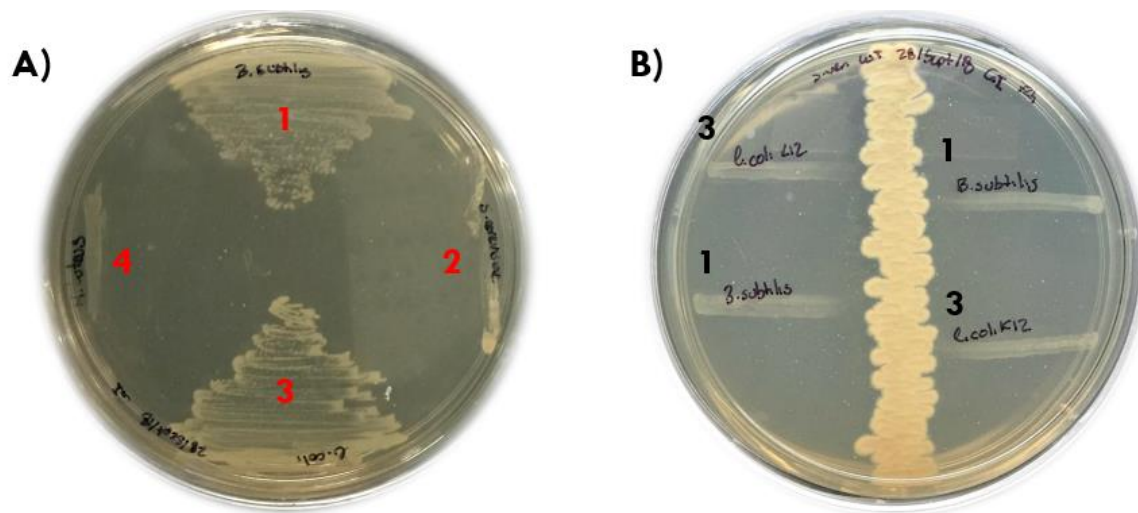


Figura 10. Ensayo de antibiosis de *S. venezuelae* WT. A1) *B. subtilis* creciendo en medio GI, A2) Crecimiento nulo de *S. cerevisiae* en medio GI, A3) *E. coli* creciendo en medio GI, A4) Crecimiento nulo de *M. luteus* en medio GI. B) Inhibición del crecimiento de *B. subtilis* (B1) y *E. coli* (B3) por *S. venezuelae* en medio GI.

7.4 Purificación del cósmido pAH91 y del plásmido pIJ778

El cósmido (pAH91) sobre el cual se llevó a cabo el reemplazo de los genes blanco para interrumpir la vía de síntesis de cloranfenicol se purificó mediante la técnica de lisis alcalina a partir de *E. coli* DH5 α (Fig. 11A). La interrupción de los genes blanco se llevó a cabo con un casete de resistencia a espectinomicina contenido en el plásmido pIJ778. El plásmido pIJ778 de igual manera fue purificado mediante la técnica de lisis alcalina a partir de *E. coli* JM109. El cual se puede observar en la figura 11 (B), con un peso molecular de 4377 pb.

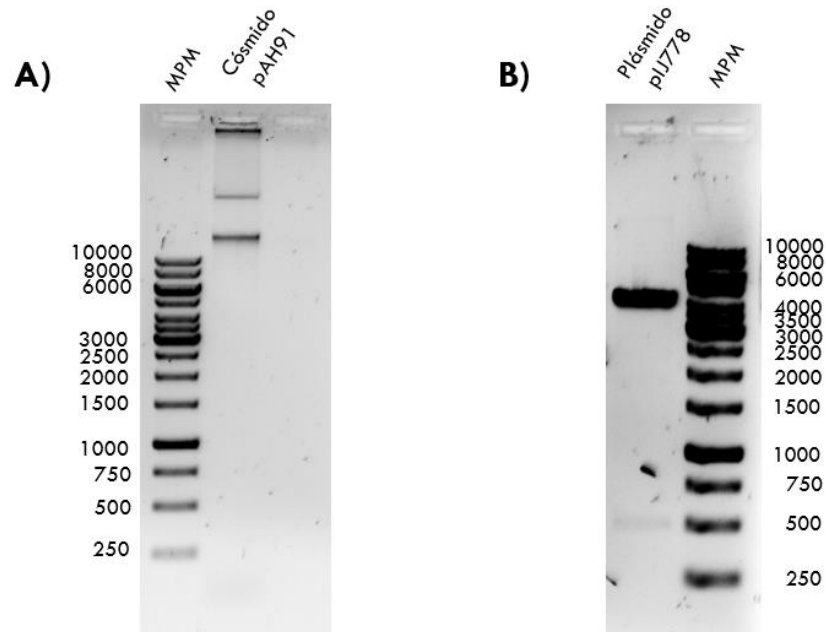


Figura 11. A) Gel de agarosa al 0.8% cargado con 3 μ l del cósmido pAH91 (1 234.4 ng/ μ l). B) Gel de agarosa al 0.8% cargado con 5 μ l del plásmido pIJ778 (80 ng/ μ l). MPM: marcador de peso molecular de 1 kb (Thermo Scientific).

7.5 Obtención y extensión del casete de resistencia a espectinomicina

El casete de resistencia a espectinomicina se obtuvo mediante digestión del plásmido pIJ778 con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*. En la figura 12 (A) se puede observar la obtención de dos bandas en un gel de agarosa, siendo la banda correspondiente a 1425 pb la esperada para el casete de resistencia a espectinomicina, de modo que se purificó a partir de la misma (Fig. 12B).

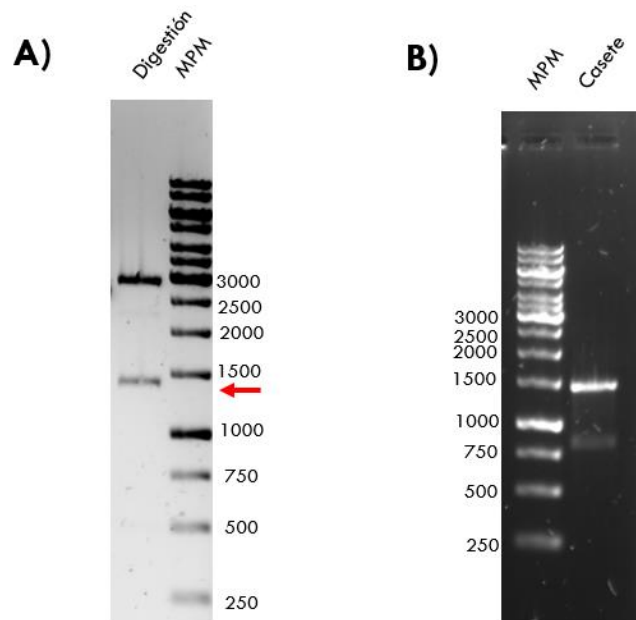


Figura 12. A) Gel de agarosa al 0.8% cargado con 5 μ l (80 ng/ μ l) de la digestión de pIJ778 con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*. B) Gel de agarosa al 0.8% cargado con 5 μ l (50 ng/ μ l) del casete de resistencia a espectinomicina purificado de banda (1425 pb). MPM: marcador de peso molecular de 1 kb (Thermo Scientific).

Posteriormente, se llevó a cabo la extensión del casete por PCR, agregando a sus extremos nucleótidos que flanquean a los genes de interés, para de esta manera interrumpirlos mediante recombinación homóloga. Una vez que se obtuvieron los amplicones con el peso molecular esperado para los casetes extendidos, se purificaron de banda (resultados no mostrados).

7.6 Evaluación por PCR de las colonias de *E. coli* BW25113/ pIJ790/ pAH91 transformadas con los casetes extendidos

Los casetes extendidos se transformaron en las células electrocompetentes de *E. coli* BW25113/ pIJ790/ pAH91 y se plaquearon en medio LB con ampicilina, apramicina y estreptomycinina como antibióticos de selección. Dicha cepa previamente estuvo en presencia de arabinosa 10 mM para inducir la expresión del

sistema de recombinación, *E. coli* BW25113 presenta la particularidad de no consumir arabinosa.

Las colonias obtenidas se evaluaron por PCR de colonia utilizando los oligonucleótidos de confirmación, diseñados aproximadamente 100 pares de bases río arriba y río abajo del sitio de recombinación. La figura 13 muestra la reacción de PCR en un gel de agarosa, donde se puede observar que se obtuvo el amplicón con el peso molecular esperado (1652 pb) para la interrupción de *cmIH* con el casete de resistencia a espectinomicina en una de las colonias. De modo que se realizó la extracción del cósmido a partir de la colonia en la cual se obtuvo el amplicón con el peso molecular esperado y se evaluó nuevamente por PCR utilizando el par de oligonucleótidos de confirmación. En la figura 13 (B) se puede observar que nuevamente se obtuvo el amplicón esperado de 1652 pb.

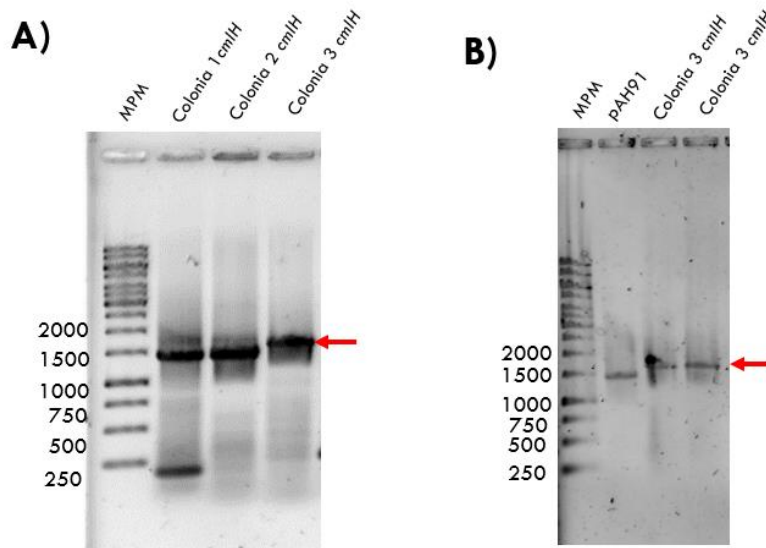


Figura 13. A) Gel de agarosa al 0.8 % cargado con 10 μ l (80 ng/ μ l) de la reacción de PCR para evaluar las colonias de *E. coli* BW25113/ pIJ790/ pAH91/ casetes extendidos con los oligonucleótidos de confirmación. Amplicón esperado para la mutante *cmIH*: 1652 pb. B) Gel de agarosa al 0.8% cargado con 10 μ l (50 ng/ μ l) de la reacción de PCR para evaluar el cósmido extraído a partir de la colonia 3 *cmIH* con los oligonucleótidos de confirmación.

Amplicón esperado para el control (pAH91): 1413 pb. Amplicón esperado para la mutante *cmIH*: 1652 pb. MPM: marcador de peso molecular de 1 kb (Thermo Scientific).

7.7 Obtención de transformantes resistentes a espectinomicina de *S. venezuelae*

El reemplazo del gen *cmIH* con el casete de resistencia a espectinomicina se corroboró mediante secuenciación. Posteriormente, la cepa de *E. coli* ET12567/ (pUZ8002)/ pAH91/ *cmIH*:: *aadA*, es decir, aquella en la que se obtuvo el cósmido mutado, se conjugó con esporas de *S. venezuelae* WT. Para este fin se utilizaron diferentes medios de cultivo, siendo el medio GS con CaCl₂ en el que se obtuvieron colonias, que posteriormente fueron plaqueadas en medio MYM. Se obtuvieron 16 colonias de *S. venezuelae* resistentes a espectinomicina y sensibles a ampicina y a apramicina, lo que sugiere que se llevó a cabo la doble recombinación deseada (Fig. 14 A).

A su vez, se llevó a cabo la confirmación por PCR de la interrupción del gen *cmIH* con el casete de resistencia a espectinomicina en las colonias obtenidas. La reacción de PCR se corrió en un gel de agarosa, en el cual se pudo observar que en 15 de las 16 colonias se obtuvo el amplicón con el peso molecular esperado para la interrupción de *cmIH* en *S. venezuelae* (Fig. 14 B).

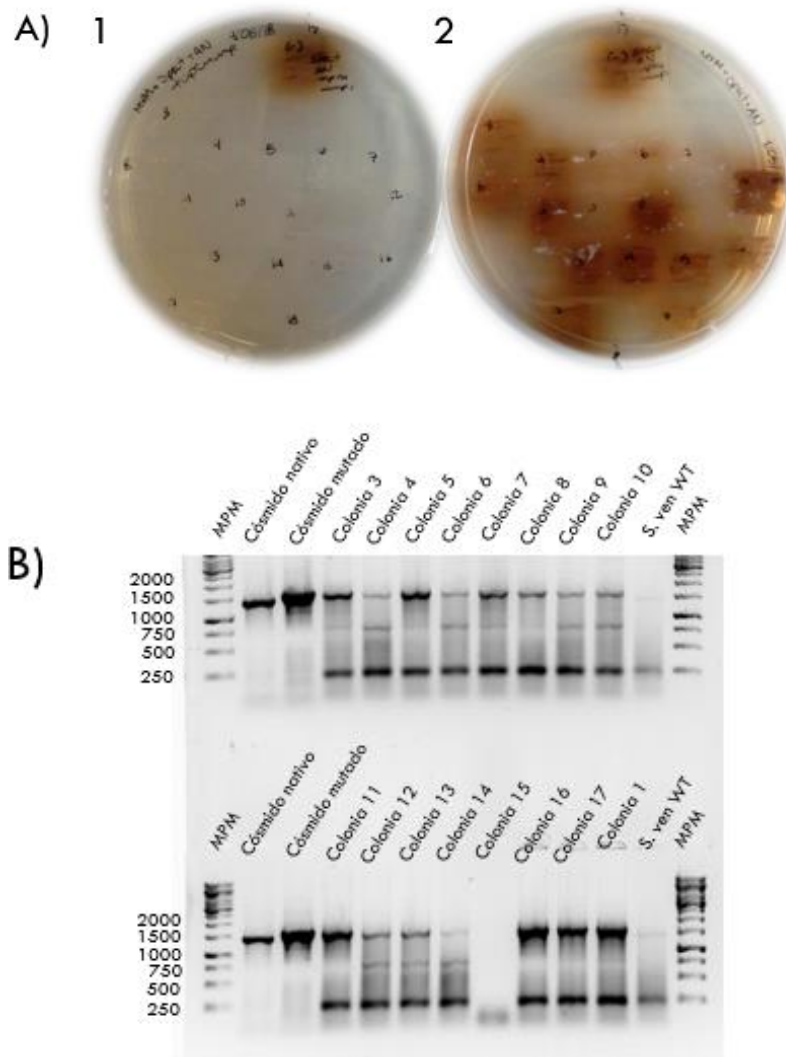


Figura 14. Conjugación de *E. coli* ET12567/ (pUZ8002)/ pAH91/ *cmlH*:: *aadA* con *S. venezuelae*. A) Selección de transformantes por resistencia a espectinomicina. A1. Medio MYM con ampicilina, apramicina, ácido nalidíxico y espectinomicina. A2. Medio MYM con ácido nalidíxico y espectinomicina. B) Gel de agarosa al 0.8% cargado con 10 μ l (50 ng/ μ l) de las reacciones de PCR para evaluar con los oligonucleótidos de confirmación las colonias obtenidas. Amplicón esperado para el control: 1413 pb. Amplicón esperado para la mutante *cmlH*: 1652 pb. MPM: marcador de peso molecular de 1 kb (Thermo Scientific).

Se realizó la extracción de ADN genómico de 4 de las 15 colonias, de las cuales se obtuvo únicamente de 2 de ellas como se muestra en la figura 15 (A), y se evaluaron nuevamente por PCR utilizando el par de oligonucleótidos de confirmación. En la figura 15 (B) se puede observar que nuevamente se obtuvo el amplicón esperado de 1652 pb para la interrupción de *cmIH* con el casete de resistencia a espectinomicina en *S. venezuelae*. Los amplicones fueron purificados de banda (Fig. 15 C) para corroborar mediante secuenciación la interrupción de *cmIH*.

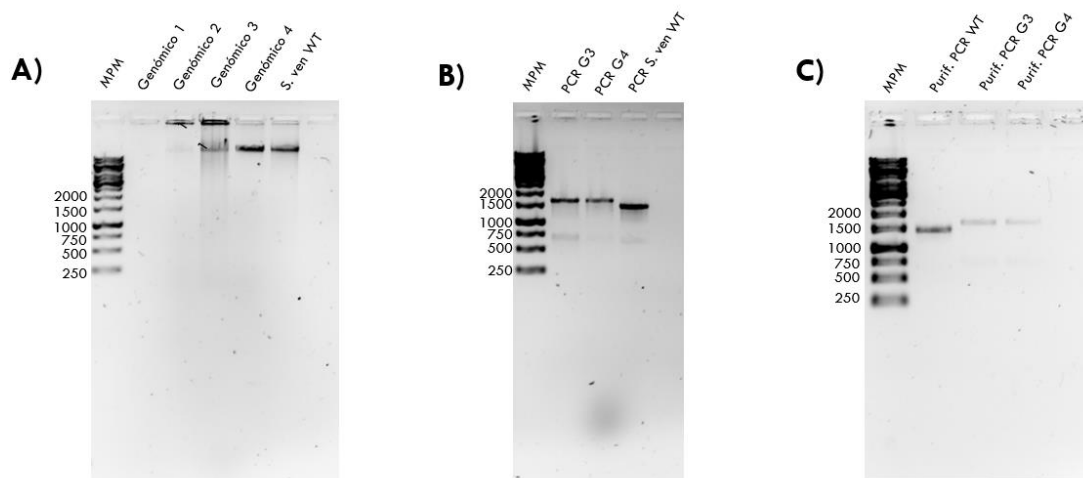


Figura 15. A) Gel de agarosa al 0.8 % cargado con 5 μ l (50 ng/ μ l) de la extracción de ADN genómico de 4 de las 15 colonias que mostraron el amplicón con el peso molecular esperado para la interrupción de *cmIH* con el casete de resistencia a espectinomicina en *S. venezuelae* y de *S. venezuelae* WT. B) Gel de agarosa al 0.8 % cargado con 10 μ l (80 ng/ μ l) de la reacción de PCR para evaluar el ADN genómico extraído a partir de las colonias 3 y 4 con los oligonucleótidos de confirmación. Amplicón esperado para el control (ADN genómico de *S. venezuelae* WT): 1413 pb. Amplicón esperado para la mutante *cmIH*: 1652 pb. C) Gel de agarosa al 0.8 % cargado con 5 μ l (50 ng/ μ l) de los amplicones esperados para la mutante *cmIH* y para *S. venezuelae* WT purificados de banda. MPM: marcador de peso molecular de 1 kb (Thermo Scientific).

7.8 Determinación de la tasa de crecimiento de *S. venezuelae* Δ *cmIH* en medio GI

Ya que se corroboró la interrupción del gen de interés con el casete de resistencia a espectinomicina, para conocer la tasa de crecimiento de *S. venezuelae* $\Delta cmIH$ en medio GI se inocularon matraces con 1 μ l de esporas (2×10^8 esporas por μ l) en 50 ml de medio y se obtuvo la biomasa a diferentes tiempos para determinar el peso seco. En la figura 16 se observa una gráfica que representa la cinética de crecimiento de *S. venezuelae* $\Delta cmIH$, en el eje de las X se indican las horas a las cuales se tomaron las muestras y en el eje de las Y los miligramos de peso seco generados por mililitro de cultivo.

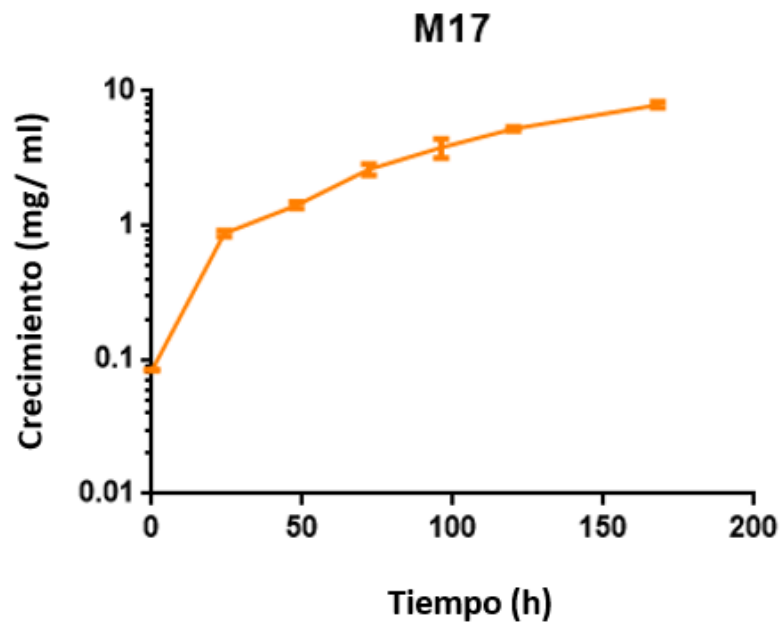


Figura 16. Cinética de crecimiento de *S. venezuelae* $\Delta cmIH$ a las 0, 24, 48, 72, 96, 120 y 168 h de incubación.

7.9 Comparación de la tasa de crecimiento de *S. venezuelae* ATCC 10712 (WT) y *S. venezuelae* $\Delta cmIH$ en medio GI

Una vez que se evaluó la tasa de crecimiento de ambas cepas se llevó a cabo una comparación de estas para observar el efecto de la interrupción del gen *cmIH* sobre

el crecimiento de *S. venezuelae*. Los resultados de este análisis sugieren que no se afectó de manera significativa el crecimiento de la mutante obtenida (Fig. 17).

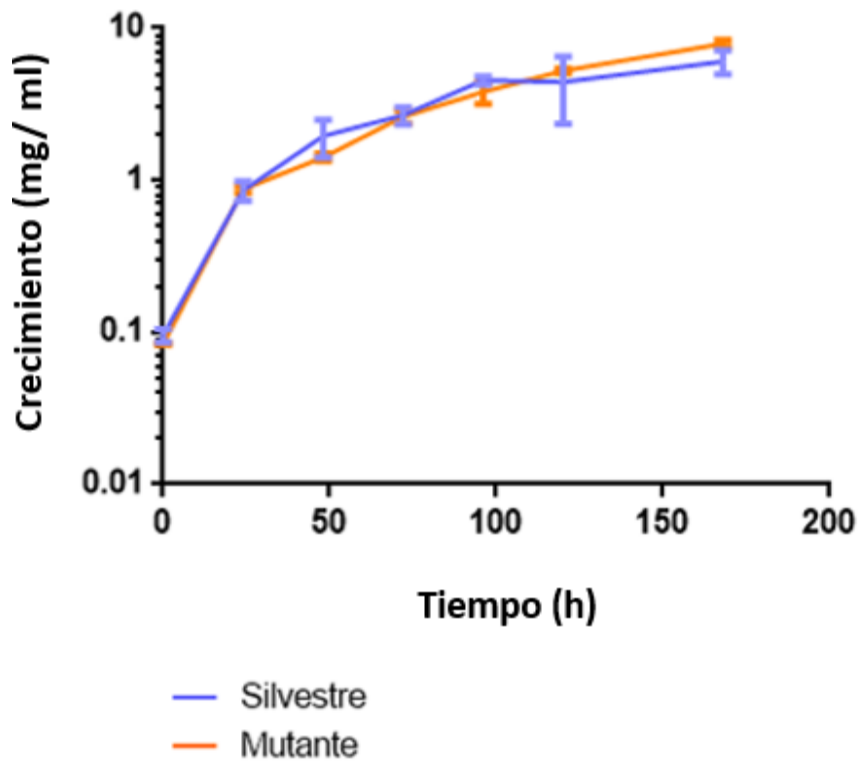


Figura 17. A) Comparación de la cinética de crecimiento de *S. venezuelae* WT y *S. venezuelae* $\Delta cmIH$ a las 0, 24, 48, 72, 96, 120, y 140 h de incubación.

7. 10 Producción de antibiótico de *S. venezuelae* $\Delta cmIH$ en medio G1

Para evaluar la actividad de *S. venezuelae* $\Delta cmIH$ contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas en medio G1 se realizó una prueba de antibiosis frente a *B. subtilis* y *E. coli*, los resultados de esta prueba demostraron que *S. venezuelae* $\Delta cmIH$ no inhibe el crecimiento de estos microorganismos, como se muestra en la figura 18.

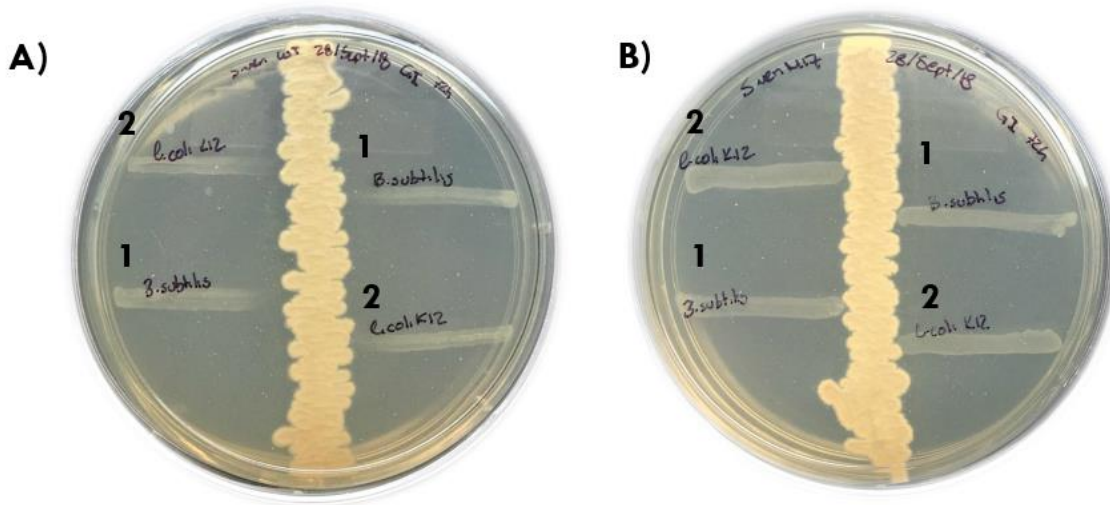


Figura 18. Ensayo de antibiosis de *S. venezuelae* en medio GI. A) *S. venezuelae* WT contra *B. subtilis* (1) y *E. coli* (2). B) *S. venezuelae* $\Delta cmlH$ contra *B. subtilis* (1) y *E. coli* (2).

7. 11 Producción de cloranfenicol por *S. venezuelae* $\Delta cmlH$ en medio GI

Para corroborar que la pérdida de la actividad antibiótica de la mutante $\Delta cmlH$ se debe a que realizó de manera exitosa el bloqueo de la vía de síntesis de cloranfenicol, se establecieron las mismas condiciones de cultivo que para la cepa WT, y de la cinética de crecimiento a las 48 y 120 h se separó biomasa del sobrenadante, para a partir de los sobrenadantes realizar la extracción de compuestos y analizarlos por UPLC-MS. Los resultados de este análisis indican que el cloranfenicol no es producido por la cepa a las 48 h y tampoco a las 120 h tras la interrupción del gen *cmlH* (Fig. 19).

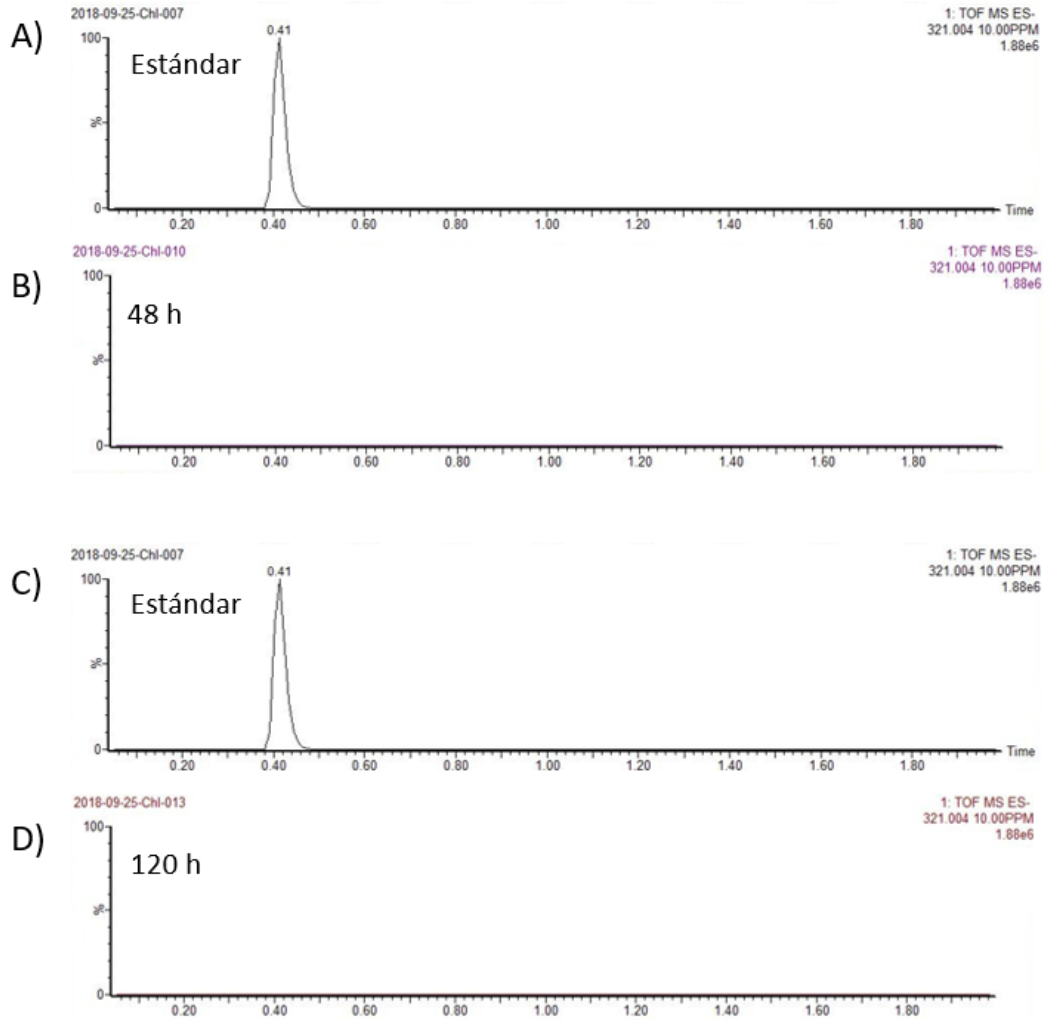


Figura 19. Detección de cloranfenicol en *S. venezuelae* $\Delta cmIH$. A) y C) Estándar, cloranfenicol- C0378, Sigma. B) Extracto de sobrenadante a las 48 h. D) Extracto de sobrenadante a las 120 h.

7. 12 *S. venezuelae* WT y *S. venezuelae* $\Delta cmIH$ como hospederos para expresión heteróloga

Para evaluar a ambas cepas como hospederos para realizar expresión heteróloga se trabajó con la construcción pIJ6902/*alkA*, que presenta resistencia a apramicina como antibiótico de selección, y que ha sido utilizada para la expresión de un

alquilresorcinol con propiedades antioxidantes. La construcción se insertó al ser conjugada con esporas de *S. venezuelae* WT y con esporas de *S. venezuelae* $\Delta cmlH$ utilizando medio GS con CaCl_2 . De dicha conjugación se obtuvieron 28 colonias de *S. venezuelae* WT (Fig. 20 A1) y 10 colonias de *S. venezuelae* $\Delta cmlH$ (Fig. 20 A2) resistentes a apramicina. Las colonias obtenidas se plaquearon en medio MYM como se puede observar en la figura 20 (A).

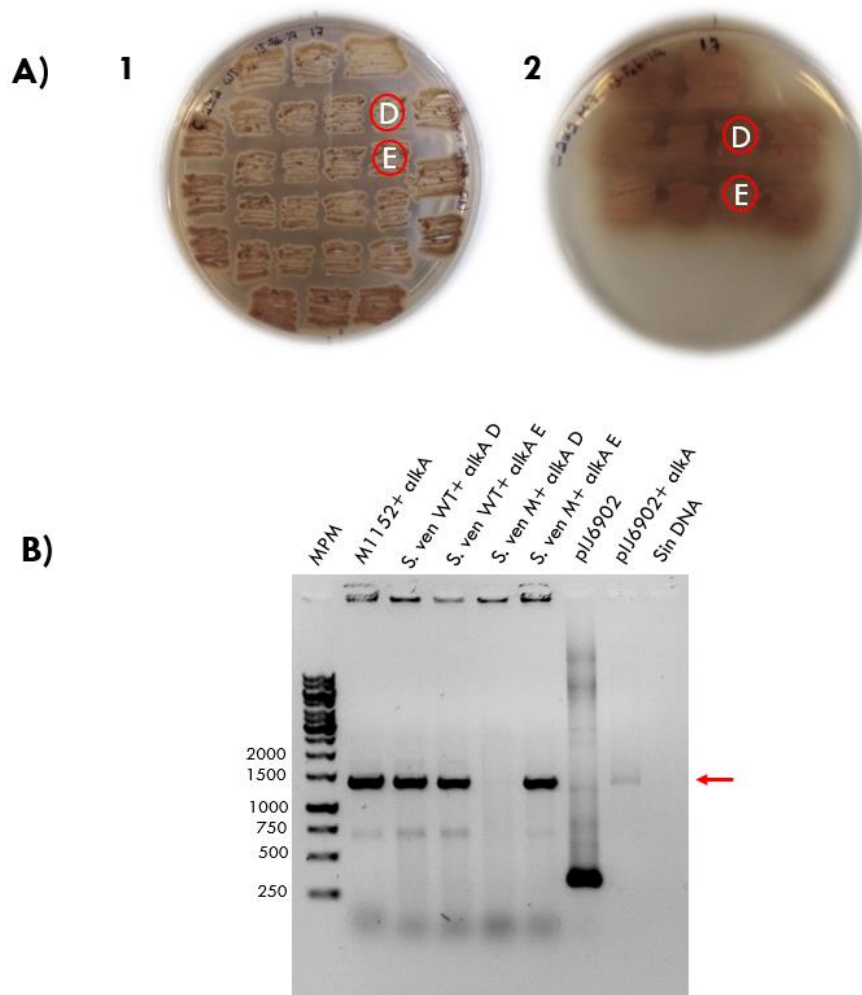


Figura 20. Conjugación de pIJ6902/ *alkA* con *S. venezuelae* WT y con *S. venezuelae* $\Delta cmlH$. A) Selección de transformantes por resistencia a apramicina en medio MYM. A1. *S.*

venezuelae WT. A2. *S. venezuelae* $\Delta cmIH$. B) Gel de agarosa al 0.8% cargado con 10 μ l (80 ng/ μ l) de las reacciones de PCR para corroborar con los oligonucleótidos de confirmación la presencia de *alkA* en las transformantes resistentes a apramicina en medio MYM. En el primer carril del gel se colocó el marcador de peso molecular de 1 kb (Thermo Scientific). En el segundo carril se colocó como control positivo la cepa M1152/ *alkA*, los siguientes 4 carriles corresponden a las colonias que fueron elegidas para llevar a cabo la confirmación, 2 de la cepa WT y 2 de la mutante $\Delta cmIH$, luego se encuentra el plásmido pIJ6902 sin el inserto como control negativo, y en el penúltimo carril pIJ6902/ *alkA* como control positivo. Amplicón esperado para el control sin inserción de *alkA*: 340 pb. Amplicón esperado para la inserción de *alkA*: 1362 pb.

De las colonias obtenidas se eligieron a dos de cada cepa (D y E) para confirmar la presencia de *alkA* por PCR de colonia, utilizando un par de oligonucleótidos que se unen al plásmido pIJ6902. Los productos de PCR se muestran en un gel de agarosa en la figura 20 (B). Los resultados de la reacción confirmaron que 3 de las 4 colonias elegidas (2 colonias WT y 1 colonia $\Delta cmIH$) incorporaron el plásmido con el gen *alkA*.

Posteriormente, las colonias en las que se obtuvo el amplicón con el peso molecular esperado para la inserción de pIJ6902/*alkA* se crecieron en medio MYM con y sin thioestrepton, que actúa como inductor del promotor que permite la expresión de *alkA*, y se llevó a cabo la extracción de sus compuestos a partir de la biomasa para evaluar por TLC la expresión del gen *alkA* en *S. venezuelae* WT y en *S. venezuelae* $\Delta cmIH$. En la figura 21 se muestran las pruebas de TLC reveladas con la solución Fast Blue B para la detección de fenoles (Fig. 21 A), y con Folin Ciocalteu para la detección de moléculas con actividad antioxidante (Fig. 21 B). En ninguna de las muestras se logró detectar la expresión de *alkA*.

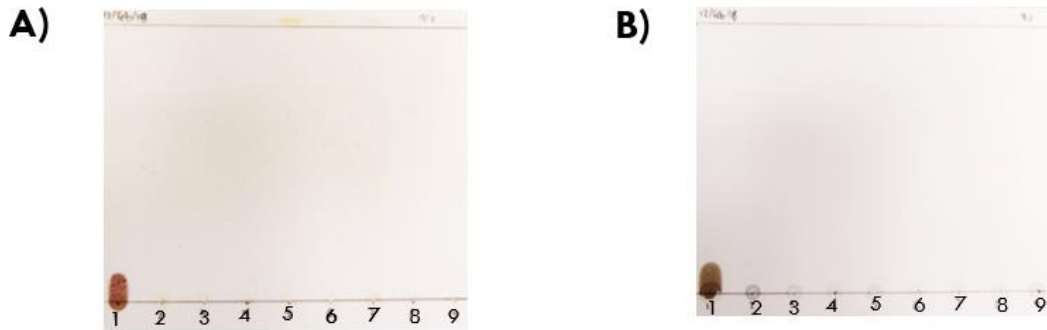


Figura 21. Análisis de la expresión de *alkA* por TLC. A) TLC revelada con Fast Blue B. B) TLC revelada con Folin Ciocalteu. 1, Floroglucinol utilizado como control positivo, 2 y 3 corresponden a *S. venezuelae* WT (D) sin y tras la inducción de *alkA*, respectivamente, 4 y 5 corresponden a *S. venezuelae* WT (E) sin y tras la inducción, 6 y 7 a *S. venezuelae* $\Delta cmlH$ (D) sin y tras la inducción, 8 y 9 a *S. venezuelae* $\Delta cmlH$ (E) sin y tras la inducción.

7.13 Análisis bioinformático de los clústeres para la producción de metabolitos secundarios por *S. venezuelae* WT

Finalmente, se llevó a cabo un análisis bioinformático de los clústeres para la producción de metabolitos secundarios de *S. venezuelae* WT utilizando el programa anti-SMASH. Los resultados del análisis bioinformático sugieren que el genoma de *S. venezuelae* contiene 30 clústeres para la producción de metabolitos secundarios como se muestra en la figura 22.

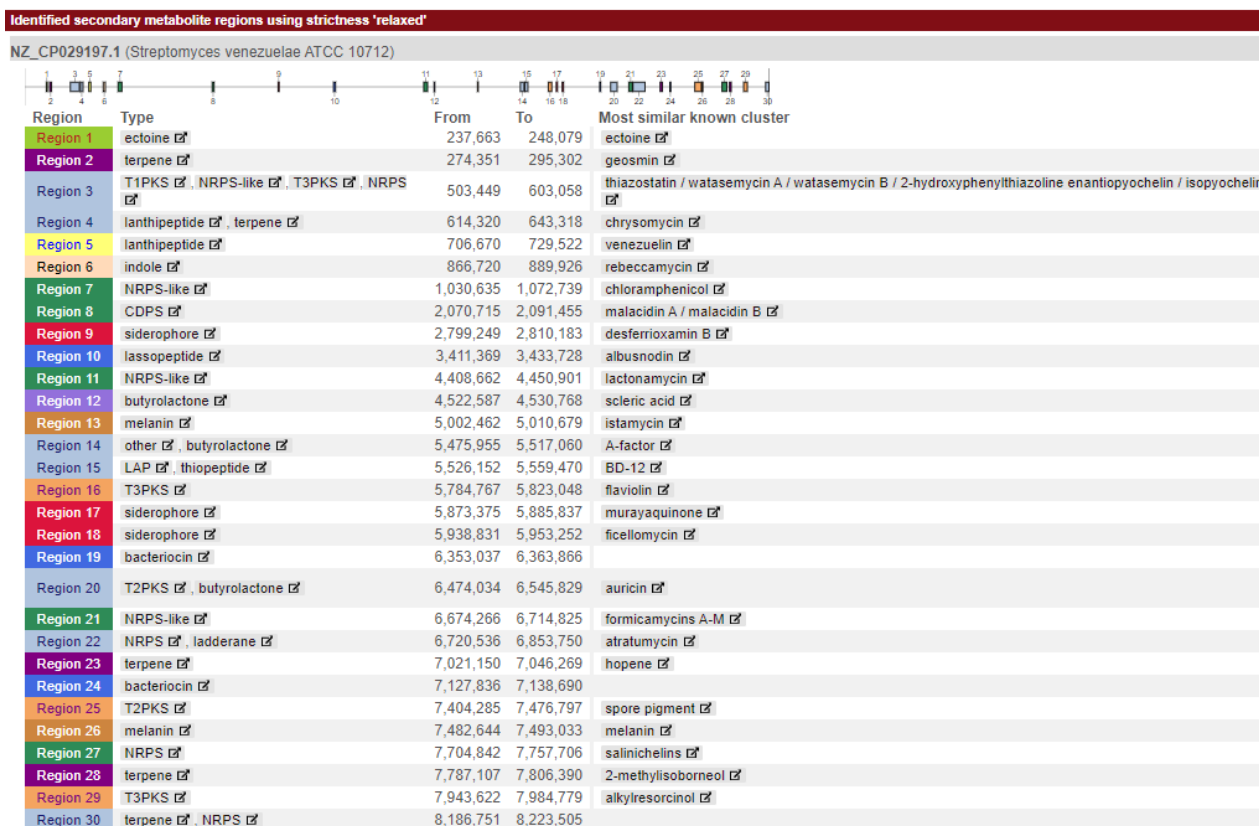


Figura 22. Clústeres potenciales para la producción de metabolitos secundarios contenidos en el genoma de *S. venezuelae* (ATCC 10712) con base en el análisis bioinformático realizado en el programa anti-SMASH el día 25/05/20.

8. Discusión

Las actinobacterias, donde se ubica el género *Streptomyces*, son un grupo de microorganismos de los cuales se ha logrado obtener la gran mayoría de las moléculas con actividad antibiótica que utilizamos en la actualidad. Sin embargo, es necesaria la búsqueda de moléculas bioactivas novedosas que nos generen algún beneficio (Demain y Sanchez, 2009, Sánchez y Demain, 2015). Esto representa un reto importante al que nos enfrentamos hoy en día debido a la creciente aparición de cepas resistentes o multi-resistentes. Para la búsqueda de estos compuestos recientemente se ha realizado el aislamiento de dichos microorganismos a partir de fuentes no convencionales (Demain *et al.*, 2019). También se ha hecho uso de herramientas como la minería genómica para identificar clústeres de interés en los

genomas de las actinobacterias que ya se encuentran secuenciadas (Challis, 2008, Lee *et al.*, 2020).

Al momento de identificar compuestos novedosos, una de las limitaciones para su caracterización es que los microorganismos a partir de los cuales se obtienen generalmente no se logran cultivar fácilmente en condiciones de laboratorio, o es necesario establecer condiciones específicas para la producción de estas moléculas, y muchas veces los metabolitos de interés se sintetizan en concentraciones muy bajas. Una solución a este tipo de limitaciones consiste en realizar expresión heteróloga en organismos genéticamente más manipulables y cultivables, por lo que actualmente se han diseñado cepas especialmente para este fin a partir de algunos estreptomicetos como *S. coelicolor*, *S. lividans* y *S. avermitilis*, eliminando vías de síntesis de los metabolitos secundarios que producen (Baltz, 2008; Gómez-Escribano y Bibb, 2012; Kim *et al.*, 2015).

S. venezuelae también se ha utilizado recientemente como hospedero para realizar expresión heteróloga de moenomycinas, policétidos, híbridos de policétidos, péptidos no ribosomales, aminoglucósidos, entre otras moléculas, por sus ventajas de crecimiento y de manipulación genética que presenta frente a otros microorganismos (Kim *et al.*, 2015, Moore *et al.*, 2017, Tschowri, 2016). Sin embargo, también se ha observado que una de las desventajas de utilizar como hospedero a *S. venezuelae*, y específicamente a la cepa ATCC 10712, es que la síntesis de metabolitos endógenos de esta bacteria, como el cloranfenicol, en ocasiones perjudica la caracterización de metabolitos expresados heterológamente (Lapatniuk *et al.*, 2014). Es por esto, que en este trabajo hemos creado un hospedero en el cual se bloqueó la síntesis del cloranfenicol a partir de dicha cepa, interrumpiendo genes que por ensayos de mutagénesis se ha demostrado que cumplen un papel fundamental durante la biosíntesis del antibiótico (He *et al.*, 2001). Esto, con el objetivo de que eventualmente pueda ser utilizado como vehículo de expresión de clústeres novedosos para la producción de metabolitos secundarios de interés farmacéutico o industrial, esperando a su vez tener una mayor producción

de metabolitos secundarios expresados de manera heteróloga, como lo reportado para *S. venezuelae* WVR2006 (Yin et al., 2016).

De modo que, primero que nada, se determinó la capacidad de producción de cloranfenicol en nuestra cepa, ya que los estreptomicetos presentan cromosomas lineales con una gran inestabilidad y pérdida constante de segmentos cromosomales a los extremos, o rearrreglos de los mismos (Volff y Altenbuchner, 1998). Para evaluar la producción de este metabolito en *S. venezuelae* ATCC 10712 (WT), se reprodujeron las condiciones de cultivo establecidas por Chatterjee y Vining (1982), es decir, medio de cultivo GI, en el cual se ha reportado que la cepa de *S. venezuelae* WT produce cloranfenicol en cantidades detectables. Posterior a eso, se realizó la extracción de compuestos producidos en los cultivos y se analizaron por cromatografía en capa fina (TLC) y por bioautografía.

La técnica de TLC permite separar moléculas contenidas en una mezcla con base en su polaridad. Los compuestos presentan diferentes afinidades hacia las fases que se utilizan y eso determina la velocidad a la cual migran. Al hacer uso de esta técnica se pudo observar la presencia de un compuesto en los extractos del sobrenadante, a los 6 días de crecimiento, que se comporta de la misma manera que el cloranfenicol control en cuanto a polaridad, lo cual concuerda con lo ya reportado acerca de que este metabolito secundario una vez que es producido es expulsado por el microorganismo (Fernández-Martínez *et al.*, 2014).

A su vez, las pruebas de bioautografía para evaluar la actividad de los extractos obtenidos de *S. venezuelae* WT mostraron un mismo comportamiento que el cloranfenicol control. Es decir, el compuesto que en el sobrenadante presentó una misma polaridad que el control, también presentó la misma actividad, ya que ambos inhibieron el crecimiento tanto de *M. luteus* como de *E. coli*. Con base en lo anterior podemos decir con mayor certeza que el compuesto presente en el sobrenadante es cloranfenicol, lo cual posteriormente se corroboró por UPLC- MS, una técnica altamente sensible que combina las capacidades de separación de la cromatografía líquida con la capacidad de análisis de la espectrometría de masas en una mezcla de compuestos. Tras analizar los extractos de sobrenadante, se detectó la

presencia del metabolito con una masa aproximada de 321.0079 g/mol tanto a las 48 h de crecimiento, como a las 120 h, siendo mayor su producción a las 120 h.

Chatterjee y Vining (1982) reportaron que la síntesis de este metabolito es un proceso asociado directamente al crecimiento de *S. venezuelae* cuando se crece en un medio de cultivo en la que la fuente de carbono no es restrictiva. Es decir, la producción de cloranfenicol se ve favorecida durante la fase exponencial y disminuye una vez alcanzada la fase estacionaria. Por lo que mencionan, que para obtener grandes cantidades del metabolito es necesario prolongar esta fase. Por ejemplo, en un medio de cultivo en la que la fuente de carbono no es restrictiva, como la glucosa, es necesario utilizar una fuente de nitrógeno que limite el crecimiento del microorganismo, como la isoleucina.

En este trabajo, al llevar a cabo la caracterización de la tasa de crecimiento de la cepa en medio GI se obtuvo una curva de crecimiento con base en los miligramos por mililitro de biomasa generada, en la que se observó que *S. venezuelae* a las 48 y 120 h continúa aún en fase exponencial. De modo que los resultados obtenidos sobre la producción de cloranfenicol van de acuerdo con lo reportado por Chatterjee y Vining (1982).

A su vez, se evaluó la capacidad antibiótica de la cepa contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas en medio GI mediante pruebas de antibiosis, estriando a *S. venezuelae* junto con *B. subtilis* y *E. coli*. Se eligieron a estas cepas para realizar el ensayo ya que el medio GI es un medio restrictivo, sin embargo, ambas cepas fueron capaces de crecer en el a 29°C. Los resultados de esta prueba indicaron que *S. venezuelae* logró inhibir el crecimiento de ambos microorganismos. El comportamiento de *B. subtilis* al crecerse junto con *S. venezuelae* se reportó previamente por Liu y colaboradores (Liu *et al*; 2018), quienes llevaron a cabo ensayos de competencia entre bacterias, en donde se demostró que *B. subtilis* genera una respuesta móvil cuando se crece en medio agar junto con *S. venezuelae* para evitarlo, siendo el cloranfenicol el agente inductor de esta respuesta quimiotáctica en concentraciones subinhibitorias. También se reportó que al igual

que el cloranfenicol, otros antibióticos dirigidos hacia el ribosoma de igual manera tienen la capacidad de inducir una respuesta de motilidad.

Para llevar a cabo el bloqueo de la vía de síntesis del cloranfenicol, se utilizó la técnica de PCR-targeting adaptada para *Streptomyces* por Gust y colaboradores en 2002. Se ha reportado que haciendo uso de esta técnica es posible obtener una mayor eficiencia para interrumpir genes de interés en comparación a otras técnicas, y básicamente consiste en interrumpir genes mediante recombinación homóloga con un casete de resistencia a un determinado antibiótico (Gust *et al.*, 2002). Para este fin se utilizó el plásmido pLJ778 creado por Gust y colaboradores, del cual se obtuvo un casete de resistencia a espectinomicina para llevar a cabo la interrupción de los genes blanco. También se utilizó el cósmido pAH91 creado por el doctor Gómez-Escribano y colaboradores a partir del vector SuperCos 1 (datos no publicados), que contiene el clúster con los genes necesarios para la síntesis de cloranfenicol. Los cósmidos son vectores que pueden contener hasta 42 kb de ADN y que facilitan el aislamiento de fragmentos específicos y su manipulación genética *in vitro*. (Fernández-Martínez *et al.*, 2014).

De modo que se buscó realizar dos mutantes sobre el cósmido pAH91, en una de estas mutantes se buscó interrumpir el gen *cmlH*, y en la otra los genes *cmlI*, *cmlH*, *cmlP* y *cmlA*. Se eligieron estos genes ya que en el caso de *cmlH* y *cmlP*, He y colaboradores en 2001 demostraron que al ser interrumpidos con un casete de resistencia a ampicilina, la cepa de *S. venezuelae* WT ya no es capaz de producir p-aminofenilalanina (PAPA), ni cloranfenicol.

El desarrollo de la técnica de PCR-targeting se basó en el descubrimiento de que los intercambios alélicos en el cromosoma de *E. coli* se pueden lograr mediante recombinación con un marcador seleccionable flanqueado en ambos extremos por extensiones de nucleótidos homólogos a la región deseada del cromosoma cuando las proteínas Red α (*exo*), Red β (*bet*) y Red γ (*gam*) del fago λ están presentes (Datsenko y Wanner, 2000). Se sabe que muchos bacteriófagos, o fagos, codifican sus propios sistemas de recombinación homóloga, y se ha observado que el sistema λ RED promueve una alta tasa de recombinación cuando se trabaja con ADN lineal

(Datsenko y Wanner, 2000; Gust *et al.*, 2002). De modo que una vez que se obtuvo el casete de resistencia a espectinomicina a partir de pIJ778 se llevó a cabo su extensión, agregando a sus extremos regiones homólogas a los genes de interés para interrumpir la vía de síntesis de cloranfenicol en *S. venezuelae*.

Los genes necesarios para la síntesis de las proteínas Gam (γ), Bet (β) y Exo (*exo*) fueron clonados en un plásmido de bajo número de copias, pIJ790 (Gust *et al.*, 2002), por lo que una vez que se obtuvieron los casetes de resistencia a espectinomicina extendidos se transformaron en *E. coli* BW25113/ pIJ790/ pAH91. Una vez que se obtuvieron colonias capaces de crecer en presencia del antibiótico de selección se evaluaron por PCR.

El PCR de una de las colonias transformadas con el casete extendido para interrumpir el gen *cmIH* mostró el peso molecular esperado del amplicón. La mutante *cmII*, *cmIH*, *cmIP* y *cmIA* se descartó en este punto al no obtenerse el amplicón esperado en las pruebas de PCR, y se continuó trabajando únicamente con la colonia transformada con el casete extendido para interrumpir *cmIH* que mostró el peso molecular esperado. Los resultados de la secuenciación de dicho amplicón confirmaron que se llevó a cabo la recombinación esperada, es decir, se interrumpió el gen *cmIH* con el casete de resistencia a espectinomicina en el cósmido pAH91.

El casete de resistencia a espectinomicina además contiene un origen de transferencia (*ori*_{TRK2}) que permite realizar la conjugación del cósmido Δ *cmIH* con *Streptomyces*. El cósmido pAH91 no tiene la capacidad de replicarse en *Streptomyces* ya que fue creado a partir de SuperCos 1 (Gómez-Escribano *et al.*, datos no publicados), sin embargo, se espera que durante la conjugación se lleve a cabo una doble recombinación entre el cósmido y el ADN genómico de *S. venezuelae* para realizar el reemplazo genético.

El medio de cultivo utilizado para llevar a cabo la conjugación en *S. coelicolor* es agar MS+ 10mM de MgCl₂, y el antibiótico de selección se aplica 16 h después de haber plaqueado en dicho medio, bajo esas condiciones se especula obtener un

10% de frecuencia de exconjugantes que llevaron a cabo la doble recombinación esperada (Gust *et al.*, 2002). Sin embargo, en el caso de *S. venezuelae* no se obtuvieron exconjugantes al utilizar agar MS+ 10mM de MgCl₂. Además, ya que se ha reportado que el crecimiento de esta cepa es más rápido en comparación a otros estreptomicetos (Kim *et al.*, 2015), el antibiótico de selección se aplicó a las 12 h tras haber plaqueado y no a las 16 h como está establecido para *S. coelicolor*. El antibiótico de selección utilizado fue espectinomicina 500 µg/ ml, previo a esto se realizaron pruebas de resistencia a espectinomicina 500 µg/ ml y 1000 µg/ ml en *S. venezuelae*, las cuales demostraron que la cepa no es capaz de crecer en ninguna de las dos condiciones (datos no mostrados).

Al no obtener exconjugantes en el medio de cultivo agar MS+ 10mM de MgCl₂ se decidió probar agar MS+ 10mM de CaCl₂ ya que, en un estudio realizado por Wang y Jin en 2014, se demostró que la presencia de iones de Ca²⁺ puede llegar a incrementar la frecuencia de conjugación de 1 000 a 10 000 veces en comparación a en ausencia de los mismos, y puede llegar a incrementar la frecuencia de conjugación de 10 a 100 veces en comparación a cuando se utilizan iones de Mg²⁺. Bajo estas condiciones tampoco se obtuvieron exconjugantes de *S. venezuelae* (datos no mostrados).

En ese mismo reporte se probó la frecuencia de conjugación de *S. venezuelae* al utilizar medio de cultivo GS+ 60mM de CaCl₂ (Wang y Jin, 2014), de modo que decidimos utilizar las mismas condiciones de cultivo. Bajo estas condiciones logramos obtener exconjugantes, de las cuales, en su mayoría correspondieron a falsos positivos. Sin embargo, por resistencia a espectinomicina 500 µg/ ml se seleccionaron 16 colonias que posiblemente podrían haber llevado a cabo la interrupción del gen *cmH* en el genoma de *S. venezuelae*. Estas colonias fueron capaces de crecer en medio con espectinomicina y ácido nalidíxico, pero no en medio con espectinomicina, ácido nalidíxico, ampicilina y apramicina, estos últimos son los marcadores de selección presentes en el cósmido, lo que sugiere que se llevó a cabo la doble recombinación deseada.

Dichas colonias se corroboraron mediante PCR de colonia, en donde 15 de las 16 mostraron el peso molecular esperado del amplicón para la mutante *cmIH*. Se eligieron a dos de ellas para analizarlas nuevamente mediante PCR utilizando ADN genómico purificado; el PCR nuevamente mostró el peso molecular esperado del amplicón. Finalmente, la secuenciación de dichos amplicones confirmó que el gen *cmIH* fue interrumpido con el casete de resistencia a espectinomicina en *S. venezuelae*.

Una vez que se obtuvo la mutante, de la misma manera que para la cepa WT, se llevó a cabo la determinación de su tasa de crecimiento en medio GI. Al hacer una comparación de la cinética de crecimiento de la cepa WT y de la mutante se pudo observar que la interrupción del gen *cmIH* en *S. venezuelae* no afectó el crecimiento de la mutante en dicho medio de cultivo, lo cual es importante ya que una de las ventajas que presenta *S. venezuelae* frente a otras actinobacterias y una de las razones por las que se propone como hospedero para realizar expresión heteróloga es su rápido crecimiento (Fan *et al.*, 2012, Yin *et al.*, 2016). Sin embargo, sería necesario evaluar a la cepa $\Delta cmIH$ en distintos medios de producción, ya que se ha reportado que durante el desarrollo de algunos hospederos el crecimiento de los mismos puede llegar a verse ser afectado, en comparación a la cepa parental (Gómez-Escribano y Bibb, 2011).

La actividad antimicrobiana que presenta *S. venezuelae* generalmente se atribuye a la síntesis del cloranfenicol (Fernández-Martínez *et al.*, 2014; He *et al.*, 2001, Lapatniuk *et al.*, 2014). Sin embargo, también se ha observado durante el desarrollo de cepas hospederas, que al eliminar una vía de síntesis de un metabolito secundario en ocasiones se puede estimular la producción de otros (Gómez-Escribano y Bibb, 2011). De modo que para evaluar la actividad de *S. venezuelae* $\Delta cmIH$ en medio GI se estrió a la mutante junto con *B. subtilis* y *E. coli*, de la misma manera en que se realizó para la cepa WT. Al hacer una comparación de ambas cepas se observó que la mutante *cmIH* perdió su actividad antibiótica frente a *B. subtilis* y *E. coli*.

Para corroborar que la pérdida de la actividad antibiótica de la mutante $\Delta cmIH$ en medio GI se debía a que se había realizado de manera exitosa el bloqueo de la vía de síntesis de cloranfenicol se establecieron las mismas condiciones de cultivo que para la cepa WT, y de la cinética de crecimiento a las 48 y 120 h se separó biomasa del sobrenadante, para que a partir de los sobrenadantes se realizara la extracción de compuestos y se analizaran por UPLC-MS, lo cual indicó que el cloranfenicol no es producido por la cepa a las 48 h, y tampoco a las 120 h, como se esperaba tras la interrupción del gen *cmIH*.

Posteriormente, tanto *S. venezuelae* $\Delta cmIH$, como *S. venezuelae* WT, se evaluaron como hospederos para realizar expresión heteróloga. Para este fin, se decidió expresar un alquilresorcinol que es producido por un microorganismo endófito del género Actinoplanes, sp. TFC3, que al igual que los estreptomicetos se encuentra dentro del filo de las Actinobacterias, perteneciente a las PKSIII (policétidos sintasas tipo III), y que se ha demostrado que presenta actividad antioxidante. Esto se demostró tras su expresión al clonar el gen que codifica para dicha molécula, *alkA*, en el plásmido pIJ6902. La construcción pIJ6902/*alkA* fue conjugada y expresada en el hospedero de *S. coelicolor* M1152. La expresión de *alkA* en este sistema fue regulada por thioestreptón (Jiménez R., datos no publicados).

De modo que para evaluar la expresión heteróloga de *alkA* en *S. venezuelae* WT y en *S. venezuelae* $\Delta cmIH$ se utilizó dicha construcción, la cual se conjugó con esporas de las cepas antes mencionadas. La selección de transformantes se realizó por resistencia a apramicina y por PCR de colonia, obteniéndose colonias positivas tanto para *S. venezuelae* WT como para *S. venezuelae* $\Delta cmIH$, por lo que se realizó un cultivo de cada cepa en medio MYM en presencia y en ausencia de thioestreptón.

A partir de las biomasas se realizó la extracción de sus compuestos, los cuales fueron analizados mediante un método colorimétrico para la detección de alquilresorcinoles y su capacidad antioxidante por cromatografía en capa fina (Blainski *et al.*, 2013; Jiménez R, datos no publicados; Segura *et al.*, 2009; Tluscik *et al.*, 1981). Sin embargo, no se observó la expresión de *alkA* en los extractos a pesar de haber llevado a cabo el mismo método de detección utilizado cuando se

expresó en M1152 por el M. en C. Jiménez R. del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

En el trabajo antes mencionado, a partir de la cepa M1152 con la construcción pIJ6902/*alkA* se realizó un pre-inóculo en medio TSB-YEME, y posteriormente se incubó en medio GYM antes de llevar a cabo la extracción de los compuestos producidos, ya que estas fueron las condiciones utilizadas durante los ensayos de expresión heteróloga realizados por Gómez-Escribano y Bibb en 2011. A diferencia de este trabajo, las cepas *S. venezuelae* WT y *S. venezuelae* Δ *cmlH* fueron incubadas en medio MYM antes de llevar a cabo la extracción de los compuestos, sin haber realizado un pre-inóculo previo, se realizó de esta manera debido a que es el medio de cultivo de rutina en el que se ha observado que ambas cepas crecen y esporulan adecuadamente (Shepherd *et al.*, 2010). Se ha reportado que los medios de cultivo utilizados y la fase de crecimiento de las cepas puede influir durante la síntesis de los metabolitos secundarios (Gómez-Escribano y Bibb, 2011; Kieser *et al.*; 2000), esta podría ser la razón por la cual no se detectó la expresión de *alkA* en *S. venezuelae* WT y en *S. venezuelae* Δ *cmlH*. Por lo que sería necesario probar otras condiciones de expresión y detección para ser evaluarlos como hospederos, por ejemplo, aquellas establecidas por Gómez-Escribano y Bibb en 2011.

Adicionalmente, se realizó un análisis bioinformático introduciendo el genoma de *S. venezuelae* ATCC10712 al programa AntiSmash, el cual fue desarrollado para predecir clústeres potenciales para la producción de metabolitos secundarios como policétidos, péptidos no ribosomales, terpenos, aminoglucósidos, lantibióticos, bacteriocinas, betalactámicos, butirrolactonas, entre otras moléculas, dentro de un genoma bacteriano o fúngico (Medema *et al.*, 2011). Los resultados del análisis sugieren que el genoma de *S. venezuelae* contiene 30 clústeres para la producción de metabolitos secundarios. De los cuales, 10 regiones genómicas mostraron un 100% de similitud con clústeres contenidos en la base de datos, las cuales codifican para moléculas como la ectoína, geosmina, cloranfenicol, moléculas de tipo alquilresorcinol, entre otras. El resto de las regiones genómicas identificadas como

clústeres potenciales presentan un menor porcentaje de similitud con otros clústeres contenidos en la base de datos de AntiSmash.

Durante el desarrollo de cepas hospederas se ha demostrado que al deletar más de una vía de síntesis es posible obtener cantidades mayores de metabolitos expresados de manera heteróloga, así como perfiles cromatográficos más limpios, lo cual puede facilitar la identificación y caracterización de nuevos compuestos (Gómez-Escribano y Bibb, 2011; Myronovski *et al.*, 2018;). Por lo que haciendo uso de los datos obtenidos en el programa AntiSmash, conociendo la variedad de metabolitos secundarios producidos por *S. venezuelae* y su localización en el genoma, se pueden visualizar nuevas vías de síntesis por interrumpir en *S. venezuelae* $\Delta cmlH$ para el mejoramiento de la cepa como hospedero para la síntesis de metabolitos secundarios expresados de manera heteróloga.

9. Conclusiones

Tras corroborar las condiciones y la capacidad de producción del cloranfenicol en *S. venezuelae* ATCC 10712 se llevaron a cabo ensayos de mutagénesis dirigida y recombinación homóloga que permitieron obtener la cepa $\Delta cmlH$ no productora de cloranfenicol en medio GI.

La interrupción del gen *cmlH* provocó la pérdida de la actividad antibiótica de la mutante y no afectó la tasa de crecimiento de *S. venezuelae* bajo las condiciones de producción del cloranfenicol.

La cepa $\Delta cmlH$ no logró ser evaluada como sistema de expresión heteróloga para la molécula de alquilresorcinol expresada por *alkA*, por lo que sería necesario probar otras condiciones de expresión y detección, u otra molécula, para evaluar a la cepa como hospedero.

Expresar y detectar el producto del gen *alkA* en *S. venezuelae* WT y *S. venezuelae* $\Delta cmIH$.

Cuantificar y comparar la producción del alquilresorcinol producido por *alkA* entre ambas cepas.

Evaluar a la mutante $\Delta cmIH$ como sistema de expresión de otros metabolitos.

Interrumpir otras vías de producción de metabolitos secundarios en la mutante $\Delta cmIH$.

11. Literatura citada

Baltz R. (2008). Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. *Curr Opin Pharmacol.* 8(5): 557-563. doi: 10.1016/j.coph.2008.04.008.

Baltz R. (2010). *Streptomyces* and *Saccharopolyspora* hosts for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *J Ind Microbiol B.* 37: 759-772. Doi: 10.1007/s10295-010-0730-9

Blainski A, Lopes G, Palazzo J. (2013). Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules.* 18: 6852-6865. doi:10.3390/molecules18066852.

Challis G. (2008). Genome mining for novel natural product discovery. *J Med Chem.* 51(9): 2618-28. doi: 10.1021/jm700948z.

Chatterjee S, Vining LC. (1982). Nutritional requirements for chloramphenicol biosynthesis in *Streptomyces venezuelae*. *Canadian J Microbiol.* 29(2): 247-253. doi: 10.1139/m83-041.

Datsenko K, Wanner B. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97, 6640- 6645.

Demain A, Fang A. (2000). The natural functions of secondary metabolites. *History of Modern Biotechnology I.* Vol. 69 of the series *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* pp 1-39.

Demain A, Gómez-Ortiz B, Ruiz-Villafán B, Rodríguez-Sanoja R, Sánchez S. (2019). Recent findings of molecules with anti-infective activity: Screening of non-conventional sources. *Curr Opin Pharmacol.* 48: 40-47. doi: 10.1016/j.coph.2019.04.003.

Demain A, Sánchez S. (2009). Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J Antibiot (Tokyo)*. 62(1): 5-16. doi: 10.1038/ja.2008.16.

Enany S. (2018). Basic Biology and Applications of Actinobacteria. IntechOpen. Chapter 6. 99-122. doi: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.79890>.

Fan K, Pan G, Peng X, Zheng J, Gao W, Wang J, *et al.*, (2012). Identification of JadG as the B ring opening oxygenase catalyzing the Oxidative C-C bond cleavage reaction in Jadomycin biosynthesis. *Chem Biol*. 19, 1381-1390. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.09.009>.

Fernández-Martínez L, Borsetto C, Gómez-Escribano J, Bibb M, Al-Bassam M, Chandra G, Bibb M. (2014). New Insights into chloramphenicol biosynthesis in *Streptomyces venezuelae* ATCC 10712. *Antimicrob Agents Chemother*. 58(12): 7441-7450. doi:10.1128/AAC.04272-14.

Gómez-Escribano J, Bibb M. (2011). Engineering *Streptomyces coelicolor* for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *Microb Biotechnol*. 4(2): 207-215. doi:10.1111/j.1751-7915.2010.00219.x.

Gómez-Escribano J, Bibb M. (2012). *Streptomyces coelicolor* as an expression host for heterologous gene clusters. *Methods Enzymol*. 517: 279-300. doi: 10.1016/B978-0-12-404634-4.00014-0.

Gust B, Kieser T and Chater K. (2002). PCR targeting system in *Streptomyces coelicolor* A3(2) B John Innes Centre, Norwich Research Park, Colney, Norwich NR47UH, UK.

He J, Magarvey N, Pirae M, Vining LC. (2001). The gene cluster for chloramphenicol biosynthesis in *Streptomyces venezuelae* ISP5230 includes novel shikimate pathway homologues and a monomodular non-ribosomal peptide synthetase gene. *Microbiology*. 147(Pt 10): 2817-29. doi:10.1099/00221287-147-10-2817.

Jiménez R, (En proceso). Expresión heteróloga y caracterización de un policétido tipo III de *Actinoplanes* sp. TFC3 (Tesis de maestría). Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Jung W, Lee S, Hong J, Park S, Jeong S, Han A, *et al.* (2006). Heterologous expression of tylosin polyketide synthase and production of a hybrid bioactive macrolide in *Streptomyces venezuelae*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 72: 763- 769. doi: 10.1007/s00253-006-0318-5.

Kieser, T, Bibb M, Buttner M, Chater K, Hopwood D. (2000). *Practical Streptomyces Genetics*. The John Innes Foundation; Norwich, England.

Kim E, Yang I, Yoon Y. (2015). Developing *Streptomyces venezuelae* as a cell factory for the production of small molecules used in drug discovery. Arch Pharm Res. 38: 1606-1616. doi: 10.1007/s12272-015-0638-z.

Komatsu M, Komatsu K, Koiwai H, Yamada Y, Kozone I, Izumikawa M, *et al.* (2013). Engineered *Streptomyces avermitilis* host for heterologous expression of biosynthetic gene cluster for secondary metabolites. ACS Synth Biol. 2(7): 384–396. doi:10.1021/sb3001003.

Komatsu M, Uchiyama T, Omura S, Cane D, Ikeda H (2010). Genome- minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism. PNAS. 7 (6): 2646-2651.

Lee N, Kim W, Hwang S, Lee Y, Cho S, Palsson B *et al.*, (2020). Thirty complete *Streptomyces* genome sequences for mining novel secondary metabolite biosynthetic gene clusters. Scientific Data. 7:55. doi: <https://doi.org/10.1038/s41597-020-0395-9>.

Liu Y, Kyle S, Straight P. (2018). Antibiotic stimulation of a *Bacillus subtilis* migratory response. mSphere. 3: 1-13.

Lopatniuk M, Ostash B, Luzhetskyy A, Walker S, Fedorenko V. (2014). Generation and study of the strains of streptomycetes- heterologous hosts for production of moenomycin. Russ J Genet. 50(4): 360-365. doi:10.1134/S1022795414040085.

Moore S, Lai HE, Needham H, Polizzi K, Freemont P. (2017). *Streptomyces venezuelae* TX-TL- a next generation cell-free synthetic biology tool. Biotechnol J. 12, 1600678: 1-6. doi: 10.1002/biot.201600678.

Lorian V. (2005). Antibiotics in laboratory medicine. Fifth edition, USA: Lippincott Williams & Wilkins. Chapter 12. p. 551.

Medema M, Blin K, Cimermancic P, Jager V, Zakrzewski P, Fischbach M, *et al.*, (2011). antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthetic gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. Nucleic Acids Res. 39, Web Server issue W339–W346. doi:10.1093/nar/gkr466.

Myronovskyi M, Rosenkränzer B, Nadmid S, Pujic P, Normand P, Luzhetskyy. (2018). Generation of a cluster-free *Streptomyces albus* chassis strains for improved heterologous expression of secondary metabolite clusters. Metabol Eng. doi.org/10.1016/j.ymben.2018.09.004.

Romero-Rodríguez, A., Ruiz-Villafán, B., Tierrafría, V., Rodríguez-Sanoja, R. and Sánchez S. (2016) Carbon catabolite regulation of secondary metabolite formation and morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor*. Appl Biochem Biotechnol. 180(6): 1152-1166. doi: 10.1007/s12010-016-2158-9.

Sánchez S, Demain A. (2015). Antibiotics. Current Innovations and Future Trends. Caister academic press, Norfolk, UK. British library cataloguing-in-publication data. 1-48.

Segura D, Vite O, Romero Y, Moreno S, Castañeda M, Espín G. (2009). Isolation and characterization of *Azotobacter vinelandii* mutants impaired in alkylresorcinol synthesis: alkylresorcinols are not essential for cyst desiccation resistance. J Bacteriol. 191(9): 3142-3148.

Shepherd M, Kharel M, Bosserman M, Rohr J. (2010). Laboratory maintenance of *Streptomyces* species. Curr Protoc Microbiol. Unit-10E.1, 1-10. doi: 10.1002/9780471729259.mc10e01s18.

Tluscik F, Kozubek A, Mejbaum-Katzenellenbogen. (1981). Alkylresorcinols in rye (*Secale cereale* L.) grains. VI. Colorimetric micromethod for the determination of alkylresorcinols with the use of diazonium salt, Fast Blue B. Acta Soc Bot Pol. 50: 645-651.

Tracanna V, Jong A, Medema M, Kuipers O. (2017). Mining prokaryotes for antimicrobial compounds: from diversity to function. FEMS Microbiol Rev. doi: 10.1093/femsre/fux014.

Tschowri N. (2016). Cyclic dinucleotide-controlled regulatory pathways in *Streptomyces* Species. J Bacteriol. 198(1): 47-54. doi:10.1128/JB.00423-15.

Voff J.-N. y Altenbuchner J. (1998). MicroReview. Genetic instability of the *Streptomyces* chromosome. Mol Microbiol. 27 (2), 239-246.

Wang y Jin. (2014). Crucial factor for increasing the conjugation frequency in *Streptomyces netropsis* SD-07 and other strains. FEMS Microbiol Lett. 357, 99-103.

Yin S, Li Z, Wang X, Wang H, Jia X, Ai G, *et al.*, (2016). Heterologous expression of oxytetracycline biosynthetic gene cluster in *Streptomyces venezuelae* WVR2006 to improve production level and to alter fermentation process. Appl Microbiol Biotechnol. 100:10563–10572. doi: 10.1007/s00253-016-7873-1.

12. Apéndice

Medios de cultivo

Medio MYM (Maltose- Yeast Extract- Malt Extract), para esporulación de *S. venezuelae*

Para 1000 ml:

Maltosa	4 g
Extracto de levadura	4 g
Extracto de malta	10 g
50/50	H ₂ O destilada, H ₂ O de la llave

Agregar 0.002 volúmenes de elementos traza R2 (Para 35 ml agregar 70 µl)

Elementos traza:

ZnCl ₂	40 mg
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	200 mg
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	10 mg
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	10 mg
Na ₂ B ₄ O ₇ · 10 H ₂ O	10 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O	10 mg

Disolver en 100 ml de H₂O destilada para tener una concentración final 10X y esterilizar por filtración

Ajustar pH 7.3 y esterilizar en autoclave

Medio GI (Glucosa 3%- Isoleucina 0.75%- Sales basales), para producción de cloranfenicol en *S. venezuelae*

Para 1000 ml:

Sales basales:

MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.2 g
KH ₂ PO ₄	4.5 g
K ₂ HPO ₄	10.5 g
NaCl	90 mg
CaCl ₂	90 mg

ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	4 mg
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	9 mg
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.18 mg
MnSO ₄	0.03 mg
H ₃ BO ₃	0.02 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O	0.02 mg

Isoleucina 7.5 g

Disolver en H₂O destilada

Glucosa 15 % 10 ml por cada 50 ml de medio

La solución de sales e isoleucina y la glucosa se esterilizan por separado para evitar la reacción de Maillard

Medio LB (Luria Bertani), para crecimiento de *E. coli*

Para 100 ml:

Extracto de levadura	0.5 g
Triptona	1.0 g
NaCl	0.5 g
Agar	1.5 g

Ajustar pH 7.2 y esterilizar en autoclave

Medio TSB (Tryptic Soy Broth), para crecimiento de *M. luteus*

Para 100 ml:

Caldo de soya tripticasa	0.5 g
Agar	1.5 g

Medio YeNB, para células electrocompetentes y crecimiento de *E. coli*

Para 100 ml:

Extracto de levadura	0.75 g
Caldo nutritivo	0.8 g

Medio SOC, para fines de transformación

Para 100 ml:

Extracto de levadura	0.5 g
Triptona	2.0 g
NaCl	0.5 g
KCl	0.018 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.246 g
Glucosa	20 mM

Medio GS (Gause's Synthetic Agar), para fines de conjugación

Para 1000 ml:

Almidón soluble	20 g
NaCl	0.5 g
FeSO ₄	0.01 g
KNO ₃	1.0 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄	0.5 g
Agar	15 g

Ajustar pH 7.3 y esterilizar en autoclave

Agregar CaCl₂ 60 mM

Soluciones

Glicerol 20 %, para cosecha de esporas

Para 100 ml:

Glicerol	20 ml
----------	-------

Disolver en H₂O destilada y esterilizar en autoclave

Solución salina 0.85 %, para cosecha de esporas, pruebas de bioautografía, cinéticas de crecimiento y extracción de ADN genómico

Para 100 ml:

NaCl	0.85 g
------	--------

Disolver en H₂O destilada y esterilizar en autoclave

Solución 0.5 McFarland (solución estándar, equivalente a 1.5×10^8 células por ml³)

Para 100 ml:

Ácido sulfúrico 0.18 M	99.5 ml
Cloruro de bario 0.048 M	0.5 ml

Glicerol 10 %, para células electrocompetentes

Para 100 ml:

Glicerol	10 ml
----------	-------

Disolver en H₂O destilada y esterilizar en autoclave

CaCl₂ 2.5 M, para fines de conjugación

Para 10 ml:

CaCl ₂	2.77 g
-------------------	--------

Disolver en H₂O destilada y esterilizar por filtración

Glicina 10 %, para extracción de ADN genómico

Para 100 ml:

Glicina	10 g
---------	------

Disolver en H₂O destilada y esterilizar en autoclave

Sacarosa 10.3 %, para extracción de ADN genómico

Para 100 ml:

Sacarosa	10.3 g
----------	--------

Disolver en H₂O destilada y esterilizar en autoclave

Buffer P, para extracción de ADN genómico

Para 1000 ml:

Sacarosa	103 g
K ₂ SO ₄	0.25 g
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	2.02 g
Elementos traza	2 ml
H ₂ O destilada	800 ml

Hacer alícuotas de 80 ml y esterilizar en autoclave

Antes de utilizar una alícuota de buffer P añadir:

KH ₂ PO ₄ 0.5%	1 ml
CaCl ₂ · 2 H ₂ O 3.68%	10 ml
Amortiguador TES pH 7.2 5.73%	10 ml

SDS (dodecilsulfato sódico) 10 %, para extracción de ADN genómico

Para 100 ml:

SDS	10 g
-----	------

Disolver en H₂O destilada y esterilizar en autoclave

NaCl 6 M, para extracción de ADN genómico

Para 100 ml:

NaCl	35.06 g
------	---------

Disolver en H₂O destilada y esterilizar en autoclave

Etanol 70 %, para extracción de ADN genómico

Para 100 ml:

Etanol	70 ml
--------	-------

Disolver en H₂O destilada

Solución Fast Blue B, para detección de AlkA

Fast blue B (0.5 %)	0.25 g
Ácido acético	2.5 ml
H ₂ O destilada	47.5 ml

Almacenar en frasco ámbar a 4° C

Folin Ciocalteau, para detección de AlkA

Spray I: 20% Na₂CO₃ acuoso, dejar secar

Spray II: Dilución 1:3 Folin Ciocalteau en H₂O destilada

Diagrama A1. Estrategia experimental para el diseño y construcción de un hospedero para expresión heteróloga de clústeres de metabolitos secundarios a partir de *S. venezuelae* ATCC 10712.

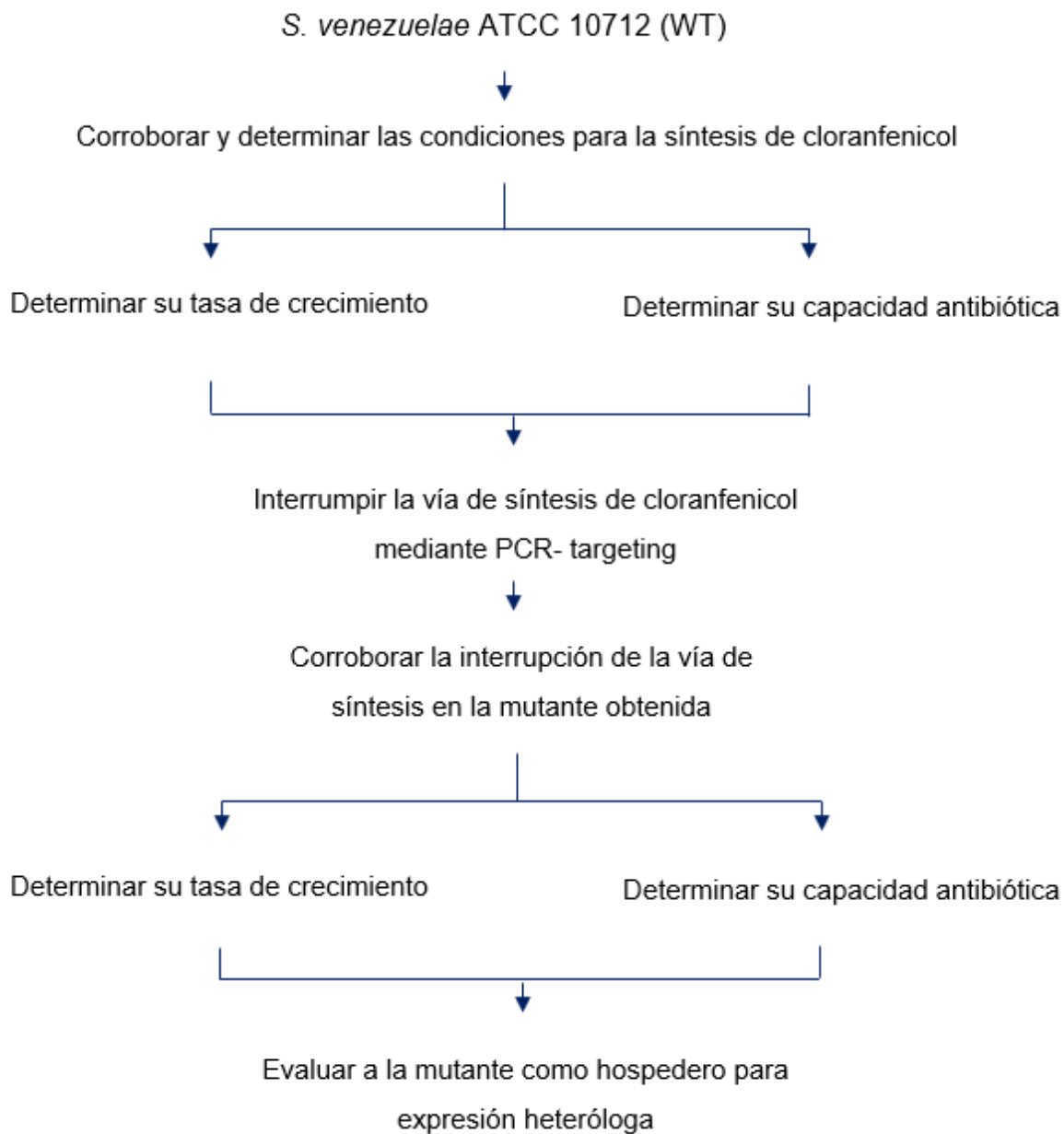


Diagrama A2. Estrategia experimental para interrumpir la vía de síntesis de cloranfenicol por PCR-targeting en *S. venezuelae*.

