

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA.  
IZTAPALAPA**



**Mutagénesis de los genes SAV2511 y SAV2513 en *Streptomyces avermitilis*: efectos  
en la morfología y producción de avermectina y oligomicina**

**TESIS**

**Para obtener el grado de:  
Doctor en Biotecnología**

**PRESENTA**

**Octavio Godínez Maravilla**

**Tutor**

**Dr. Armando Mejía Álvarez**

**Asesores**

**Dr. Paul Dyson**

**Dr. Javier Barrios González**

México, D. F., a 25 de octubre de 2016

El jurado designado por la división de Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAM-Iztapalapa aprobó la tesis: **Mutagénesis de los genes SAV2511 y SAV2513 en *Streptomyces avermitilis*: efectos en la morfología y producción de avermectina y oligomicina.**

que presentó:  
**Octavio Godínez Maravilla**

**Comité tutorial:**

**Tutor:**

**Dr. Armando Mejía Álvarez**

**Asesores:**

**Dr. Paul Dyson**

**Dr. Javier Barrios González**

**Jurado:**

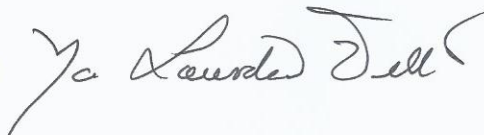
**Presidente: Dr. Javier Barrios González**



**Secretario: Dr. Octavio Loera Cortés**



**Vocal: Dra. Lourdes Villa Tanaca**



**Vocal: Dr. Francisco Fierro Fierro**





Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa

Fecha : 03/11/2016

Página : 1/1

### CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO

La Universidad Autónoma Metropolitana extiende la presente CONSTANCIA DE PRESENTACION DE DISERTACIÓN PÚBLICA de DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA del alumno OCTAVIO GODINEZ MARAVILLA, matrícula 204381890, quien cumplió con los 226 créditos correspondientes a las unidades de enseñanza aprendizaje del plan de estudio, 45 créditos de PUBLICACION, 90 créditos de EXAMEN PREDOCTORAL y 45 créditos de EXAMEN PREDOCTORAL. Con fecha tres de noviembre del 2016 presentó la DEFENSA de su DISERTACIÓN PÚBLICA cuya denominación es:

MUTAGÉNESIS DE LOS GENES SAV2511 y SAV2513 EN *Streptomyces avermitilis*: EFECTOS EN LA MORFOLOGÍA Y PRODUCCIÓN DE AVERMECTINAS Y OLIGOMICINA.

Cabe mencionar que la aprobación tiene un valor de 45 créditos y el programa consta de 451 créditos.

El jurado del examen ha tenido a bien otorgarle la calificación de:

Aprobar

### JURADO

Presidente

DR. JAVIER BARRIOS GONZALEZ

Secretario

DR. OCTAVIO LOERA CORRAL

Vocal

DR. FRANCISCO FIERRO FIERRO

Vocal

DRA. MARIA DE LOURDES VILLA TANACA

**EL DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
METROPOLITANA PERTENECE AL PADRON NACIONAL DE POSGRADOS DE  
EXCELENCIA DEL CONACyT.**

**ESTA TESIS CORRESPONDE A LOS ESTUDIOS REALIZADOS CON UNA BECA  
OTORGADA POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA CON  
NÚMERO DE REGISTRO 163988 Y POR LA COMISIÓN EUROPEA CON NÚMERO DE  
REGISTRO AML/B7-311/97/0666/II-0313-FAF**

**EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y METABOLISMO SECUNDARIO DEL DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA, PERTENECIENTE A LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD, EN LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA Y EN INSTITUTE OF LIFE SCIENCE, COLLEGE OF MEDICINE, SWANSEA UNIVERSITY. UK.**

México, D. F., a 25 de octubre de 2016

El jurado designado por la división de Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAM-Iztapalapa aprobó la tesis: **Mutagénesis de los genes SAV2511 y SAV2513 en *Streptomyces avermitilis*: efectos en la morfología y producción de avermectina y oligomicina.**

que presentó:  
**Octavio Godínez Maravilla**

**Comité tutorial:**

**Tutor:**  
**Dr. Armando Mejía Álvarez**

**Asesores:**  
**Dr. Paul Dyson**  
**Dr. Javier Barrios González**

**Jurado:**

**Presidente: Dr. Javier Barrios González**

**Secretario: Dr. Octavio Loera Corral**

**Vocal: Dra. Lourdes Villa Tanaca**

**Vocal: Dr. Francisco Fierro Fierro**

## **AGRADECIMIENTOS.**

A mis Padres Mario y Graciela, mi hermana Lorena, mi cuñado Jorge y mi sobrina Graciela.  
Mi esposa Ana María y mi hijo Ivan. Su apoyo fue decisivo para la conclusión de este proyecto.

Para todos mis maestros involucrados en el proyecto.

A mis amigos: Armando, Raul, Lorena y Jaime

Working Group of Wales: Paul, Ricardo, Lorena, Sandra, Sue, Greg, Lindsay, Meirwyn, Simon, Owen, Christian, Bhavesh. Thank you for all!

Mis compañeros del laboratorio de metabolismo secundario, en especial Omar, por tu ayuda incondicional; Karla y Marisol su ayuda fue importante en el proyecto.

A todas las instituciones por la ayuda recibida.

Para el Laboratorio de Poliovirus del InDRE: Edith, Benita, Karen, Brenda, Ana María, Alejandra, Katy, Hilda, Alfredo, Marco Antonio, Jaime y Raul.

Y a todas las personas, instituciones y universidades que me brindaron su apoyo.

|||||||Gracias!!!!!!!!!!!!!!

## Resumen.

La transición del metabolismo primario al secundario en especies productoras de antibióticos *Streptomyces*, se encuentra correlacionado con la expresión de genes involucrados en la respuesta hacia el estrés osmótico. Como consecuencia las vías que regulan respuestas específicas hacia el estrés son puntos clave hacia la manipulación para incrementar la producción de antibióticos. En este trabajo, se investigan genes que codifican proteínas implicadas en la regulación de la respuesta hacia el estrés osmótico en *Streptomyces avermitilis*, bacteria productora de avermectina. La interrupción de SAV2511 que codifica a una proteína de la regulación de la respuesta y SAV2513 el cual codifica a un multidominio regulador del factor alternativo sigma (SigB), conduce al incremento en la producción tanto de avermectina como de oligomicina por encima del 37% y el 200% respectivamente. De igual manera, la mutación afecta el desarrollo morfológico bajo condiciones de estrés osmótico, y las mutantes son incapaces de formar micelio aéreo. La información presentada reveló datos sobre la respuesta regulatoria hacia el estrés, la cual puede ser considerada en el mejoramiento de las cepas para un mayor rendimiento de estos metabolitos secundarios. Adicionalmente, se reportan las condiciones de la técnica de biobalística, método de introducción de DNA, para este tipo de microorganismos.

*Palabras clave: Biosíntesis de antibióticos, Streptomyces, respuesta al estrés, avermectinas, oligomicina.*



**Abstract.**

The transition from primary to secondary metabolism in antibiotic-producing *Streptomyces* is correlated with expression of genes involved in stress responses. Consequently, regulatory pathways that regulate specific stress responses are potential targets to manipulate to increase antibiotic titres. In this study, genes encoding key proteins involved in regulation of the osmotic stress response in *Streptomyces avermitilis*, the industrial producer of avermectins, are investigated. Disruption of either *osaBSa*, encoding a response regulator protein, and *osaCSa*, encoding a multidomain regulator of the alternative sigma factor SigB, led to increased production of both oligomycin, by up to 200 %, and avermectin, by up to 37 %. The mutations also conditionally affected morphological development; under osmotic stress, the mutants were unable to erect an aerial mycelium. The data reveal that information on stress regulatory responses can be integrated in rational strain improvement to improve yields of these bioactive secondary metabolites. In addition, the conditions to DNA delivery into a streptomycete using biolistic are reported.

*Keywords: antibiotic biosynthesis, Streptomyces; stress responses; avermectin, oligomycin.*

## TABLA DE CONTENIDO.

1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 Aspectos generales de los actinomicetos .....	11
1.2 Metabolismo secundario. Importancia económica.....	13
1.3 Metabolismo secundario en <i>S. avermitilis</i> . Avermectinas y Oligomicina.....	14
1.3.1 Mecanismo de acción de las avermectinas.....	14
1.3.2 Características del cluster biosintético de avermectina. Síntesis.....	15
1.4 Características del <i>cluster</i> biosintético de oligomicina. Síntesis.....	19
1.4.1 Mecanismo de acción de la oligomicina.....	19
1.5 Modificaciones a los policétidos. ....	20
1.6 Sistemas de dos componentes.....	20
1.7 Uso de metodologías. Transposones.....	21
1.8 Antecedentes.....	22
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	24
4. HIPÓTESIS .....	25
3. OBJETIVOS.....	26
5. MATERIALES Y MÉTODO .....	27
5.1. Medios de cultivo y soluciones.....	28
5.2. Aislamiento y amplificación de los genes de interés.....	30
5.2.1 Clonación de SAV2513 en pME6.....	31
5.2.2 Clonación de SAV2511 en pME6.....	34
5.3 Introducción de los plásmidos pMBTn2 y pMCTn1 en la cepa parental de <i>S. avermitilis</i> .....	36
5.3 1. Transformación de <i>E. coli</i> .....	36
5.3.2 Conjugación.....	36
5.2.3 Biobalística.....	37
5.2.3.1 Preparación de los microcarries.....	37
5.2.3.2 Revestimiento de los microcarriers de tungsteno con DNA.....	37
5.2.4.3 Bombardeo.....	38
5.3. Determinación de la interrupción de SAV2511 y SAV2513.....	39
5.3.1 Hibridación <i>Southern Blot</i> . ....	39

5.3.2 Evaluación bajo condiciones de estrés osmótico.....	42
5.4 Determinación de la producción de avermectinas.....	42
5.4.1 Medio de Semilla y de Producción.....	42
5.4.3 Evaluación de Avermectinas. HPLC.....	44
5.5 Determinación de la producción de oligomicina.....	44
5.5.1 Evaluación de oligomicina. Condiciones de cultivo.....	44
5.5.2 Evaluación de oligomicina. Bioensayo con <i>A. niger</i> (A10).....	45
5.6 Complementación cruzada de las mutantes.....	45
6. RESULTADOS.....	46
6.2 Determinación de la interrupción del gene <i>SAV2511</i> . <i>Southern Blot</i> .....	46
6.2.1 Determinación de la interrupción del gene <i>SAV2511</i> . PCR.....	47
6.3 Determinación de la interrupción del gene <i>SAV2513</i> . PCR.....	48
6.4 Evaluación de la interrupción de $\Delta$ <i>SAV2511</i> y $\Delta$ <i>SAV2513</i> en condiciones de estrés osmótico.....	49
6.5 Bioensayo de <i>Artemia salina</i> con el producto de fermentación de $\Delta$ <i>SAV2511</i> . Curva patrón de avermectinas.....	50
6.5 Bioensayo con <i>Aspergillus niger</i> (A10) con los productos de fermentación de $\Delta$ <i>SAV2511</i> y $\Delta$ <i>SAV2513</i> .....	52
6.6 Cuantificación de oligomicina a partir de productos de fermentación por HPLC.....	53
6.7 Determinación de la producción de avermectina mediante HPLC.....	54
6.8 Complementación cruzada de los genes $\Delta$ <i>SAV2511</i> y $\Delta$ <i>SAV2513</i> .....	56
7. DISCUSIÓN.....	57
8. CONCLUSIONES.....	63
9. PERSPECTIVAS.....	63
10. BIBLIOGRAFÍA.....	64

## 1. INTRODUCCIÓN

*Streptomyces* es un género de bacterias que habitan en una gran variedad de ambientes marinos y terrestres (Kieser *et al.* 2000). Su diferenciación morfológica involucra la formación de un micelio y esporas, proceso semejante a los hongos (Talbot 1999; Elliot *et al.* 2004). Esta característica es única entre las bacterias Gram positivas, requiriendo un metabolismo especializado y coordinado. Sin embargo, lo más sobresaliente es su capacidad para producir metabolitos secundarios usados en la industria y medicina como antiparasitarios, antitumorales, antifúngicos, antivirales, antihipertensivos, antibióticos e inmunosupresores (Vicente *et al.* 2014; Bibb y Mervin 2005; Bullock *et al.* 1961; Ikeda *et al.* 2014; Burg *et al.* 1979; Egerton *et al.* 1979). Se ha reportado que ambos procesos (diferenciación-metabolismo secundario) se encuentran relacionados (Bibb y Mervin 2005; Sevcikova y Kormanec 2004), en ello se ve involucrada la expresión de genes, los cuales son generalmente activados en la fase estacionaria (Thomas *et al.* 2012). La expresión de estos genes está controlada por una compleja cascada de mecanismos regulatorios, lo que determinará el o los metabolitos que se sintetizarán (Ikeda *et al.* 2014). Generalmente estos genes están localizados en *clusters*, grupo de dos o más genes que están sometidos a una regulación específica, lo que hace que un determinado metabolito se sintetice en un momento concreto durante el metabolismo secundario (Ikeda *et al.* 2003; Ikeda *et al.* 2014). Sin embargo, existen otros genes fuera del *cluster* y que igualmente están involucrados en la diferenciación y metabolismo secundario, cuyos productos tienen un papel importante en la vida del hombre (Ikeda *et al.* 2003). La importancia económica de estos productos ha llevado a ampliar el conocimiento sobre el papel que tienen los genes en el metabolismo global, logrando avances como el secuenciamiento de genomas completos (Bentley *et al.* 2002; Bekker *et al.* 2014). Entre otras investigaciones, el desarrollo de este conocimiento ha permitido proponer dos mecanismos regulatorios en especies de *Streptomyces*: a) cascada piramidal de regulación, la cual involucra una vía asociada a proteínas reguladoras y b) reguladores globales relacionados a señales de

estrés (Lee *et al.* 2005; Letunic *et al.* 2012). Estos últimos son frecuentemente sistemas de dos componentes, los cuales consisten de una proteína sensora y otra de regulación de la respuesta (de Been *et al.* 2011). La importancia de estudiar este sistema, radica en que está involucrado en el metabolismo secundario incluyendo el de los antibióticos (de Been *et al.* 2011). El presente trabajo se enfoca en este segundo sistema de regulación, concretamente en el papel que tienen los genes *SAV2511* y *SAV2513* en la producción del antiparasitario avermectina y el antitumoral oligomicina, empleando la técnica de mutagénesis por transposones.

### 1.1 Aspectos generales de los actinomicetos

Las especies de *Streptomyces* exhiben un ciclo de vida complejo, el cual involucra la formación de un micelio terrestre y un micelio aéreo, con la posterior formación de grupos de esporas (Lamb *et al.* 2003). Sin embargo, debido al estilo de vida saprofita de los actinomicetos, estos tienen que sortear diversas situaciones, siendo de gran relevancia el tener una adecuada concentración de enzimas extracelulares capaz de degradar (poner a disposición) los nutrientes insolubles de su medio ambiente. Esto lo han logrado desarrollando micelio vegetativo, que les sirve tanto de anclaje, como para captar los nutrientes necesarios. A su vez, este sistema les impide poder desplazarse a otros nuevos nichos; sin embargo, esto se compensa mediante el sistema de dispersión por medio de esporas (Ou *et al.* 2008) las cuales son formadas en el llamado micelio aéreo; esto lleva a la colonia a tener una apariencia blanca y posteriormente un gris oscuro (Elliot *et al.* 2004). El ciclo de vida de los actinomicetos se resume en la figura 1 (Schauer *et al.* 1988; Schauer *et al.* 1991).

Fig. 1

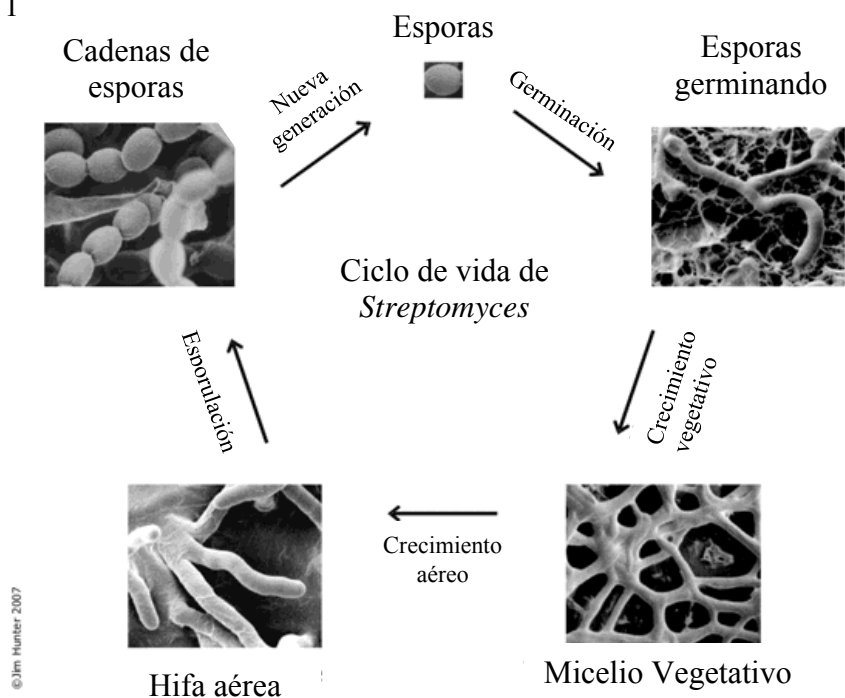


Fig. 1. Ciclo de vida de *Streptomyces coelicolor*. A partir de una espora, su germinación da paso al crecimiento vegetativo, con la posterior formación del micelio aéreo; posteriormente se segmentará para formar compartimentos individuales, finalizando con la formación de nuevas esporas. (Schauer *et al.* 1988; Schauer *et al.* 1991).

Estos procesos están altamente regulados e involucran vías metabólicas específicas, siendo uno de estos ejemplos el de los metabolitos secundarios (Bullock *et al.* 1961). La iniciación del metabolismo secundario ocurre cuando la tasa de crecimiento disminuye y es acompañada por la transición morfológica del micelio vegetativo hacia la formación de la hifa aérea. La diferenciación morfológica -simultáneamente con la fisiológica- conduce a la síntesis de una multitud de metabolitos secundarios, muchos de ellos con importancia en la industria y en medicina (Omura 2001 y Patzer 2010). Ambos procesos están asociados en respuesta al estrés del medio ambiente (Sevcikova y Kormanec. 2004). Para captar estos cambios utilizan una variedad de sistemas, los cuales incluyen: metabolitos secundarios, iones ( $Fe^{2+}$ ) y proteínas (proteína reguladora del catabolito, CRP); sin embargo, son los sistemas de dos componentes los más ampliamente utilizados para la transducción de las señales (Stock *et al.* 2000; Hoch y Silhavy 1995).

Otro proceso regulatorio es la presencia de elementos de transcripción denominados factores sigma (Gruber y Gross 2003).

## 1.2 Metabolismo secundario. Importancia económica

No es del todo claro el papel biológico que cumplen los metabolitos secundarios, se ha propuesto la teoría que pueden desempeñar un papel de la protección de la colonia contra otros microorganismos invasores cercanos a ella (Waksman y Woodruff 1940) o una alternativa al estrés metabólico causado por intermediarios de las diferentes rutas del metabolismo primario (Bullock *et al.* 1961). Sin embargo, sea cual sea su función, es indiscutible la gran diversidad de metabolitos secundarios de interés industrial, en este caso aquellos provenientes de actinomicetos se iniciaron con el descubrimiento de la actinomicina (Schatz *et al.* 1994) y la estreptomycinina (Korn-Wenddisch y Kutzner 1992; Zhang *et al.* 2013) esta última usada en el tratamiento de la tuberculosis y dando inicio a la búsqueda de antibióticos producidos por actinomicetos. Actualmente, es un hecho que los actinomicetos generan aproximadamente dos tercios de los productos empleados en la medicina humana y veterinaria (Chater y Bibbs 1997). Entre estos se incluye: antibacterianos, antifúngicos, antivirales y antiparasitarios y como ejemplos se cuentan la higromicina B, destomicina y la paramomicina, respectivamente (Kelley *et al.* 1960). Sin embargo, debido a las demandas actuales ha sido necesario encontrar nuevos compuestos, los cuales tengan una mejor efectividad y estabilidad, lo que ha llevado a la síntesis de análogos de antibióticos producidos de manera natural. Los avances en nuevas alternativas han sido posibles gracias a detalladas investigaciones enfocadas hacia la diferenciación y crecimiento; que como se mencionó anteriormente, se encuentran estrechamente ligadas al comienzo del metabolismo secundario (Chater y Bibbs 1997; Bibb y Mervin. 2005 y Talbot 1999) como es el caso de *Streptomyces coelicolor*, el cual se ha usado como modelo para diversos estudios, debido a que el genoma de esta especie ha sido totalmente secuenciado y presenta una

alta similitud con otros estreptomicetos en relación con los genes involucrados en la producción de metabolitos secundarios (Bentley *et al.* 2002; Bibb y Mervin. 2005).

### **1.3 Metabolismo secundario en *S. avermitilis*. Avermectinas y Oligomicina.**

*Streptomyces avermitilis* produce ocho tipos de avermectinas, de las cuales sólo dos B1a y B1b son empleadas en el campo de la medicina y la agricultura, debido a sus propiedades antiparasitarias y antihelmínticas, aunque también se han reportado con actividad antibacteriana y antifúngica (Egerton *et al.* 1979). En particular, la fracción B1a tiene la actividad antiparasitaria más efectiva (Burg *et al.* 1979; Omura *et al.* 2001). La ivermectina, un derivado semisintético, es ampliamente usada en el tratamiento de enfermedades causadas por nemátodos endoparásitos como *Onchocerca volvulus*, la oncocercosis puede ocasionar la pérdida total de la visión y el gusano es transmitido por una especie de mosca negra (Dadzie *et al.* 2002). Para esta enfermedad se ha reportado el uso de la ivermectina (Dadzie *et al.* 2002). Asimismo, se ha reportado su uso en el tratamiento de la fiebre del ganado causada por *Boophilus annulatus*, esto en el sur de Texas y norte de México (Miller *et al.* 2001). La ivermectina ha venido sustituyendo el uso de compuestos como el DDT, debido a reportes previos en cuanto a la resistencia de estos vectores a los compuestos organofosforados (Hemingway y Ranson. 2000).

#### **1.3.1 Mecanismo de acción de las avermectinas**

El modo de acción de las avermectinas es modulando los canales  $\gamma$ -aminobutiricálcicos (GABA) en las neuronas de los invertebrados (Sigel y Baur 1987). Esto ocurre cuando el antiparasitario interfiere con el receptor GABA en los tejidos neuronales de los invertebrados. La estimulación de GABA unido a su receptor ocasiona la apertura de los canales de iones cloro, lo que impide la transmisión del impulso nervioso hacia las neuronas motoras (Arena *et al.* 1991). Los efectos de las avermectinas se ven reflejados en una parálisis progresiva del organismo hasta su muerte.



### 1.3.2 Características del cluster biosintético de avermectina. Síntesis

Los genes involucrados en la producción de avermectina están organizados dentro del *cluster* en una manera similar a otros policétidos complejos, incluyendo los genes de la eritromicina en *Saccharopolyspora erythraea*, y la rifamicina, esto en *Streptomyces hygroscopicus* (Weber *et al* 1985). La secuencia de nucleótidos del cluster ha sido determinada, encontrándose 18 ORF's (Open Reading Frame) con una extensión de 82 Kb (Yin *et al* 2013). La organización genética del cluster refleja el acomodo dentro del módulo de la policétido sintetasa (PKS) (Nguyen *et al* 2014 e Ikeda *et al* 2003).

Cuatro ORF's (*aveA1*, *aveA2*, *aveA3* y *aveA4*) codifican para los policétidos multifuncionales, constituyendo la avermectina policétido sintetasa. Dentro de este cluster *aveA1-aveA2* y *aveA3-aveA4*, generan los doce módulos de actividad enzimática responsable de la elongación de la cadena de policétidos. Dos ORF: *aveC* y *aveE* están implicados en la modificación del policétido.

Corriente arriba, *aveD* y *aveF* codifican a una C5 O-metiltransferasa y una C5-cetoreductasa, respectivamente, las cuales están asociadas con la modificación de los intermediarios de la avermectina.

Corriente abajo se encuentran genes que muestran similitud a los relacionados con la síntesis de la oleandrosa (*aveBII-aveBVIII*) y los genes de la glicosilación (*aveB1*) implicados en la biosíntesis de los macrólidos. Se cree que *aveR* codifica a un regulador positivo en la producción de avermectinas, ya que la secuencia polipeptídica traducida muestra similitud significativa con diversas secuencias predictivas por tener un dominio de unión *helix-turn-helix* (MacNeil 1988).

La síntesis puede ser dividida en tres estadios: 1) la formación inicial de una aglicona, 2) la modificación de la aglicona inicial para formar la avermectina agliconada, y 3) la glicosilación de la avermectina agliconada con un derivado de una oleandrosa. Diversas avermectinas, estructuralmente relacionadas A1a, A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a y B2b pueden ser virtualmente diferenciadas en tres posiciones dentro de la molécula (Ikeda *et al* 2014). Dentro de esta división las fracciones B, son las responsables de

la principal actividad antiparasitaria, mientras que las fracciones A la actividad es menor (Ikeda *et al* 2014). El comienzo del grupo acil es derivado del catabolismo de la isoleucina en los componentes “a” y la valinato de componentes b” (Ikeda *et al* 2014). Después de cada condensación, una específica oxidoreductasa y subsecuentemente una deshidrogenasa pueden reducir el grupo ceto. Cuatro péptidos adicionales de PKS son los responsables de la actividad enzimática involucrada en la formación de la aglicona inicial (Ikeda *et al* 2014). Subsecuentemente, la cadena de carbono presenta diversas modificaciones, incluyendo la formación de un anillo de furano y la metilación para formar una lactona macrocíclica (macrólido). En el paso final de la síntesis de la avermectina agliconada, se incorpora un derivado de la oleandrosa (dioxitimidin difosfato oleandrosa) para formar así la avermectina (Ikeda *et al* 2014). Las posibilidades de mejoras en su producción, así como el desarrollo de derivados semi-sintéticos que tienen las avermectinas, ha llevado a profundizar el conocimiento sobre su producción, de tal manera que se ha secuenciado completamente el cluster biosintético, permitiendo conocer la función que tienen los genes tanto en la producción como en mecanismos globales de regulación (Ikeda *et al.* 2003 y Omura *et al* 2001)

Fig. 2

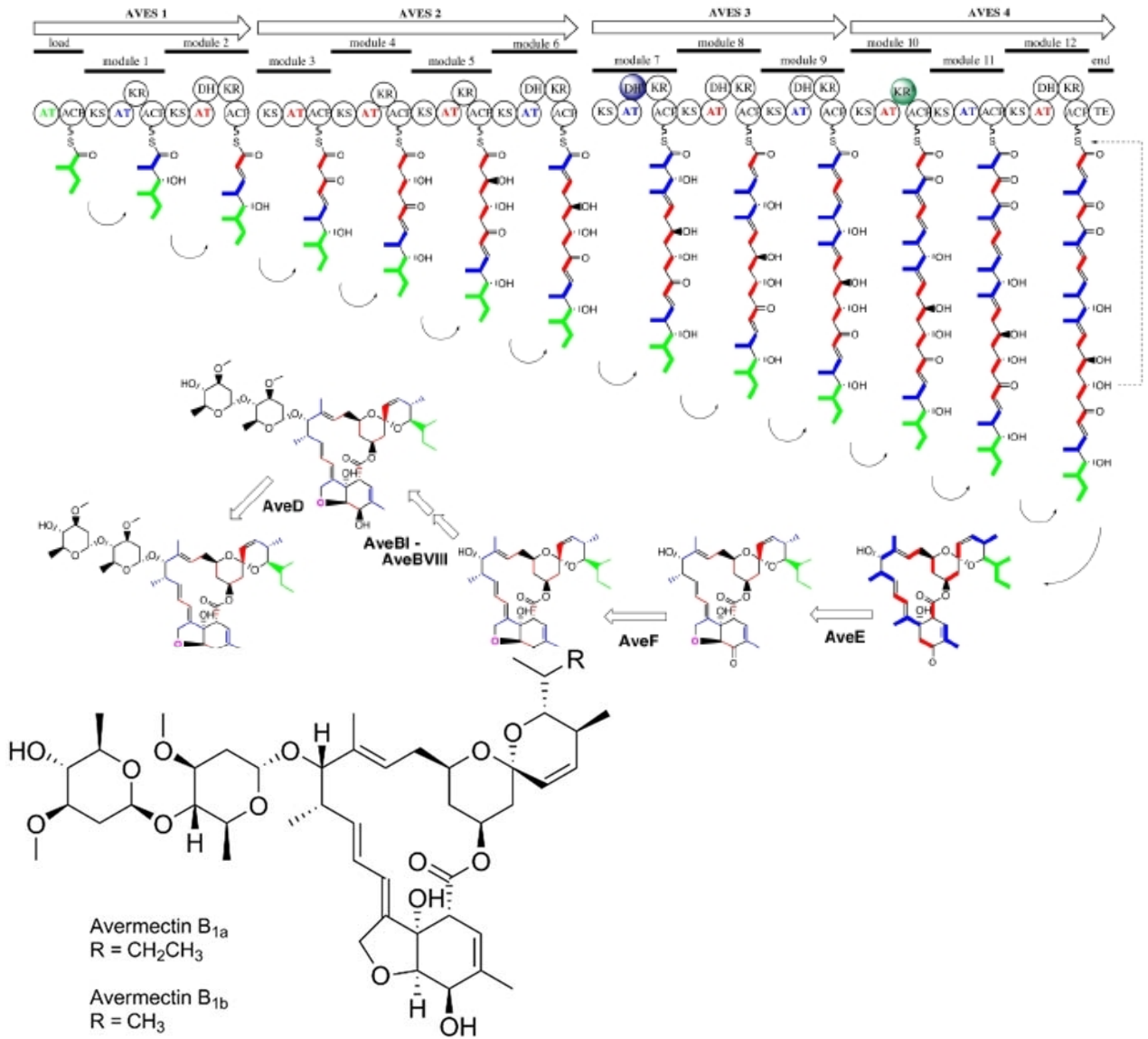


Fig. 2. Biosíntesis de la avermectina y estructura de los policétidos. Las flechas en blanco indican los genes, las líneas en negro los módulos y cada círculo representa un dominio enzimático en la elongación de los policétidos. AT, aciltransferasa; DH, dihidratasa; KR, β-cetoacil-ACP reductasa; KS, β-cetoacil-ACP sintetasa; TE, tioesterasa. Las flechas curvas indican la elongación del policétido, hasta la formación de la avermectina en sus diferentes compuestos. 2b) Estructura de los compuestos A y B. Los compuestos B son los principales responsables de la actividad antiparasitaria (Ikeda *et al* 2014).

Fig. 3

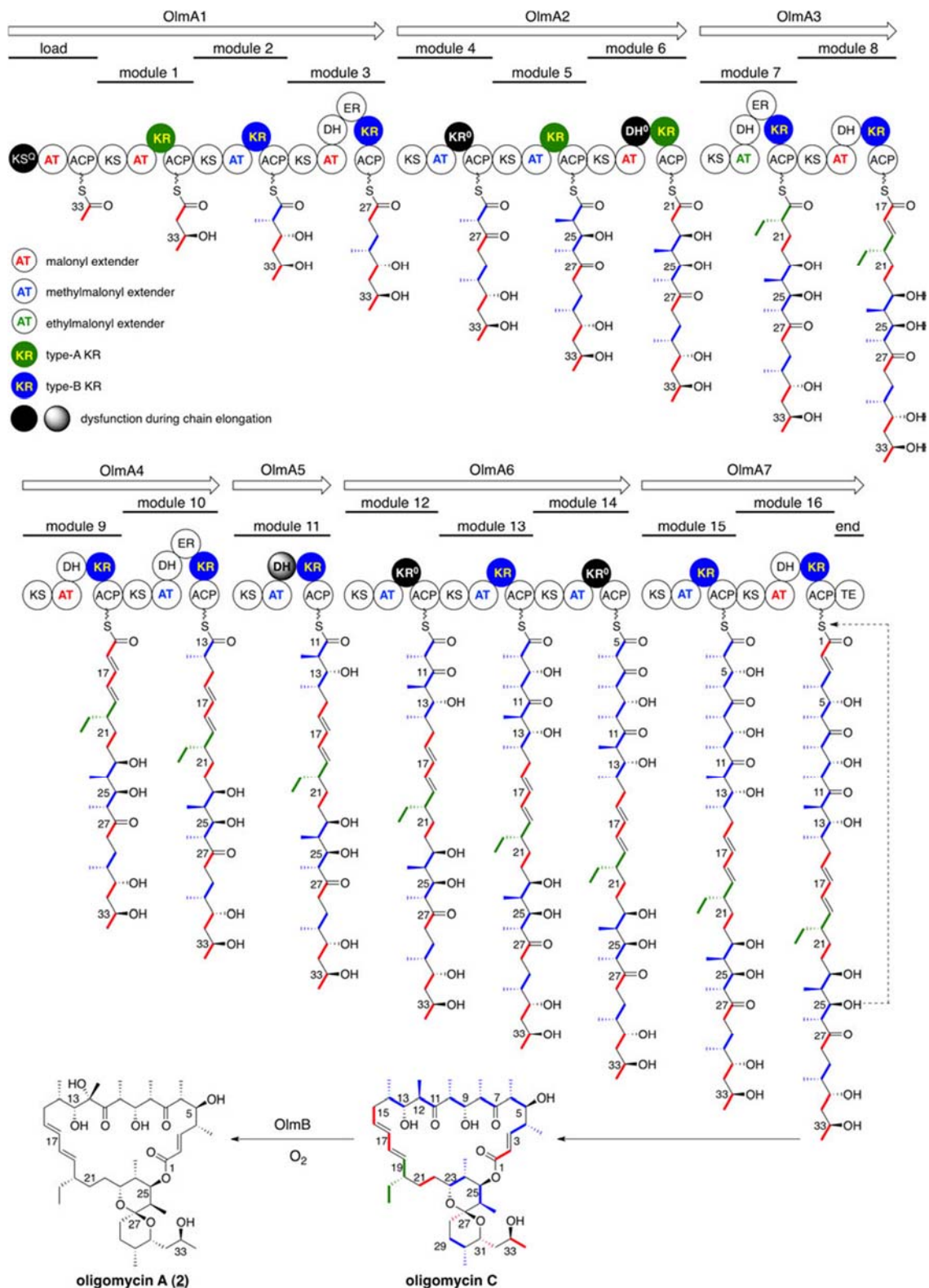


Fig. 3. Biosíntesis de la oligomicina C (C12-deoxi oligomicina A). Formación y predicción de las estructuras de las PKSs. Abreviaturas y posibles enzimas. ACP, proteína acarreadora de grupos acil. AT, acil transferasa, DH, dihidratasa, KR β-oxoacil –ACP reductasa, KS, β-oxoacil-ACP sintetasa, TE, tioesterasa. (Ikeda. H *et al.* 2014).

## **1.4 Características del *cluster* biosintético de oligomicina. Síntesis**

El *cluster* biosintético de oligomicina (Fig. 3) incluye siete genes (olmA1 a olmA7), los cuales codifican polipéptidos multifuncionales del tipo-I PKSs. Estos genes son responsables de la biosíntesis de oligomicina; juntos codifican 16 grupos homólogos de cada módulo catalizando una elongación específica en la cadena del policétido (Xiuping *et al* 2009).

De un total de 79 sitios constituyentemente activos (es decir, participantes en la elongación de la cadena de policétidos), seis son enzimáticamente no funcionales (no participan en la síntesis de la oligomicina), convirtiéndolo en el sistema enzimático multifuncional más complejo identificado hasta el momento (Ikeda *et al* 2014). Los genes que constituyen el *cluster* se encuentran organizados como dos juegos de cinco y dos genes, olmA1-olmA2-olmA3-olmA6-olmA7 (*sav2899-2895*) y OlmA4-olmA5 (*sav2892-2893*), los cuales son convergentemente transcritos (Ikeda *et al* 2014). Entre los dos juegos de genes PKS hay un gene, olmB (*sav2894*), que codifica a un citocromo P450 monooxigenasa (Lamb *et al* 2003), catalizando la hidroxilación en el C12 de la oligomicina C en la modificación post-policétido. Dos ORF, olmRI y olmRII, presentan una función reguladora para activar la transcripción de la oligomicina. Un gen adyacente codifica a una tioesterasa la cual puede estar implicada en la regulación del proceso, lo que previene el incorrecto funcionamiento de la extensión de la cadena (Ikeda *et al* 2014). Un ORF codifica a la proteína crotonil-CoA reductasa y se estima estar implicado en el suministro de una unidad de etil-malonil-CoA (Ikeda *et al* 2014).

### **1.4.1 Mecanismo de acción de la oligomicina.**

La oligomicina inhibe a la ATPasa al unirse a la subunidad F<sub>0</sub> interfiriendo el transporte de H<sup>+</sup> a través de F<sub>0</sub>; los protones no pueden ser devueltos a la mitocondria. Como resultado, la bomba de protones es incapaz de operar, y el gradiente se torna demasiado fuerte como para ser superado. El NADH deja de

ser oxidado y el ciclo del ácido cítrico deja de operar porque la concentración de NAD<sup>+</sup> cae por debajo de la concentración que estas enzimas pueden utilizar. (Xiuping *et al* 2009).

### **1.5 Modificaciones a los policétidos.**

La naturaleza modular del *cluster* de genes del policétido sintetasa tipo I, ha facilitado las investigaciones combinatorias para generar nuevos compuestos (Chen *et al* 2010 y Miyamoto *et al* 2011). La manipulación genética ha probado alterar el número, contenido y orden de los módulos dentro del *cluster* genético, resultando en la síntesis de nuevos policétidos (Olano *et al* 2008 y Cane *et al.* 1983). Además, los módulos heterólogos han sido expresados cuando son clonados dentro de alternativos *clusters* para formar módulos híbridos de policétidos (Samia *et al* 2014). Por ejemplo, el módulo de lectura para la policétido sintetasa de la avermectina ha sustituido a un dominio de lectura normal dentro del *cluster* genético de la eritromicina (Wang y Ochi 2008 y Weber *et al* 1985) demostrándose que la expresión de la enzima híbrida resulta en la producción de nuevos análogos de eritromicina (Weber *et al* 1985 y Marsden *et al* 1998). Otros estudios comparativos son los realizados entre los genomas de *S. coelicolor* y *S. avermitilis* (Novotna *et al* 2003 y Zhuo *et al* 2010). Los trabajos sobre la modificación de policétidos ha permitido el desarrollo de nuevos fármacos con actividad antitumoral, como el caso de la oligomicina (Xiuping *et al* 2009).

### **1.6 Sistemas de dos componentes**

Los sistemas de dos componentes (SDC) usualmente consisten de dos elementos básicos: una proteína sensora o histidín cinasa (HK) y un regulador de respuesta (RR) afín (Fig. 4) (Ortiz *et al* 2009 y Stock *et al* 2000). El SDC está ampliamente distribuido entre los tres dominios de la vida, Eukaria, Bacteria y Archea (Kim y Forst, 2001). La proteína sensora utiliza adenosín trifosfato (ATP) para autofosforilar un residuo conservado de histidina, como respuesta a una señal específica (Wei *et al* 2007). El grupo fosforilo de alta energía es transferido a un residuo conservado de aspartato localizado en el

regulador de la respuesta (RR), provocando la unión a genes específicos en el DNA (Stock *et al* 2000). Cabe mencionar que este proceso es dentro de una cascada de señalización, es decir, involucra más de un paso. La Figura 4 resume el proceso.

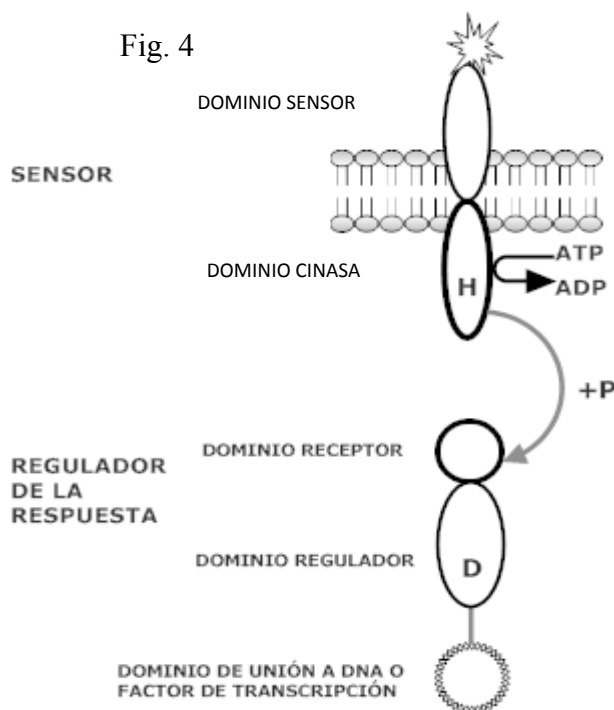


Fig. 4 Sistema de dos componentes. Presente en actinomicetos, inicia con un estímulo externo (diferencia en la osmolaridad) lo cual activa el dominio sensor, provocando la fosforilación del dominio cinasa y la consiguiente transferencia del grupo fosforilo de alta energía hacia el dominio receptor del regulador de la respuesta; un segundo dominio (regulador) inicia una respuesta como puede ser un factor de transcripción hacia una determinada región del DNA.

### 1.7 Uso de metodologías. Transposones

El empleo de la mutagénesis por radiación o químicos, así como el *knock-out*, han sido herramientas importantes en el estudio de la función de los genes en especies de *Streptomyces* (Kieser *et al* 2000). No obstante, para lograr mayor conocimiento, ha sido necesario desarrollar nuevas metodologías que permitan un estudio más detallado sobre los genes involucrados en los procesos que llevan hacia la diferenciación y producción de metabolitos secundarios, encontrándose una solución en el uso de

transposones. Esta técnica permite generar bibliotecas con inserciones e inactivar de manera completa e incondicional al gen de estudio, ejerce un efecto polar (afecta genes adyacentes) en genes posteriores a donde se realiza la inserción (esto en operones) e induce rearrreglos del DNA (Kieser *et al* 2000). Estas ventajas se ven reflejadas cuando se trabaja con microorganismos que presenten un ciclo de vida complejo, como es el caso de los estreptomicetos (Kieser *et al* 2000). La transposición, es un proceso donde secciones de DNA son capaces de moverse a través del genoma, a menudo haciendo copias de sí misma (Goryshin *et al* 1998). Para que este proceso pueda llevarse a cabo, es necesario la presencia de la enzima transposasa, la cual es también capaz de unirse a sitios específicos del genoma, generando extremos cohesivos; posteriormente este sitio puede ser nuevamente unido por la enzima DNA ligasa (<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/T/Transposons.html>); esto es capaz de generar una gran variedad de re-arreglos en el genoma como son las inserciones, inversiones y fusión de cromosomas (Goryshin *et al* 1998). Debido a que este proceso juega un papel importante en la evolución del genoma, se le han encontrado aplicaciones en diversas áreas de la ciencia, lo que ha permitido ampliar las investigaciones sobre diversas especies de *Streptomyces*, como es el caso de *S. coelicolor* y *S. avermitilis*. Ambos actinomicetos han sido objeto de estudio en varios aspectos, como su secuenciación (Bentley *et al* 2002) (Ikeda *et al* 2003), diferenciación (Elliot y Talbot. 2004) y metabolismo secundario (Bibb. 2005; Bishop *et al* 2004; Fernandez-Martínez *et al* 2009; Chen *et al* 2010; de Been *et al* 2011; Ikeda y Omura 2014).

## **1.8 Antecedentes**

Desde la secuenciación del genoma de *Streptomyces coelicolor* a la fecha, se han venido realizando avances sobre la comprensión del metabolismo en actinomicetos (Bentley *et al* 2002). Diferentes especies de actinomicetos poseen los genomas más grandes entre los procariontes, posiblemente reflejando su capacidad para adaptarse a las variantes condiciones de su medio ambiente; en consecuencia poseen una



capacidad importante de regulación (de Been *et al* 2011). En *S. coelicolor*, un total de 965 proteínas tienen propiedades de regulación incluyendo 85 sensores de cinasa y 79 reguladores de respuesta (Bentley *et al* 2002). La secuenciación en *Streptomyces avermitilis* (Ikeda. H *et al.* 2003) ha permitido encontrar genes que codifican para SDC, reportándose 67 HK y 68 RR (Wei *et al* 2007). El gran número de SDC en especies de *Streptomyces* parece reflejar cierta capacidad para responder en una amplia variedad de estímulos ambientales y cambios en sus hábitats naturales (Ortiz y Groves 2009), su estudio ha permitido revelar aspectos importantes en la regulación de la diferenciación y producción de metabolitos secundarios. Se ha reportado en *S. coelicolor* un SDC, denominado *osaABC* (Bishop *et al* 2004) el cual está involucrado en la diferenciación y metabolismo secundario; la interrupción de los genes *osaB* y *osaC* tienen como consecuencia la obtención de mutantes con incapacidad para formar micelio aéreo en medio con osmolito (MgCl 200  $\mu$ M), morfología conocida como bald (“calva”) (Bishop *et al* 2004). Una característica particular reportada para *osaC* es la incapacidad de restaurar la mutación cuando se complementa con el gen sin interrumpir (Fernandez-Martínez *et al* 2009). Adicionalmente, se ha reportado que *osaC* está bajo la regulación de otro sistema denominado factor sigma; la interacción del complejo SDC-Factor sigma ( $\sigma$ F) tiene un papel crucial en la regulación de la diferenciación y producción de metabolitos secundarios (Fernandez-Martínez *et al* 2009). En el presente trabajo, se propuso buscar en *S. avermitilis* genes con similitud a *osaB* y *osaC*, siendo los genes *SAV2511* y *SAV2513* los que presentaron una similitud del 91% y del 89% respectivamente, a nivel de traducción. Se ha reportado que la función de *SAV2511* es la de un regulador de la respuesta, mientras que la función de *SAV2513* es la de una proteína reguladora de la ósmosis. La obtención del par de genes, fue a partir del cósmido CL-236-G10. La función de ambos genes los enfoca hacia la importancia que podrían tener en la regulación del metabolismo secundario.

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Como ya se mencionó, es bien sabida la importancia de ciertos metabolitos desde un punto de vista aplicado, tal es el caso de las avermectinas, sin embargo, la mayor parte del conocimiento ha sido generado en actinomicetos como *Streptomyces coelicolor*, el cual no tiene aplicación industrial, por lo que resulta importante llevar a cabo investigaciones que permitan extrapolar todo este conocimiento generado a microorganismos de verdadero interés industrial. Con esta base y los análisis comparativos que se han realizado entre los genomas de *S. coelicolor* y *S. avermitilis*, se realizó una búsqueda de posibles equivalencias de genes involucrados en la producción de metabolitos secundarios, tomando como referencia a *S. coelicolor* y llevando este conocimiento a *S. avermitilis*, se encontraron dos genes: *SAV2511* y *SAV2513*, posiblemente equivalentes a los genes *osaB* y *osaC* en *S. coelicolor*. La similitud presentada fue del 91% y del 89% respectivamente a nivel de proteína. Con base en la información presentada la interrupción de los genes *SAV2511* y *SAV2513* probablemente dará como resultado la obtención de cepas con cambios morfológicos y en el metabolismo secundario (avermectinas y oligomicina). La evaluación de estas características se podrá determinar mediante técnicas de bioensayos y HPLC empleando la interrupción mediante transposones.

#### **4. HIPÓTESIS**

“Conociendo que el segmento SCO5749 (que contiene los genes *osaB* y *osaC*) está involucrado en la producción de metabolitos secundarios en *S. coelicolor*, y que existen genes en *S. avermitilis* con un alto grado de similitud (91%), la disrupción génica de estos últimos tendrá como consecuencia una alteración en la producción de avermectinas y oligomicina, así como cambios en su morfología”

### 3. OBJETIVOS

#### OBJETIVO GENERAL

- Evaluar si los genes *SAV2511* y *SAV2513* están involucrados tanto en la diferenciación como en la producción de avermectinas y oligomicina en *S. avermitilis*

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Montar el método de cuantificación de avermectinas y oligomicina por bioensayo y HPLC.
- Evaluar el método de biobalística, como alternativa en la introducción de DNA a la célula.
- Determinar el efecto de la interrupción de los genes *SAV2511* y *SAV2513* sobre la diferenciación en condiciones de estrés osmótico y sin estrés osmótico
- Determinar si la interrupción de los genes *SAV2511* y *SAV2513* similares a *osaB* y *osaC*, incrementan la producción de avermectinas y oligomicina
- Comparar la producción de avermectinas y oligomicina en cepas mutadas y silvestres
- Proponer un mecanismo global de regulación involucrando los genes *SAV2511* y *SAV2513*

## 5. MATERIALES Y MÉTODO

Se usó la cepa *S. avermitilis* ATCC 12804, la cual se sembró en agar SFM (Harina de soya 20 g, Manitol 20 g, agar 15 g, H<sub>2</sub>O corriente\* 1000 ml, pH 6.9) a 30°C por 5 días, se rasparon las esporas y se mantuvieron en glicerol al 20% a -20°C. Bajo estas condiciones las esporas se mantienen viables por 3 meses.

Tabla 1. Cepas y plásmidos usados.

Plásmido	Característica	Referencia
pME6	3.9 kb kanamicinaR	Fernández-Martínez <i>et al</i> 2009
pQM5062	6.5 kb, apramicinaR	Bishop <i>et al</i> 2004
Tn5062	3.4 Kb, Transposon	Bishop <i>et al</i> 2004
CL-236-G10	46 Kb, cósmido que contiene los genes SAV2511 y SAV2513. AmpicilinaR	<a href="http://avermitilis.lj.kitasato-u.ac.jp/">http://avermitilis.lj.kitasato-u.ac.jp/</a>
pMBSa1	9 Kb, pME6 con el gen SAV2511 clonado. KanamicinaR	Este trabajo
pMBSa2L	6 kb, subclonado en pME6 a partir del fragmento digerido con KpnI. KanamicinaR	Este trabajo
pMBTn2	9Kb, inserción del transposon Tn5062 dentro del gen SAV2511, en el sitio único AatII. ApramicinaR	Este trabajo
pMCSa	6 Kb, pME6 con la clonación del producto de PCR para el gen SAV2513. KanamicinaR	Este trabajo
pMCTn1	6 Kb, Inserción del transposon Tn5062 en el gen SAV2513 en el sitio único EcoRV. ApramicinaR	Este trabajo
Cepas	Característica	Referencia
<i>S. avermitilis</i> 12804	Cepa tipo. Aberdeen, UK	Pitman <i>et al</i> 2002
<i>E. coli</i> ET12567	dam13:Tn9 dcm6 hsdM hsdR recF143 16 zjj201:Tn10 galK2 galT22 ara14 lacY1 xyl5leuB6 thi1 tonA31 rpsL136 hisG4 tsx78 mtli glnV44.	Yanisch-Perron <i>et al</i> 1985
<i>E. coli</i> JM109	F traD36 proA+B+ lac1q (lacZ)M15/(lac-proAB) glnV44 e14 gyrA96 recA1 relA1endA1 thi hsdR17	Yanisch-Perron <i>et al</i> 1985
<i>Aspergillus niger</i> A10	Cepa productora de ácido cítrico. Sensible a oligomicina	Acuna <i>et al</i> 1995

\*Para el caso que el agua corriente tenga muchas sales, se emplea la mitad de agua corriente y la mitad de agua destilada. Las cantidades pueden variar dependiendo si hay o no esporulación.

## 5.1. Medios de cultivo y soluciones

### **SFM**

Harina de soya...20 g (Flor y vida®)

Manitol.....20 g (J. L Baker)

Agar..... 15 g (Bioxon)

H<sub>2</sub>O de la llave\*...1000 ml

\*Para el caso que tenga muchas sales, se emplea la mitad de agua de la llave y la mitad de agua destilada. Las cantidades pueden variar dependiendo si hay o no esporulación.

### **LB**

Extracto de levadura... 2.5 g (Bioxon)

Triptona.....5 g (Difco)

Cloruro de sodio..... 2.5 g (J. L Baker)

H<sub>2</sub>O destilada.....1000 ml

### **2XYT**

Extracto de levadura...10 g (Bioxon)

Triptona.....10 g (Difco)

NaCl..... 5 g (J. L Baker)

H<sub>2</sub>O destilada..... 1000 ml

### **Medio de semilla (Avermectinas)**

Extracto de levadura..... 5 g (Bioxon)

Glucosa.....20 g (J. L Baker)

Harina de soya..... 15 g (Flor y vida®)

H<sub>2</sub>O destilada..... 1000 ml

### **Medio de producción (Avermectinas)**

Extracto de estigmas de maíz... 3 g (Marca libre)

Glucosa.....70 g (J. L Baker)

Harina de soya.....12 g (Flor y vida®)

Extracto de levadura.....3 g (Bioxon)

Tiza o gis.....4.5 g (Marca libre)

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....0.3 g (J. L Baker)

H<sub>2</sub>O destilada..... 1000 ml

### **Medio fi (φ)**

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O.....0.5 g (J. L Baker)

CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O.....0.7 g (J. L Baker)

Glucosa.....10 g (J. L Baker)

Triptona.....5 g (Difco)

Extracto de levadura.....5 g (Bioxon)

Lab Lemco Powder®.....5 g

H<sub>2</sub>O destilada.....1000 ml

### **Medio de producción de Oligomicina (AP-5)**

Ácido L-Glutámico.....0.6 g (Sigma)  
FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O.....0.01 g (J. L Baker)  
Almidón de Maíz..... 80 g (J. L Baker)  
Extracto de levadura.....5 g (Bioxon)  
CaCO<sub>3</sub>.....7 g (J. L Baker)  
MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O.....1 g (J. L Baker)  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....1 g (J. L Baker)  
H<sub>2</sub>O destilada.....1000 ml

### **Solución de metales traza**

ZnCl<sub>2</sub>.....20 mg (J. L Baker)  
FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O.....20 mg (J. L Baker)  
MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O.....20 mg (J. L Baker)  
H<sub>2</sub>O destilada.....1000 ml

### **Solución 20x SSC**

NaCl..... 173.3 g (J. L Baker)  
Citrate de sodio ..... 88.2 g (J. L Baker)  
H<sub>2</sub>O destilada..... 800 mlml  
Ajustar a pH 7.0

### **Solución de pre-hibridación**

20x SSC..... 10 ml  
Formol..... 20 ml (Sigma)  
H<sub>2</sub>O destilada..... 9.6 ml  
Laurilsarcosina al 10%... 0.4 ml (Sigma)  
SDS al 10%.....80 µl (Sigma)  
Blocking powder<sup>®</sup> .....2 g

Disolver todo a 60°C

### **Regulador de Desnaturalización**

NaOH.....40 g (J. L Baker)  
NaCl.....175.3 g (J. L Baker)  
H<sub>2</sub>O destilada.....2 L

### **Regulador de neutralización**

TRIS.....242.2 g (J. L Baker)  
NaCl.....175.2 g (J. L Baker)  
H<sub>2</sub>O destilada.....1.6 L

### **Solución de Apramicina**

Sulfato de Apramicina (Sigma®) ...100 mg  
H<sub>2</sub>O destilada.....1 ml

### **Solución de Kanamicina**

Sulfato de kanamicina (Sigma®) ...25 mg  
H<sub>2</sub>O destilada.....1 ml

### **Solución de Espectinomicina**

Dicloruro de Espectinomicina (Sigma®) ...100 mg  
H<sub>2</sub>O destilada.....10 ml

### **Solución de Higromicina**

Higromicina B (Sigma®) ...100 mg  
H<sub>2</sub>O destilada.....10 ml

## **5.2. Aislamiento y amplificación de los genes de interés**

Se aislaron los genes SAV2511 y SAV2513 del genoma de *S. avermitilis* y del cósmido CL-236-G10 (obtenido a partir de la biblioteca genómica usada en la secuenciación de *S. avermitilis*) respectivamente, mediante amplificación por PCR ocupando los oligos con la siguiente secuencia:

SAV2511 (sentido) 5'-TGA ATT CCA GAT TCG ACC AGG TAC CCG-3'

SAV2511 (antisentido) 5'-TTC TAG ACT GTA TTT GCC GCT GCA CC-3'

SAV2511 (sentido) 5'- CGT CCA TGC CCG GCA TCT GGA CGT-3' (Comprobar mutación)

SAV2513 (sentido) 5'-TGA ATT CTT CCA CGA ACC GGA CAT ACC-3'

SAV2513 (antisentido) 5'- TTC TAG ATA CCT CCA GCT CCG TCT CGT -3'

SAV2513 (sentido) 5'- ATC CCG AAC GCG AGA TCC CCC TCC AGG-3' (Comprobar mutación)

El cósmido se obtuvo a partir de la biblioteca genómica usada durante la secuenciación de *S. avermitilis*

Estos se diluyeron hasta una concentración de 10 pmol/ml y se realizó el PCR bajo las siguientes condiciones y por duplicado para cada reacción.



	DNA total	Cósmido CL-236-G10
DNA	1 µl	1 µl
10X REGULADOR (tris-HCl, pH 7.4)	5 µl	5 µl
OLIGO 1 (sentido)	3 µl (10 pmol/ml)	3 µl (10 pmol/ml)
OLIGO 2 (antisentido)	3 µl (10 pmol/ml)	3 µl (10 pmol/ml)
dNTP's	4 µl (2.5 mMol)	4 µl (2.5 mMol)
Enzima	5 U (5000 U/ml)	5 U (5000 U/ml)
H2O	33 µl	33 µl

Posteriormente se verificaron por medio de una electroforesis en gel de agarosa y se seleccionaron los productos amplificados correspondientes a SAV2513, tanto del DNA total, como del Cósmido y se procedió a limpiarlos mediante el Kit Clean PCR products (Promega®). Para SAV2511 se obtuvo a partir de la digestión del cósmido.

### **5.2.1 Clonación de SAV2513 en pME6**

Esto se realizó, digiriendo el producto de amplificación de SAV2513 y pME6 con las enzimas *EcoRI* y *XbaI*, posteriormente se ligaron y se electroporó en células electrocompetente de *E. coli* JM109 (Sambrook J *et al.* 1989), se purificó y se obtuvo el vector de nombre pMCSa1, con la característica de tener dentro del gen un sitio único para la enzima *EcoRV*. Se digirió con esta enzima y se insertó en el sitio el transposón Tn5062 (ApramicinaR), obteniéndose un nuevo vector de nombre pMCTn2. Este procedimiento se resume en las siguientes figuras.

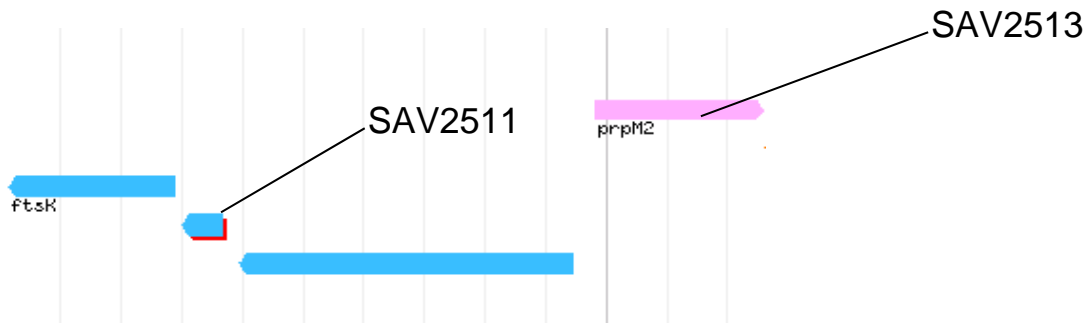


Fig. 5 Ubicación de los genes de interés en el mapa genético de *S. avermitilis*.

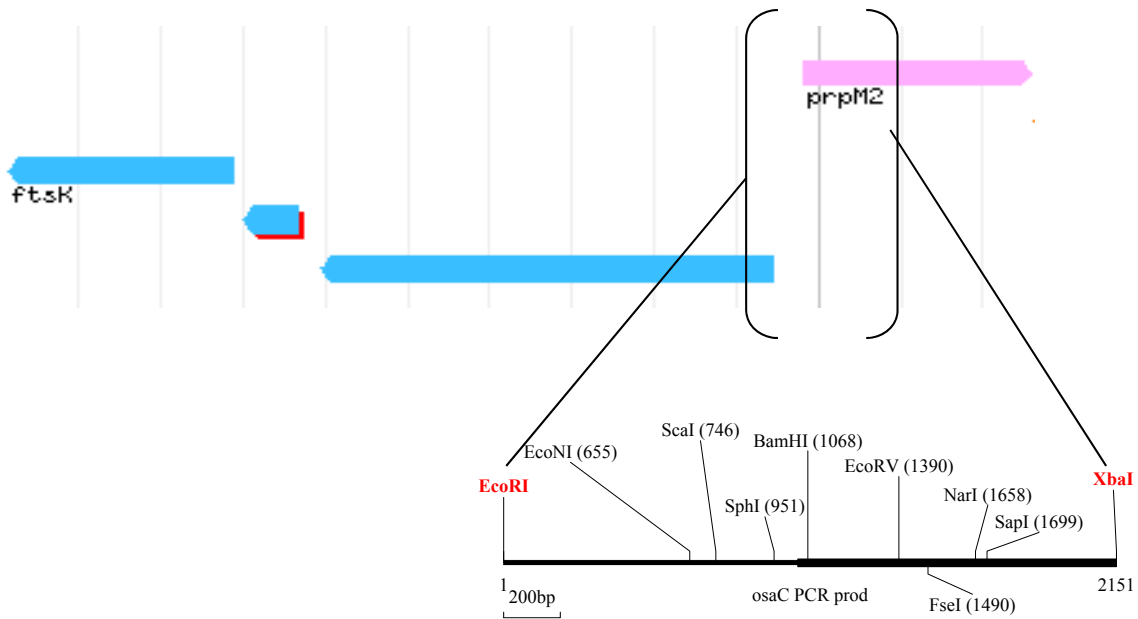


Fig. 6 Amplificación por PCR para el gen SAV2513. Del producto de PCR, se realizó la digestión del fragmento con las enzimas *EcoRI/XbaI*.

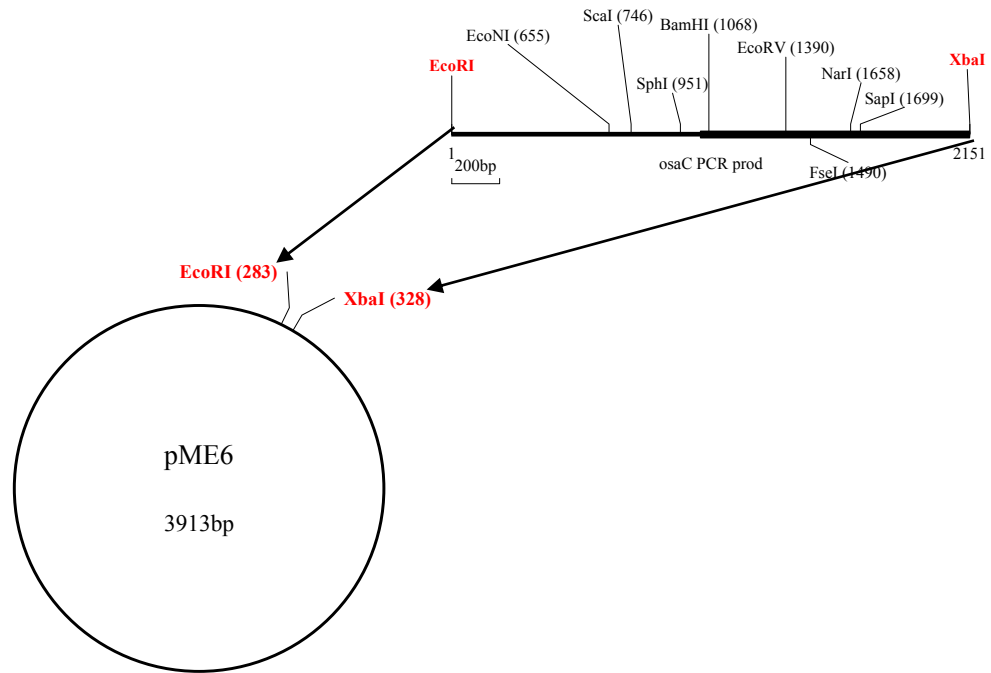


Fig. 7 Inserción del fragmento *EcoRI/XbaI* en pME6. El plásmido pME6 se trató con las enzimas *EcoRI/XbaI* y se realizó la ligación del fragmento con el plásmido, obteniéndose el vector pMCSa1

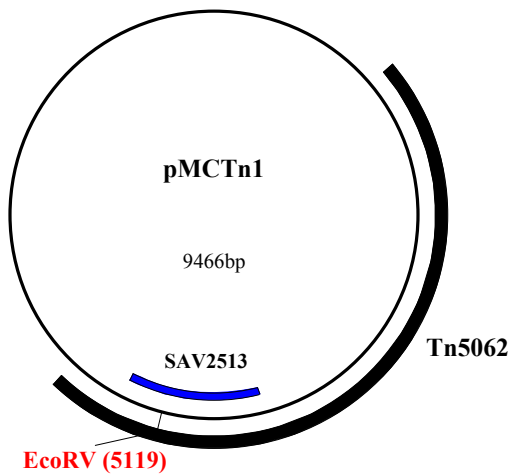


Fig. 8 Obtención del vector pMCTn1. Se realizó la digestión de plásmido pMCSa1 con *EcoRV* y se insertó el trasposón Tn5062 en el sitio *EcoRV*.

## 5.2.2 Clonación de SAV2511 en pME6

Esta se realizó, a partir del cósmido CL-236-G10, mediante la digestión con las enzimas *EcoRI* y *BglII*; simultáneamente se digirió con las mismas enzimas pME6, se ligaron y se electroporaron en células electrocompetentes de *E. coli* JM109, se purificó y se obtuvo un nuevo vector de nombre pMBSa1, el cual se digirió con la enzima *KpnI*, con el propósito de acortar el tamaño del vector. Por otra parte se digirió pME6 con *KpnI*, se ligaron, se electroporó y se purificó, obteniéndose el nuevo vector de nombre pMBSa2L, con la característica de tener en el gen el sitio de corte *AatII*; se digirió con esta enzima, se realizó una digestión con la enzima T4 DNA polimerasa (para dejar extremos romos) y se insertó el transposón Tn5062 (ApramicinaR). De esta manera se obtuvo el nuevo vector pMBTn2, producto de la inserción del transposon en el sitio *AatII*. Las siguientes figuras resumen el procedimiento:

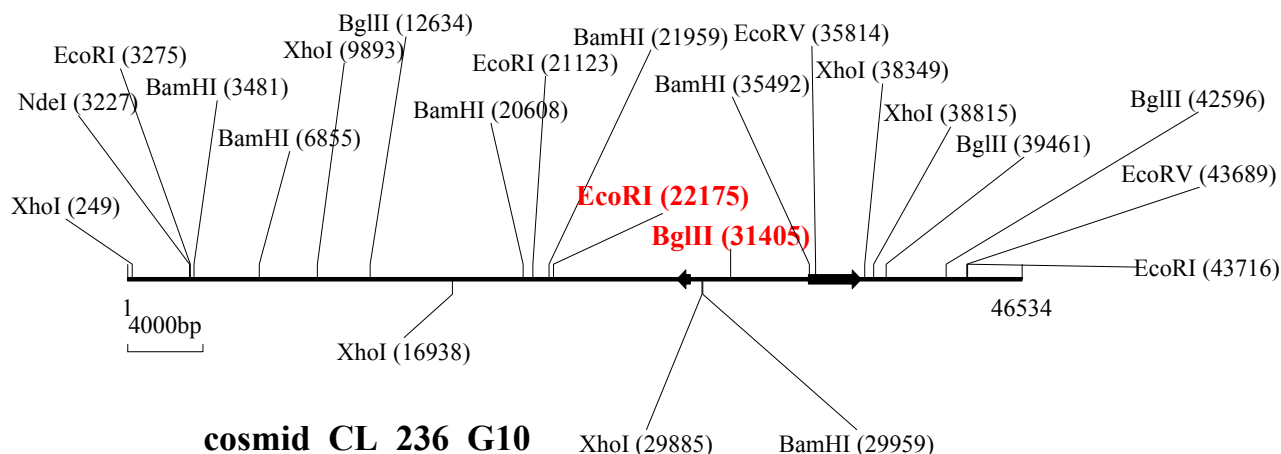


Fig. 9 Ubicación de SAV2511 en el cósmido CL-236-G10. Se realizó la digestión del cósmido con las enzimas *EcoRI*/*BglII*, obteniéndose el fragmento (9236 pb) con el gen SAV2511.

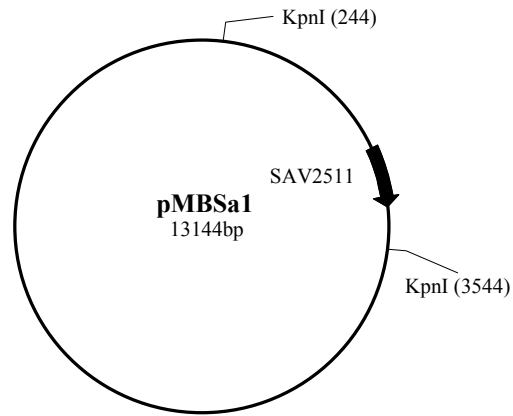


Fig. 10 Obtención de pMBSa1. Se insertó el fragmento *EcoRI/BglII* en pME6, previamente digerido con *BamHI/EcoRI*.

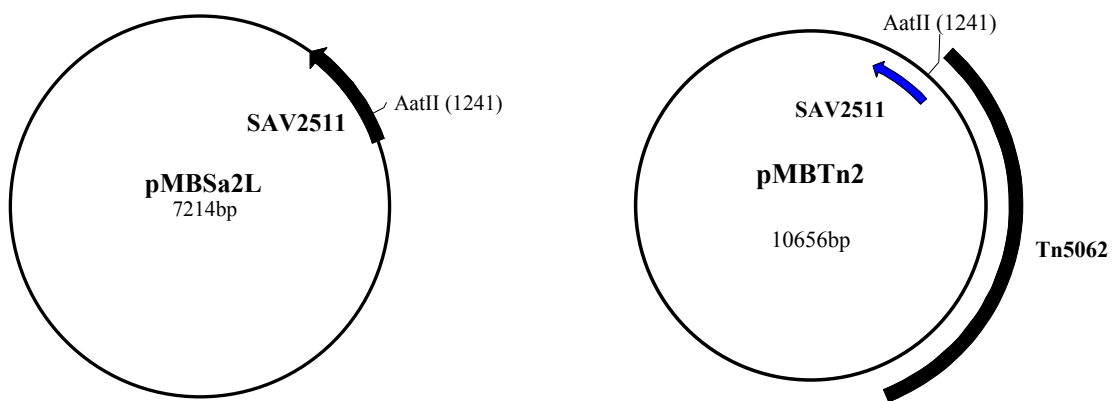


Fig. 11 Obtención de pMBSa2L y pMBTn2. El vector obtenido (pMBSa1) fue acortado, por lo que pMBSa1 fue digerido con *KpnI* y subclonado en pME6. El sitio *AatII* se usó para insertar el transposón Tn5062, obteniéndose de esta forma el vector pMBTn2

### **5.3 Introducción de los plásmidos pMBTn2 y pMCTn1 en la cepa parental de *S. avermitilis*.**

#### **5.3.1. Transformación de *E. coli*.**

Se descongeló una alícuota de células electrocompetentes JM109 (40  $\mu$ l) (Sambrook *et al* 1989) en un baño de hielo y agua y se mezcló con 3  $\mu$ l de cada respectivo vector. La mezcla se transfirió a una celda de electroporación –previamente enfriada- se dio un choque eléctrico en un electroporador Eppendorf® 2510 con una intensidad y duración de 2500V y 5 milisegundos, respectivamente (Sambrook J *et al.* 1989); (Yanisch-Perron *et al* 1985). Rápidamente se añadió 1 ml de medio LB (Tryptona 5 g, Extracto de levadura 2.5 g, Cloruro de sodio 2.5 g, H<sub>2</sub>O destilada 1000 ml) y se mezcló. Finalmente se sembraron 100  $\mu$ l en placas de medio 2XYT (triptona 10 g, extracto de levadura 10 g, NaCl 5 g, H<sub>2</sub>O destilada 1000ml) con el respectivo antibiótico de selección (ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o apramicina). Se incubaron a 37°C por toda la noche (Sambrook *et al* 1989).

#### **5.3.2 Conjugación.**

Como primer paso de la técnica se electroporó la cepa ET de *E. coli* con pMBTn2 (Sambrook *et al* 1989) (Flett *et al* 1997) se sembró en LB-apramicina-cloranfenicol, dejándola en crecimiento toda la noche. Al siguiente día, se seleccionó una colonia, se sembró en medio líquido LB-apramicina y se dejó crecer hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4 a 0.6 (250 nm), se centrifugó a 1300 g por 5 minutos para tener un concentrado celular, se mezclaron con una suspensión de esporas ( $1 \times 10^6$ ) de *S. avermitilis* y se sembraron en medio SFM-MgCl<sub>2</sub> por espacio de 16 horas -tiempo requerido para llevarse a cabo la conjugación- al término de las cuales se le agregó una solución de ácido nalidíxico-apramicina (el primero para inhibir a *E. coli* y el segundo para seleccionar colonias de *S. avermitilis* que hubieran captado el gen con la resistencia a Apramicina), se dejó crecer por 3 días, se esperó a que esporularan y se procedió a realizar una segunda selección, la cual consistió en sembrar las colonias en forma separada en medio LB-kanamicina y LB-apramicina; en el primer medio crecerán solo las que tuvieron un solo

entrecruzamiento, es decir llevan los genes de resistencia a kanamicina y apramicina, mientras que de haber un doble entrecruzamiento, solo llevarán el gen de resistencia a apramicina, y por lo tanto serán las de interés. De esta manera, se seleccionaron 6 colonias con las características antes mencionadas.

### **5.2.3 Biobalística**

Se cultivó *S. avermitilis* en medio 2xYT líquido durante 3 días, a 30 C y 250 rpm, se sembró en medio SFM-sorbitol (0.75 M) y se extendió por toda la superficie de la caja de Petri, de tal manera que se forme un césped; se dejó secar por espacio de 2 horas. Por otra parte se prepararon los componentes para el biobombardeo.

#### **5.2.3.1 Preparación de los microcarries.**

Se pesaron 30 mg de micropartículas de tungsteno en un tubo de 1.5 ml, se le adicionaron 1 ml de etanol al 70% y se agitaron vigorosamente (con vortex) de 3 a 5 min. Se dejaron las micropartículas en etanol por 15 min y se recuperó el pellet centrifugando a 1300 g por 5 sec. Se descartó el sobrenadante y se agregó 1 ml de agua estéril, se agitaron vigorosamente durante 1 min, se dejaron en reposo otro minuto y se centrifugaron durante 5 seg para recuperar el pellet; se descartó el sobrenadante. Se repitió el lavado con agua destilada y estéril por tres veces. Finalmente se agregaron 500 µl de glicerol al 50%, estéril. De esta manera las micropartículas pueden ser almacenadas hasta por dos semanas a -20°C

#### **5.2.3.2 Revestimiento de los microcarriers de tungsteno con DNA**

Su preparación es para 6 bombardeos. A lo largo del procedimiento es muy importante agitar continuamente. Se agitaron vigorosamente las partículas en glicerol para disgregar aglomerados y se tomó una alícuota de 50 µl de microcarriers de tungsteno a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y con agitación continua se agregó en el siguiente orden:

- 5  $\mu\text{L}$  de DNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
- 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2$  2.5 M
- 20  $\mu\text{L}$  de espermidina 0.1 M (grado cultivo celular)

Se continuó agitando por 2 o 3 min, se dejó en reposo 1 min y se recuperó el pellet centrifugando por 5 segundos se descartó el sobrenadante y se le adicionaron 140  $\mu\text{l}$  de etanol al 70% (grado HPLC), se removió el etanol decantando y se agregaron 140  $\mu\text{l}$  de etanol al 100% (grado HPLC); nuevamente se removió el etanol y se agregaron 48  $\mu\text{l}$  de etanol al 100%. Se resuspendió el pellet primero por agitación manual y luego con vortex a baja velocidad por 2 o 3 s.

#### **5.2.4.3 Bombardeo**

Se seleccionaron y ajustaron las distancias del bombardeo, siendo de 6 y 9 cm, así como la presión de Helio en 1200 psi (200 psi en exceso para tener la presión de ruptura). Se colocaron 6  $\mu\text{l}$  de los *microcarriers* revestidos con los plásmidos pMBTn2 y pMCTn1 en el *macrocarrier* (previamente esterilizado con etanol al 70%) y se enroscó con el *macrocarrier holder*, se colocó dentro de una caja de Petri con  $\text{CaCl}_2$  y se dejaron secar. Se encendió el equipo (previamente sanitizado con etanol al 70%) y se colocó el disco de ruptura (esterilizado con isopropanol al 70%) dentro del *retaining cap*, se fijó al final del tubo de aceleración de gas y se apretó todo el sistema. Aparte se colocó el *macrocarrier* y el *stopping screen* dentro del *microcarrier launch assembly*. Se colocaron este y las cajas de Petri previamente sembradas en sus respectivos sitios del aparato y se cerró la puerta. Se realizó el vacío al nivel establecido (mínimo 5 pulgadas de mercurio) y se bombardeó la muestra manteniendo el botón *FIRE* continuamente presionado hasta que el disco de ruptura estallo y el nivel de presión de Helio bajo a cero, se liberó el vacío y se removieron las cajas de Petri de la cámara. Se incubaron a 30 °C por espacio de 16 h y se agregó el antibiótico de



selección (apramicina 100 mg/mL). Se dejó en incubación con las mismas condiciones por 7 días. Se seleccionaron 6 colonias con fenotipo de interés.

### **5.3. Determinación de la interrupción de SAV2511 y SAV2513.**

Para ambos genes se realizó la amplificación por PCR bajo las condiciones descritas previamente. Para SAV2511 adicionalmente se realizó hibridación por *Southern Blot*. Los controles fueron los plásmidos pMBTn2 (digerido con *XhoI/XbaI*) y pMCTn1 (digerido con *EcoRI/XbaI*)

#### **5.3.1 Hibridación *Southern Blot*.**

Se aisló DNA de 6 colonias, se realizó electroforesis, se le removió el exceso de agarosa y se midieron sus dimensiones con el propósito de tener una menor superficie y emplear menos reactivo. Como sonda se utilizó el transposón Tn 5062.

Desnaturalización (Ver sección “Medios de cultivo y Soluciones”)

1. Se cubrió el gel con la solución de desnaturalización y se agitó en plataforma oscilatoria por 15 minutos.
2. Se decantó y se repitió esta acción
3. Se decantó y se lavó dos veces con agua destilada

Neutralización.

1. Se cubrió el gel con el regulador de neutralización, agitando por 20 minutos. Pasados 10 minutos se sumergió la membrana de nitrocelulosa en agua destilada\*.
2. Se decantó y se repitió.

Preparación del sistema.

1. Se cortó al tamaño:
  - (a) Membrana de Nitrocelulosa.

- (b) Papel filtro Whatman<sup>®</sup> (0.5 cm más grande que el gel).
  - (c) Máscara (0.5 más pequeña que el gel)
2. \* Se sumergió la membrana en agua destilada por 20 min (10 de los cuales ya pasaron)
  3. Se sumergió la membrana y el papel Whatman<sup>®</sup> en solución 10x SSC por 10 min.
  4. Se sumergió la esponja en 10x SSC.

*Blotting.*

1. Se preparó la cámara de hibridación, siguiendo el siguiente orden: el papel Whatman<sup>®</sup> (en el fondo), la membrana, la máscara, el gel y finalmente la esponja. Se mantuvo la esponja saturada de solución 10x SSC, hasta que dejara de gotear.
2. Se conectó la bomba y se ajustó a una presión de 75 mm de Hg por una hora.
3. Se apagó la bomba, se secó con papel filtro la membrana y se lavó la cámara con agua corriente caliente (Aproximadamente a 50° C).
4. Se secó la membrana a temperatura ambiente.
5. Se pasó la membrana a horno (80°C) por una hora; se colocó entre papel filtro.

Pre-hibridación.

1. Se preparó 10ml de solución de pre-hibridación.
2. Se enjuagó la membrana con agua destilada.
3. Se colocó una pieza de tela (muselina de preferencia) en una bandeja y se empapó con 2x SSC.
4. Se enrolló la tela con la membrana hacia adentro e insertó en los tubos de hibridación (enrollado de tal manera que la tela y la membrana quedaran pegadas a los lados de los tubos).
5. Se llenó hasta la mitad del tubo con solución 2x SSC y se empapó.
6. Se decantó la solución 2x SSC y se agregó la solución de pre-hibridación.
7. Se Incubó por una hora a 42°C

#### Hibridación.

1. Se desnaturalizó la sonda (transposón Tn5062) (Kieser *et al.* 2000) colocándola en baño de agua a ebullición por 10 min y posteriormente pasándola a hielo por 2 min.
2. Se decantó la solución de pre-hibridación.
3. Se agregó 10 ml de la sonda desnaturalizada al tubo de hibridación y se dejó toda la noche a 42°C.

#### Lavados.

1. Se recuperó la solución de la sonda para uso posterior.
2. Se Lavó dos veces por 5 min con la solución 1 que consiste en:
  - 24 ml de solución 20x SSC.
  - 2.4 ml de SDS.
  - 213.6 ml de agua destilada.

Preparar la solución agregando en el orden indicado.

3. A 68°C en el horno de hibridación, se lavó dos veces por 15 minutos en:
  - 1.2 ml de solución 20x SSC.
  - 236.4 ml de agua destilada.
  - 2.4 ml de SDS.

Preparar la solución agregando en el orden indicado.

#### Detección inmunológica.

1. Se lavó la membrana por un minuto con el Regulador 1 (en el horno de hibridación a 35°C).
2. Se lavó por 30 min con la solución de pre-hibridación.
3. Se lavó con regulador 1 por un min.
4. Se agregaron 3 µl de antidigoxigenina AP a 15 ml de regulador 1 y se pasó al tubo de hibridación por 30 min.

5. Se lavó en regulador 1 dos veces por 15 min para remover el anticuerpo sin unirse.

### **5.3.2 Evaluación bajo condiciones de estrés osmótico.**

Se realizó sembrando las colonias seleccionadas en medio SFM-MgCl<sub>2</sub> a una concentración final de 250 mM. Las colonias seleccionadas fueron de un diámetro aproximado de 2 mm y esporulando (aproximadamente entre 3 y 5 días)

### **5.4 Determinación de la producción de avermectinas.**

#### **5.4.1 Medio de Semilla y de Producción.**

Se inocularon en matraces Erlenmeyer de 500 mL, 20 µl de una suspensión de esporas (1x10<sup>6</sup> esporas/ml) en 200 ml de medio de semilla (Zhinan y Peili. C. 1999); las condiciones fueron: agitación a 250 rpm y 30 °C por 48 horas. Posteriormente se tomó una alícuota de 2 ml (2%) y se transfirieron a 200 ml de medio de producción (Mironov *et al* 2003). El cultivo se mantuvo por 10 días bajo las condiciones antes mencionadas. Se tomaron muestras los días 8, 9 y 10 para cuantificar producción (1.5 ml) y biomasa (1 ml). A los 14 días se recuperó el cultivo restante, se centrifugó 30 min a 12,000 rpm; biomasa y sobrenadante fueron almacenados a 4°C en frascos separados. Todos los cultivos se hicieron por duplicado.

#### **5.4.2 Evaluación de Avermectinas. Bioensayo con *Artemia salina*.**

Se llevó a cabo en recipientes de plástico con capacidad de 10 ml, usando abamectina (el cual contiene las fracciones con actividad biológica B1, B1a y B1b) en solución (Génesis®, concentración 1g/100 mL), de la cual se extrajo la abamectina tomando 500 µl de la solución Génesis® y 500 µl de acetonitrilo, se llevó a agitación (100 rpm y 28 C) se diluyó hasta tener una concentración final de 50,500 ng/mL (la

concentración de actividad biológica (parálisis) reportada es de 55,500ng, (Blizzard, A *et al.* 1988)). De esta solución se realizaron las siguientes diluciones:

Extracto de abamectina con acetoniitrilo ( $\mu\text{l}$ )	Acetoniitrilo al 100% ( $\mu\text{l}$ )	Suspensión de artemias ( $\approx 15$ ) ( $\mu\text{l}$ )	Concentración final (ng/mL)
5	545	450	459.13
4.5	545.5	450	413.22
4	546	450	367.30
3.5	546.5	450	321.39
3	547	450	275.48
2.5	547.5	450	229.56
2	548	450	183.65
1.5	548.5	450	137.74
1	549	450	91.82
0.5	549.5	450	45.91

Los bioensayos se realizaron por triplicado. Los “testigos” fueron sin extracto de abamectina y sin acetoniitrilo. Se evaluó el porcentaje de inmovilidad (número de artemias sin movimiento durante un periodo de 2 horas). El experimento se resume en la figura 12.

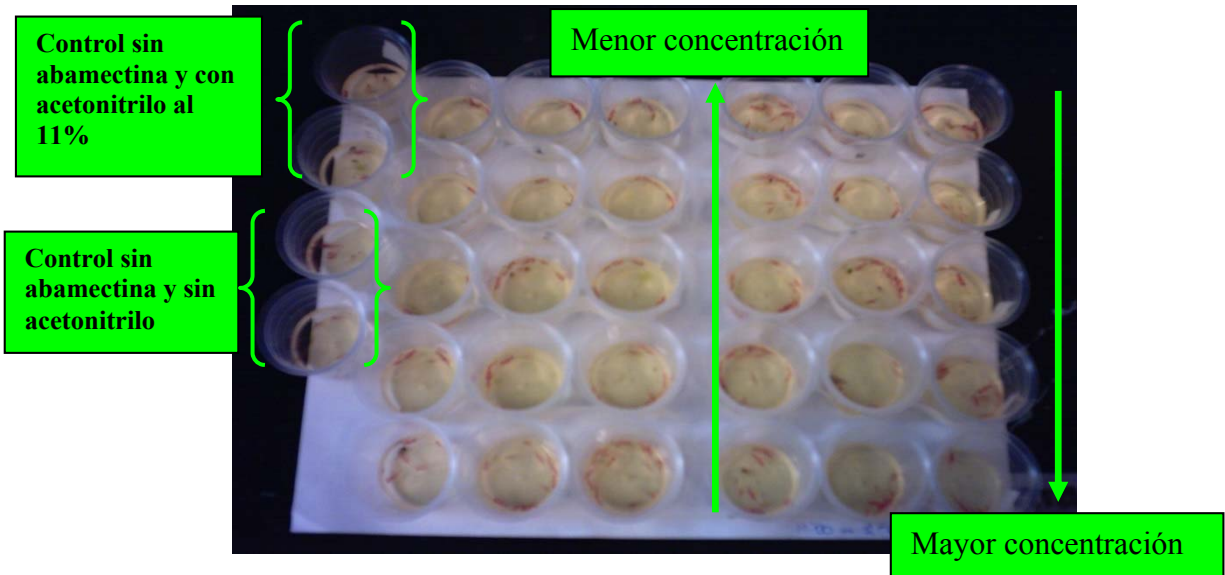


Fig. 12 Bioensayo con artemia. Se realizó utilizando diferentes concentraciones de abamectina y productos de fermentación. Para estos últimos se realizaron en condiciones con y sin estrés osmótico.

**5.4.3 Evaluación de Avermectinas. HPLC.**

Las concentraciones de avermectina fueron determinadas mediante HPLC (Waters, photodiode array 900). Se empleó una columna C18 Nova-pak (Waters, Ltd, USA: 3.9 mm diámetro interior, 150 mm longitud). Se preparó una solución estándar de abamectina (Sigma-Aldrich, PS2068) de 0.3 mg/mL. La elusión fue con metanol-agua (85:15 [vol/vol]) a una tasa de flujo de 0.8 ml/min a temperatura ambiente y condiciones isocráticas (Mironov et.al. 2003). Los experimentos se realizaron por triplicado empleando un análisis de varianza con una  $p < 0.05$ .

**5.5 Determinación de la producción de oligomicina.**

**5.5.1 Evaluación de oligomicina. Condiciones de cultivo.**

Se sembraron  $1 \times 10^6$  esporas en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 25 ml de medio fi ( $\Phi$ ) a pH=7. Se incubó a 30°C con agitación de 225 rpm por 17h o antes de que aparezca el pigmento café oscuro.

Posteriormente se sembraron 5 ml del cultivo en medio  $\phi$  en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 20 ml de medio de producción AP-5 a pH=6.9. Para cultivos en placa agregar agar bacteriológico (17 g/L). Esterilizar por autoclave y agregar 1 ml de solución de metales traza. Se incubaron los cultivos a 28°C con agitación de 225 rpm por 10 días.

### **5.5.2 Evaluación de oligomicina. Bioensayo con *A. niger* (A10).**

Se inocularon por extensión en superficie 200 ml de medio AP-5/agar en placa (230 mm x 15 mm), con  $1 \times 10^9$  esporas de *Aspergillus niger* (A10). Posteriormente se hicieron 15 pozos con un sacabocado (diámetro de 100 mm) y se agregaron 200  $\mu$ l del medio de producción, Se metieron a 4°C por 30 min y se incubaron a 30°C por 24 h o hasta observar crecimiento vegetativo. Se midieron los halos de inhibición.

El experimento anteriormente descrito fue realizado en condiciones de estrés osmótico, adicionando KCl a una concentración final de 250 mM. Los experimentos se realizaron por triplicado empleando un análisis de varianza de un factor con una  $\alpha=0.05$  (Pitman *et al.* 2002).

### **5.6 Complementación cruzada de las mutantes.**

Se realizó empleando el método de biobalística previamente descrito, utilizando los vectores pSFosab (contiene el gen *osaB* de *S. coelicolor*) y pSHosaC1 (contiene el gen *osaC* de *S. coelicolor*) para complementar  $\Delta SAV2511$  y  $\Delta SAV2513$ , respectivamente.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Selección de colonias de SAV2511 y SAV2513 Apramicina –resistente.

Para conocer si la interrupción de genes se llevó a cabo, se procedió a la selección de colonias. La siguiente sección muestra los resultados obtenidos.

La introducción de los vectores pMBTn2 y pMCTn1 a la cepa silvestre de *S. avermitilis* generó colonias con fenotipo de interés (apramicina-resistentes), seleccionando 6 colonias para *SAV2511* y *SAV2513* respectivamente (figura 13a y 13b).

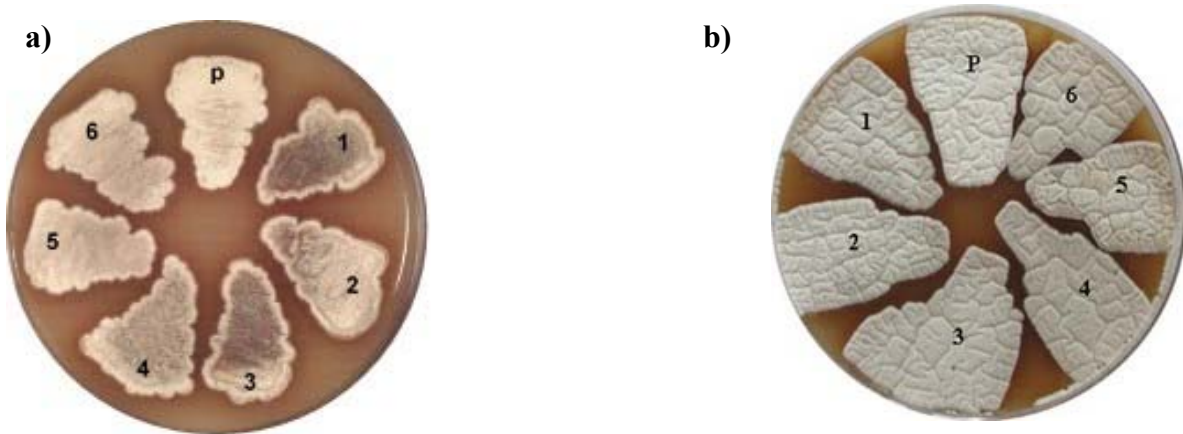


Figura 13. Selección de colonias con fenotipo de interés en medio SFM-Apramicina para *SAV2511* (a) y *SAV2513* (b). P= silvestre, 1-6 = seleccionadas. El medio utilizado fue sin apramicina.

### 6.2 Determinación de la interrupción del gene *SAV2511*. Southern Blot.

Con la realización de esta prueba, se comprobó la interrupción del gen *SAV2511* ( $\Delta$ *SAV2511*); la interrupción se da por recombinación homóloga.

El *southern blot* realizado a las seis colonias (Fig. 14) demostró la interrupción de *SAV2511* en todas. La prueba de la interrupción es mediante el tamaño de la sonda que se inserta en la sitio de digestión con la enzima *AatIII* (en este estudio fue el transposón con un peso de 3.4 Kb). Como control se utilizó pMBTn1 (carril C). No se incluyó DNA digerido de la cepa silvestre



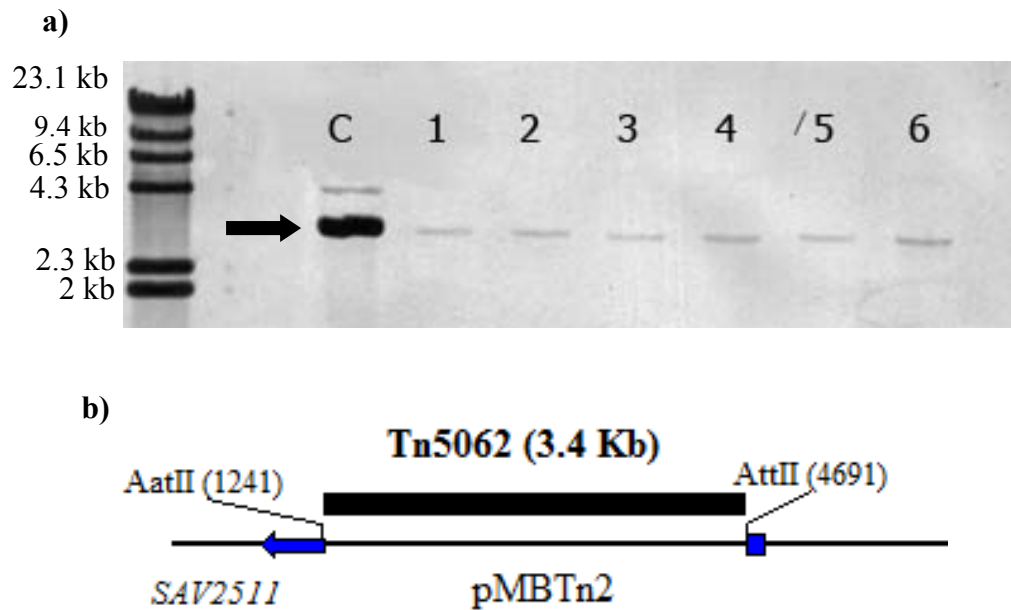


Figura 14. Análisis de las mutantes por *Southern blot*. Se comprobó la presencia de la sonda (transposón) en las mutantes seleccionadas, para *SAV2511* (Figura a). La flecha indica el tamaño esperado para el transposón Tn 5062 (3.4 Kb). Figura b. Mapa de restricción del control utilizado (pMBTn2)

### **6.2.1 Determinación de la interrupción del gene SAV2511. PCR.**

Para comprobar la presencia del gen interrumpido, se realizó un PCR de cada una de las colonias, lo cual confirma la presencia del gen interrumpido ( $\Delta$ SAV2511 y de  $\Delta$ SAV2513).

Bajo las condiciones descritas en la metodología, se demostró la presencia del fragmento en el sitio de inserción del transposón para las seis mutantes obtenidas (Fig. 15). La diferencia en tamaño entre pMBSa2L (control, carril 1) y las mutantes (carriles 2-7) se debe a que en las mutantes el transposón insertado interrumpe el tamaño total del gen.

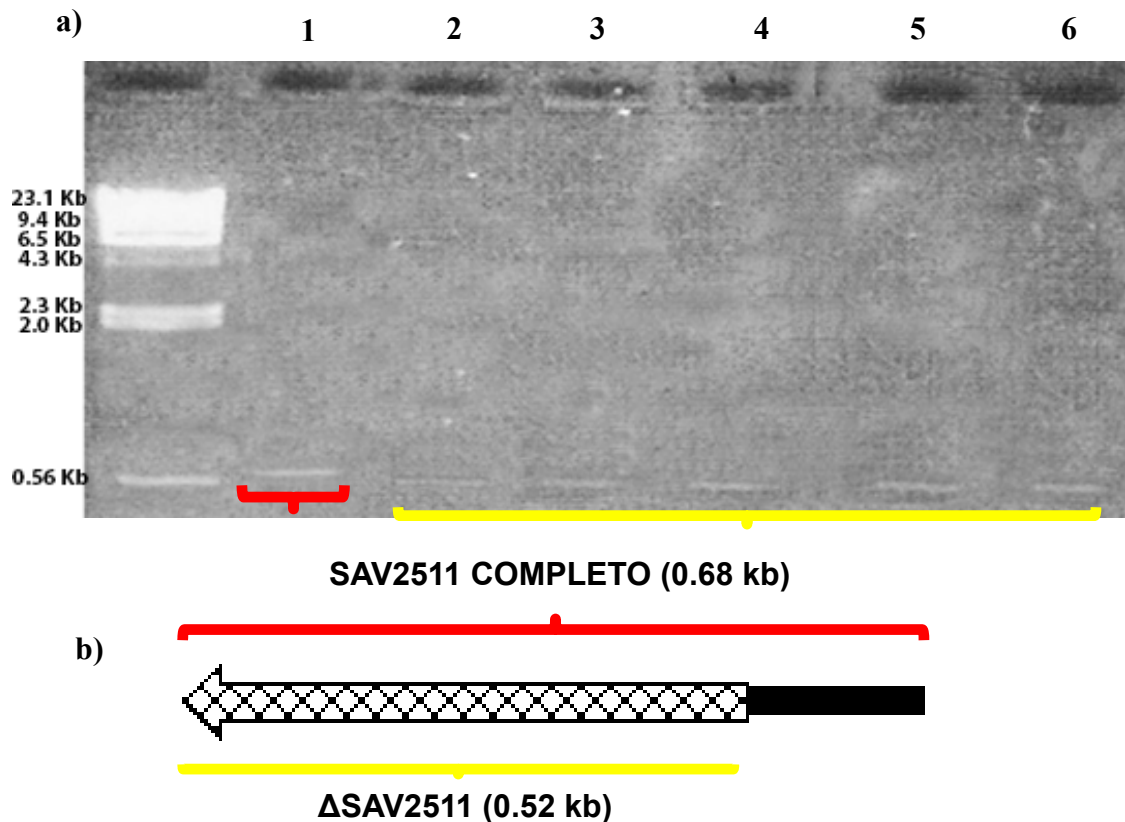


Figura. 15. Análisis de la mutante para *SAV2511* por PCR. El carril 1 (Figura a) muestra el gen *SAV2511* (0.68 Kb) contenido en el plásmido pMBSa2L representado por la línea roja (figura b). Los carriles 2-6 (figura a), muestran el producto de amplificación del DNA de las mutantes obtenidas (0.52 Kb), representado solo por la línea amarilla (figura b).

### 6.3 Determinación de la interrupción del gene SAV2513. PCR.

Bajo las condiciones mencionadas en la sección de materiales y métodos, se realizó el PCR. El resultado demuestra que el producto de amplificación de la mutante (Fig. 16, carril A) corresponde al tamaño del producto de PCR (~ 0.9 Kb) de la mutante seleccionada, mientras que en el producto de PCR para el control (Fig. 16, carril B) se obtuvo el producto correspondiente al clonado inicialmente en pME6 (2.1 Kb). Esto demuestra la interrupción del gen mediante la inserción del transposón.

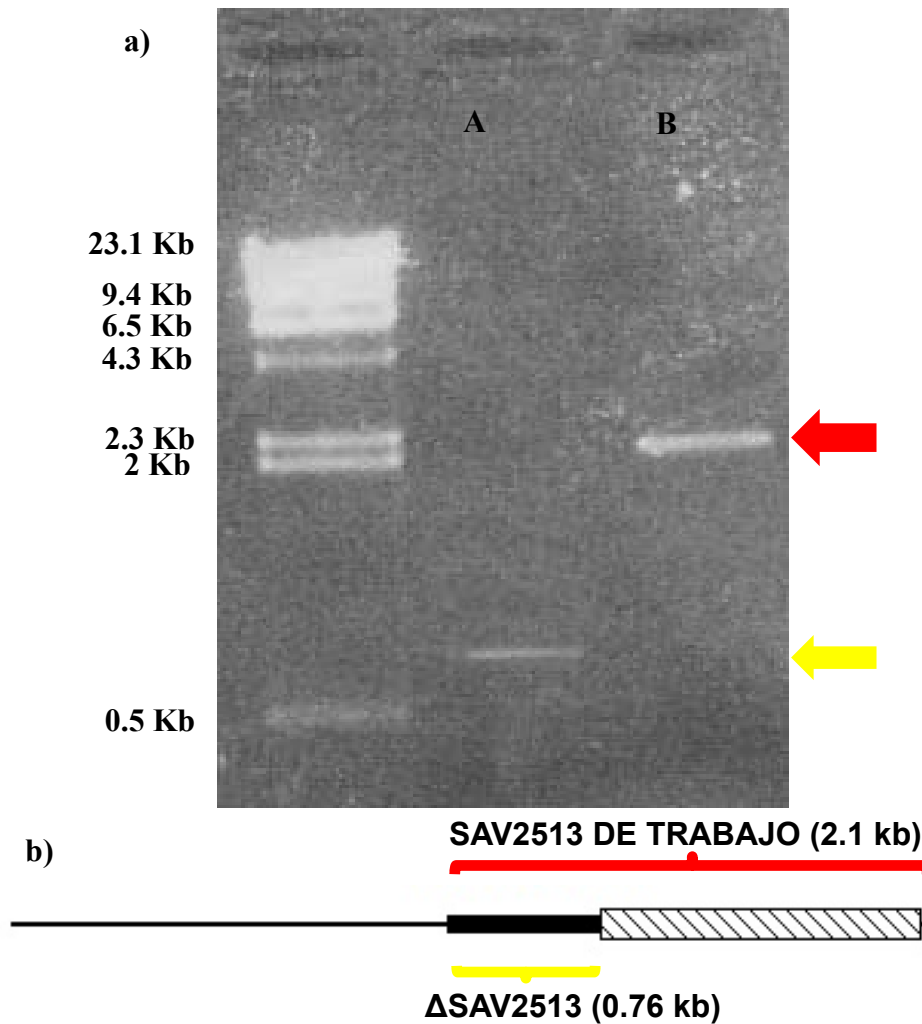


Figura. 15. Análisis de la mutante para *SAV2513* por PCR. El carril B (figura a) muestra el producto de amplificación del plásmido pMCSA1 (2.1 Kb) contenido el gen *SAV2513* representado por la flecha roja (figura b). El carril A (figura a), muestra el producto de amplificación del DNA de la mutante obtenida (0.76 Kb), representado por la flecha amarilla (figura b).

#### 6.4 Evaluación de la interrupción de $\Delta$ SAV2511 y $\Delta$ SAV2513 en condiciones de estrés osmótico.

Esta prueba se realizó con el propósito de determinar si  $\Delta$ SAV2511 y  $\Delta$ SAV2513 presentaba el fenotipo *bold* (calvo, sin producción de micelio aéreo) Para el caso de  $\Delta$ SAV2511, las 6 mutantes fueron incapaces de formar micelio aéreo cuando crecen en medio SFM al cual se le adiciona KCl 250 mM (figura 10 a). Para  $\Delta$ SAV2513, las 6 mutantes fueron incapaces de formar micelio aéreo en las condiciones descritas para  $\Delta$ SAV2511; sin embargo, la producción de pigmento fue mayor esto con respecto a lo observado para las mutantes de  $\Delta$ SAV2511 (Figura 10b)

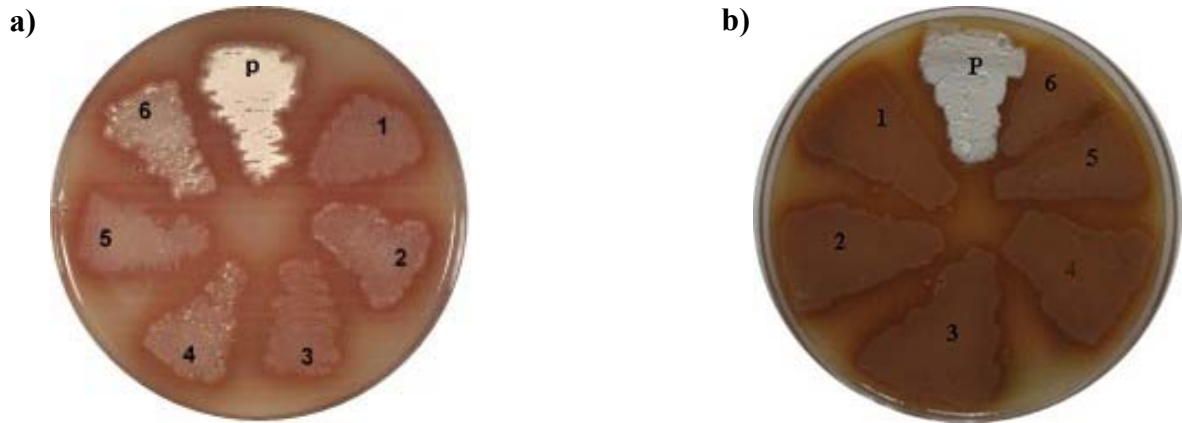


Figura. 17. Crecimiento de las mutantes en condiciones de estrés osmótico. La colonias de  $\Delta$ SAV25113 (Fig. a) y  $\Delta$ SAV25135 (Fig. b) seleccionadas, se resembraron en medio SFM-KCl 250 mM a 29° C por 5 días. P= silvestre, 1-6 =mutantes.

### 6.5 Bioensayo de *Artemia salina* con el producto de fermentación de $\Delta$ SAV2511. Curva patrón de avermectinas

Se realizó una curva patrón para conocer las concentraciones óptimas en la detección de avermectinas (Fig. 18a). Esta prueba se realizó para determinar la presencia de avermectinas en las fermentaciones bajo condiciones con y sin estrés osmótico. En  $\Delta$ SAV2511 se observó diferencia en cuanto a la inmovilidad que presentaba *A. salina* cuando se agregó el producto de fermentación en condiciones de estrés osmótico. La inmovilidad con el producto de fermentación en condiciones sin estrés osmótico fue menor con respecto al de estrés osmótico (Fig. 18b). El bioensayo fue realizado de acuerdo a lo reportado por Blizzard *et al* (1988)

### Relación entre la concentración de abamectina y movilidad

Fig. 18a

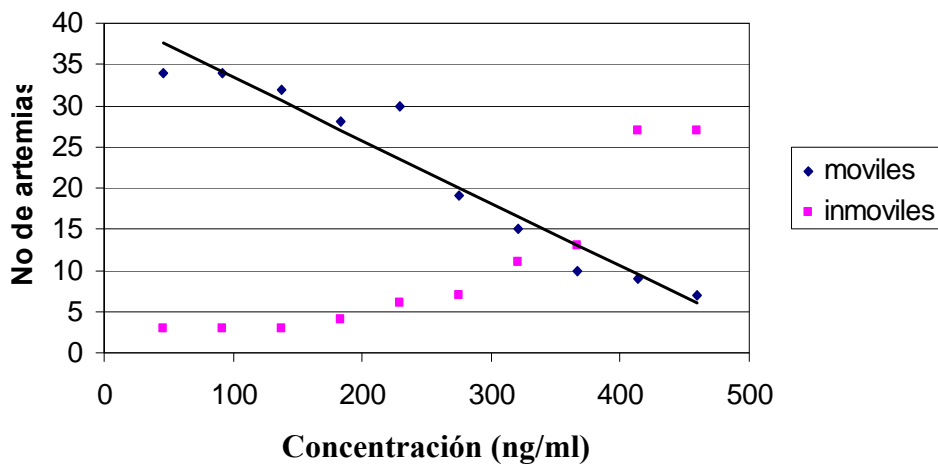


Fig. 18b

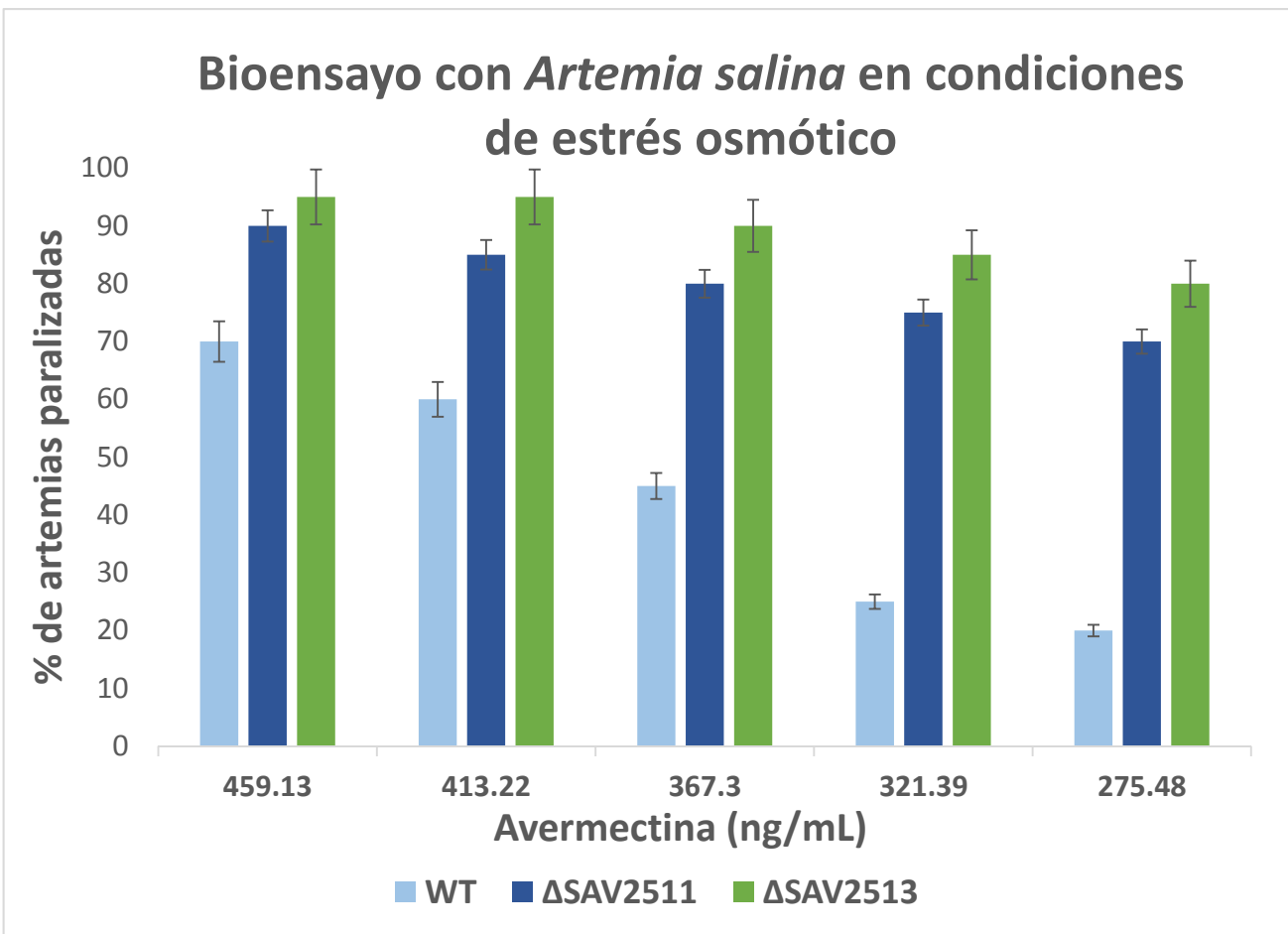


Figura. 18. Relación entre movilidad e inmovilidad de *Artemia salina* a diferentes concentraciones de avermectina. Las concentraciones utilizadas en este experimento (Fig. 18a) se encuentran en el rango reportado (Blizzard *et al*/1988) en relación a actividad mínima del compuesto a probar (440 y 110 ng/mL). La gráfica (Fig. 18b) muestra el rango de concentraciones probadas en condiciones de estrés osmótico. Se probaron los extractos con acetonitrilo y directo de las fermentaciones con las mutantes de  $\Delta$ SAV2511. Para los extractos tratados con solvente no se detectó inmovilidad de las artemias.





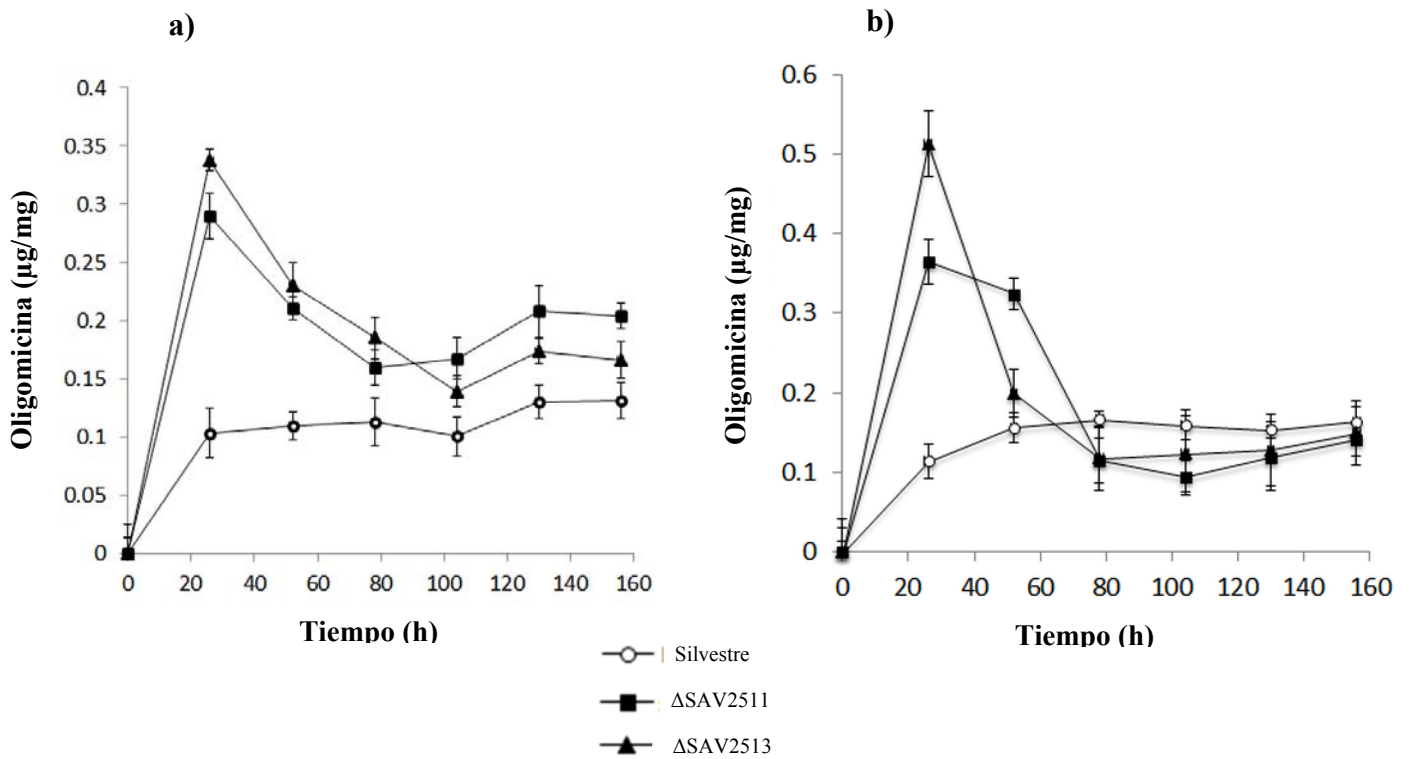


Figura 20. Cuantificación de la producción de oligomicina de los genes  $\Delta$ SAV2511 y  $\Delta$ SAV2513 en condiciones sin estrés osmótico (a) y con estrés osmótico (b). Se realizaron 2 experimentos independientes para cada cepa. La cantidad de oligomicina fue evaluada en producción específica ( $\mu\text{g}$  de antibiótico/mg de biomasa).

### [6.7 Determinación de la producción de avermectina mediante HPLC.](#)

Utilizando el método analítico de HPLC se realizó la prueba (Fig. 21), bajo las condiciones descritas en la metodología. A partir de los productos de fermentación en condiciones sin estrés osmótico, la producción de avermectina incrementó tanto en  $\Delta$ SAV2511 como  $\Delta$ SAV2513, esto con respecto a la cepa silvestre.



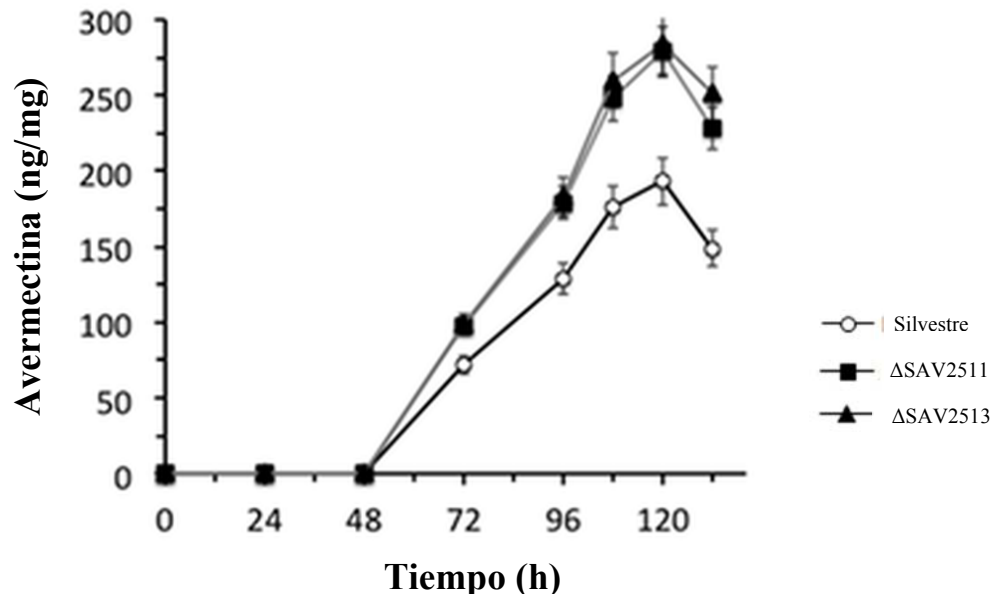


Figura. 21. Cuantificación de la concentración de avermectina B1a (ng/mg de peso de biomasa) a partir de los medios de fermentación por la cepa silvestre, mutante en el gen  $\Delta$ SAV2511 y  $\Delta$ SAV2513.

## 6.8 Complementación cruzada de los genes $\Delta$ SAV2511 y $\Delta$ SAV2513.

Dada la similitud a nivel de proteína entre los genes de *S. coelicolor* (*osaB* y *osaC*) y *S. avermitilis* (SAV2511 y SAV2513), se realizó la complementación con los genes procedentes de *S. coelicolor*.

Empleando el método de biobalística descrito en materiales y métodos, se observó una restauración del fenotipo original (formación del micelio aéreo) (Fig. 22a) cuando se complementó  $\Delta$ SAV2511 con el plásmido pSFosab (con el gen *osaB*, espectinomicina resistente). Para el caso de las mutantes de  $\Delta$ SAV2513, la complementación con el plásmido pSHosaC1 (con el gen *osaC*, higromicina resistente), no restauró la mutación (formación de micelio aéreo) (Fig. 22b).

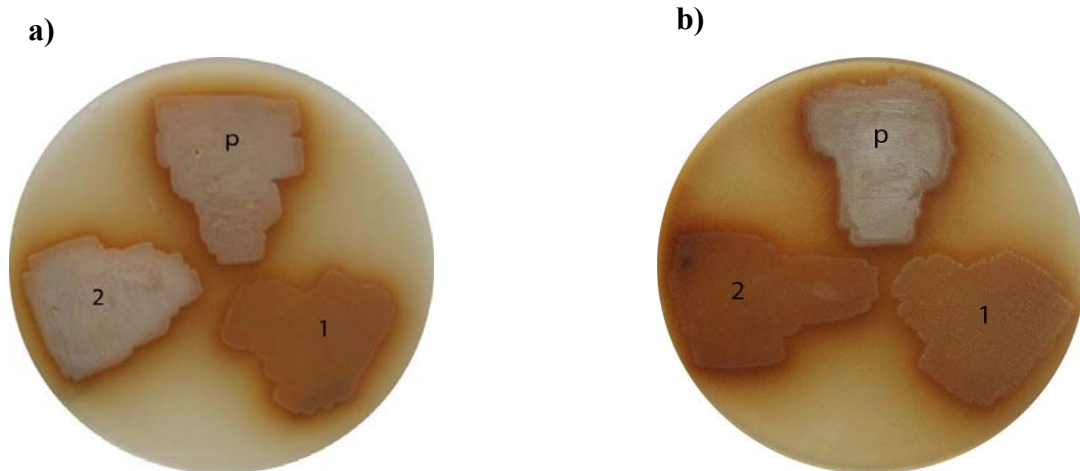


Figura 22. Complementación de la cepa mutante en los genes  $\Delta$ SAV25113 y  $\Delta$ SAV25135. Selección de 3 colonias con fenotipo de interés para  $\Delta$ SAV2511 (a) y  $\Delta$ SAV2513 (b) Los antibióticos de selección fueron espectinomicina para  $\Delta$ SAV2511 e higromicina para  $\Delta$ SAV2513. Se sembraron en medio SFM incubándose por 10 días a 30° C. Posteriormente, los cultivos fueron resembrados en medio SFM-KCl 250 mM a 29° C por 5 días. P, silvestre, 1 y 2 complementadas.

## 7. DISCUSIÓN

Durante el desarrollo del presente trabajo, el primer problema al que nos enfrentamos, fue la obtención de las cepas mutantes con los genes SAV2511 y SAV2513 interrumpidos, ya que bajo las condiciones reportadas para la transformación de *S. coelicolor*, los resultados fueron negativos. Por esta razón se consideró el método de biobalística como una alternativa. Existen pocos reportes del uso de biobalística sobre la introducción de DNA foráneo en bacterias y no hay datos o reportes en su uso para actinomicetos; de hecho, este método ha sido principalmente usado en células eucariotas, primordialmente en tejidos animales y vegetales (Colosimo *et al* 2000; Lorence y Verpoorte 2004; Chouaib *et al* 2016). En este trabajo, se utilizó una sola concentración de DNA, con una eficiencia de transformación de 20 colonias por  $\mu\text{g}$  de DNA. Esta concentración es baja, sin embargo, en algunos casos como el nuestro con una transformante es suficiente, y dado que por otros métodos no se logra la transformación, consideramos que este método es una muy buena alternativa. Adicionalmente la ventaja de la biobalística sobre otros métodos es que es muy simple en cuanto al tiempo de uso, así como a bajas concentraciones de de DNA. Con estas ventajas la biobalística podría ser un método eficaz para la introducción de DNA a actinomicetos difíciles de transformar.

En cuanto al método de interrupción de genes existen diferentes métodos, destacando el *Short Hairpin* RNA (shRNA), el cual ha probado ser un método eficiente en la interrupción de genes en células animales (Chris *et al* 2010 y Hirotaoka *et al* 2015). Para *Streptomyces* se ha optado por el uso de transposones, mediante su inserción en los sitios *att* (attach, unión) presentes en los actinomicetos (Huguet-Tapia *et al* 2014, Bishop *et al* 2004 y Pitman *et al.* 2002). La ventaja radica en que la interrupción se mantiene a lo largo de las generaciones (Bishop *et al* 2004 y Huguet-Tapia *et al* 2014), así como la generación de bibliotecas genómicas para la secuenciación completa del genoma de especies de *Streptomyces* (Bentley *et al* 2002 e Ikeda *et al* 2003).

La diferenciación y osmoadaptación son procesos que involucran cascadas de señales orientadas a adaptarse a cambios del medio ambiente (Talbot y Nicholas 1999), además están relacionados con el metabolismo secundario (Bibb 2005). Con base en el alto grado de similitud con los genes de *S. coelicolor* (*osaB* y *osaC*) que se sabe están involucrados en esas cascadas de señalización, los genes *SAV2511* y *SAV2513* fueron interrumpidos con el fin de determinar si están involucrados en el proceso de diferenciación y osmoadaptación, así como la producción del antiparasitario avermectina y el agente antitumoral oligomicina. El método de interrupción fue por medio de la inserción del transposón Tn5062 en un sitio específico de los genes *SAV2511* y *SAV2513*. Las mutantes resultantes fueron incapaces de formar micelio aéreo en condiciones de estrés osmótico, inducido mediante la adición de un osmolito iónico (KCl) al medio de esporulación. En *S. coelicolor*, la interrupción de los genes *osaB* y *osaC*, provoca el fenotipo *bld* en condiciones de estrés osmótico; resultado similar fue encontrado en mutantes de *S. lividans* (Bishop *et al* 2004).

La respuesta al estrés osmótico producto del incremento de la osmolaridad en la fase de crecimiento requiere de factores de transcripción denominados factores  $\sigma$  (Ait-Ouazzou *et al* 2012; Jiang *et al* 2011 de Been *et al* 2011 y Fernández-Martínez *et al* 2009). En los géneros *Bacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus* y *Actinomyces*, el factor  $\sigma$  es una pieza clave en el control de la expresión de genes (de Been *et al* 2011). En *S. coelicolor* la inducción a la respuesta al estrés osmótico podría ser resultado del incremento en la síntesis tanto de  $\sigma^B$  como de su antagonista (Cho *et al* 2001), adicionalmente se ha reportado a *osaC* como un gen involucrado en la osmoregulación (Fernández-Martínez *et al* 2009). En *S. avermitilis*, los resultados de estrés osmótico en  $\Delta SAV2513$  y la similitud en su secuencia que presenta a *osaC*, sugieren una función similar entre ambos genes con respecto a la osmoadaptación y respuesta al estrés osmótico (de Been *et al* 2011).

Por otra parte, con las mutantes  $\Delta SAV2511$  y  $\Delta SAV2513$ , en condiciones osmóticas normales, no se observó un aumento en la producción de pigmento (melanina) en ninguna de ellas, con respecto a la cepa

parental. Sin embargo, en condiciones de estrés osmótico, si se observó un aumento en la pigmentación por parte de ambas mutantes ( $\Delta SAV2511$  y  $\Delta SAV2513$ ) en relación con la cepa parental, lo que sugiere una modificación en la regulación del metabolismo de la tirosina hacia el pigmento melanina (Denoya *et al* 1994). Por su parte, cuando se evaluó el metabolito secundario oligomicina, perteneciente a la familia de los antibióticos macrólidos y codificado en un *cluster* independiente (Omura *et al* 2001), de igual forma, bajo condiciones sin estrés osmótico no se observaron diferencias significativas (análisis de varianza) en la producción de ambas mutantes con respecto a la cepa parental. Sin embargo, en condiciones de estrés osmótico, la producción de oligomicina para  $\Delta SAV2513$  presenta una diferencia significativa mayor ( $p < 0.05$ ) en cuanto a la producción con respecto a  $\Delta SAV2511$  y cepa silvestre. Los resultados de producción de oligomicina, más los cambios fenotípicos en condiciones de estrés osmótico, sugieren la alteración de la compleja red de precursores y factores de transcripción (Khan *et al* 2011 y Li W *et al* 2006). Se seleccionaron los bioensayos con *Artemia salina* y *A. niger* por ser métodos sensibles y de fácil empleo; en el caso del bioensayo con *Artemia salina* la cuantificación de avermectinas puede ser detectada en la magnitud de nanogramos (Blizzard *et al* 1988). En cuanto a la detección de oligomicina, la técnica se basa en la sensibilidad que presenta *A. niger* al antibiótico (Acuña *et al* 1995 y Pitman *et al* 2002).

Desde un punto de vista aplicado y biotecnológico, la interrupción de estos genes mostró incrementos significativos en la producción de avermectina y oligomicina, en este sentido existen diversos trabajos en cuanto al incremento en la producción de avermectinas. Se ha reportado un incremento del 22% al 42% de avermectina, esto en mutantes para el gen aveM (gen perteneciente al *cluster* biosintético) (Wenshuai *et al* 2015). Otro trabajo reporta un incremento de producción de avermectina, fracción B1a de  $3450 \pm 65$   $\mu\text{g/ml}$ , en mutantes para AVET27 (Zhang *et al* 2015). En otro trabajo, se reporta un incremento en el orden de gramos (3.45 a 4.0 g/L), esto cuando se incrementa el número de copias del gen avtAB (Qiu *et al* 2011). En contraste a los anteriores reportes, el presente trabajo reporta un incremento del 37% en la

producción de avermectina (285 ng) con respecto a la cepa silvestre, sin embargo cabe mencionar que los anteriores reportes se trabajan con genes del *cluster* biosintético, mientras que el presente trabajo es con genes fuera del *cluster*, lo cual afecta los resultados debido a la compleja red de genes e intermediarios metabólicos que presentan estos genes (SAV2511 y SAV2513) (Khan *et al* 2011); (Fernández-Martínez *et al* 2009 y de Been *et al* 2011).

El gen *SAV2511* se ha reportado como un posible regulador de la respuesta

(<http://avermitilis.ls.kitasato-u.ac.jp/>); los resultados mostrados en el presente trabajo en relación a la interrupción del gen *SAV2511* sugieren la relación existente entre la diferenciación morfológica y el incremento en la producción de metabolitos secundarios. Para el caso de *SAV2513*, está reportado como un gen con 3 dominios GAF (dominio de unión a proteína), 2 PAS (proteína sensora o de señalización), un SPOIIE (proteína necesaria para la formación de la espora) y una HTPasa (proteína de unión a ATP) (<http://avermitilis.ls.kitasato-u.ac.jp/>) (Dutta *et al* 2000). La interrupción de *SAV2513* en el aminoácido 379 (determinado mediante el sitio de inserción del transposón) inactivó el dominio GAF, familia cuyas funciones biológicas son: respuesta a cambios energéticos o metabólicos, tanto en el medio ambiente como dentro de la célula o transducción de señales hacia respuestas adaptativas como la osmorregulación (Hurley 2003; Henry y Crosson 2011; Stefano y Viollier 2015). En consecuencia, y de acuerdo a los resultados presentados, la inactivación de este dominio tiene como consecuencia la alteración de la función normal del gen, observándose su efecto en el aumento en la producción de metabolitos (oligomicina).

Al realizar la complementación cruzada (pSFosab y pSHosaC1) de  $\Delta$ *SAV2511* y  $\Delta$ *SAV2513* respectivamente, se recuperó el fenotipo para *SAV2511*, lo cual indica una posible misma función de ambos genes en diferentes especies de actinomicetos. Sin embargo, para  $\Delta$ *SAV2513* no se pudo restaurar el fenotipo. Dada la similitud a nivel de proteína entre ambas especies (91% para SAV2511 y 89% para

SAV2513), se esperaría la restauración del fenotipo para SAV2513, sin embargo, se ha reportado en *S. coelicolor* que la capacidad de restaurar el fenotipo para un gen inactivado, es dependiente del sitio de la mutación (Fernández-Martínez *et al* 2009).

El modelo presentado en la figura 23 (Fernández-Martínez *et al* 2009 y de Been *et al* 2011); (el presente trabajo) sobre la regulación de la actividad de *osaC* (*S. coelicolor*) y SAV2513 (*S. avermitilis*) propone a la HATPasa como un multi-dominio regulatorio en especies de *Streptomyces*, incluyendo el grupo de factores sigma ( $\sigma$ ). Este dominio confiere a *osaC*, actividad de factor anti-sigma, necesaria para regular la actividad del factor sigma sigB, subsecuente a la respuesta del estrés osmótico (Fernández-Martínez *et al* 2009). Una vez recuperada las condiciones fisiológicas iniciales (sin estrés) *osaC* (*S. coelicolor*) o SAV2513 (*S. avermitilis*) funcionan como antagonistas del factor sigma ( $\sigma^B$ ), regulando la expresión de *osaC* o SAV2513, respectivamente. La incapacidad de restaurar el fenotipo en *S. avermitilis*, empleando el gen de *S. coelicolor* (pSHosaC1) puede ser consecuencia de la divergencia de los blancos moleculares, ya que las respectivas proteínas sigB, presentaron una similitud del 78%. El interés actual (Thuan *et al* 2014 y Zhang *et al* 2015) se enfoca hacia los genes que pueden estar involucrados en la diferenciación y producción de metabolitos secundarios, con aplicaciones en la industria, medicina o alimentos, así como los que se encuentren fuera de los *clusters* biosintéticos, debido a su importante papel en la regulación global del metabolismo secundario. SAV2511 y SAV2513 son genes implicados en la transducción de señales y en la regulación de diferentes procesos, como la diferenciación y el inicio del metabolismo secundario

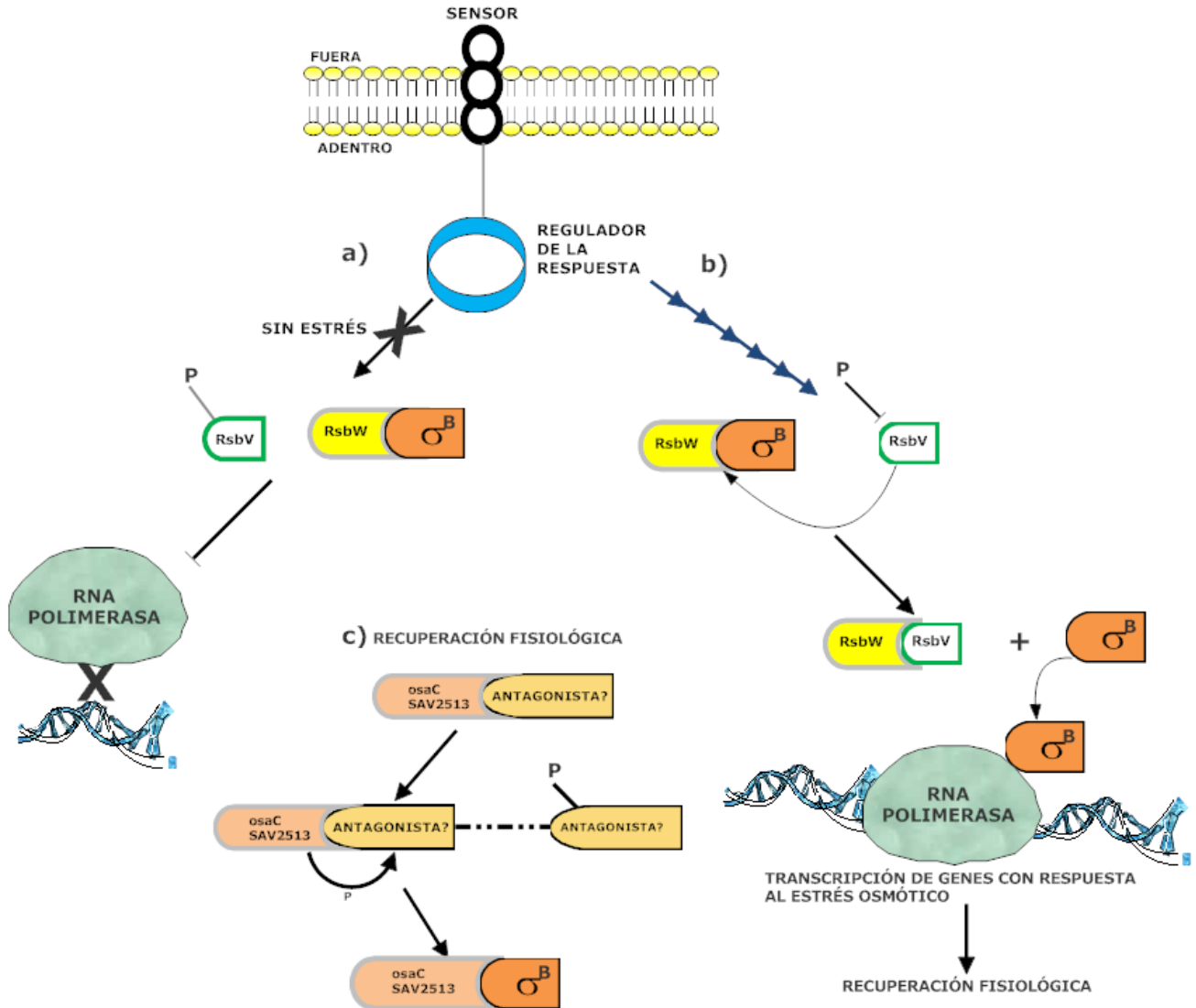


Fig. 23. Mecanismo de regulación de SAV2513. El regulador de la respuesta puede generar 2 respuestas a) en respuesta en que no hay estrés osmótico el factor  $\sigma$  permanece unido a su antagonista (RsbW) y no hay transcripción de los genes de respuesta a estrés osmótico. En condiciones de estrés osmótico (b), RsbV (anti-anti antagonista de RsbW) se desfosforila y se une a RsbW, liberando al factor  $\sigma^B$  (factor de transcripción) cuya función es activar genes en respuesta al estrés osmótico. Se ha propuesto que una vez recuperada las condiciones fisiológicas iniciales, se activa un tercer mecanismo (c) en donde *osaC* (*S. coelicolor*) o SAV2513 (*S. avermitilis*) funciona como antagonista de  $\sigma^B$  en respuesta a la recuperación fisiológica. (de Been *et al.* 2011; Fernandez M *et al.* 2009).



## 8. CONCLUSIONES.

El presente trabajo demostró que:

- El método de biobalística empleado en el presente trabajo demostró ser un método efectivo en la introducción de DNA en *Streptomyces avermitilis*.
- La interrupción de genes por transposones en *Streptomyces* es una efectiva técnica, alternativa al tradicional *knock out*
- La interrupción en la función de los genes *SAV2511* y *SAV2513*, tiene como consecuencias cambios en la morfología cuando crecen en condiciones de estrés osmótico (incapacidad para formar micelio aéreo).
- Su interrupción tiene por consecuencia el incremento en la producción de avermectina y oligomicina.
- La complementación cruzada del gen *SAV2511* restaura su fenotipo; para el gen *SAV2513*, no hay restauración del fenotipo
- El gen *SAV2513* funciona como antagonista de factor  $\sigma^B$  regulando la respuesta al estrés osmótico.

## 9. PERSPECTIVAS.

- La interrupción de los genes *SAV2511* y *SAV2513* puede ser usada como parte de un programa de mejoramiento genético para incrementar la producción de avermectinas y oligomicina.
- La función de los genes *SAVB* y *SAVC*, puede ser extrapolada hacia otros actinomicetos de importancia industrial.
- La complementación homóloga proporcionaría información adicional sobre la función de ambos genes

## 10. BIBLIOGRAFÍA

Acuña-Arguelles, M.E., Gutierrez-Rojas, M., Viniegra-Gonzalez, G., and Favela-Torres, E. (1995). Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 43, 808-814.

Arena, J. P., Liu, K. K., Paress, P. S y Cully, D. F. (1991). Avermectin-sensitive chloride currents induced by *Caenorhabditis elegans* RNA in *Xenopus oocytes*. *Mol. Pharmacol* 40, 368-374.

Bekker Valerie, Dodd, Amanda Brady and Karl Rumbold. (2014). Tools for metabolic engineering in *Streptomyces*. *Bioengineered* 5:5, 293–299.

Bentley, S. D., Charter, K. F., Cerdeno-Tarraga y 40 other authors. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2) *Nature*, 417, 141-147

Bibb, J. Mervin. (2005). Regulation of secondary metabolism in *streptomycetes*. *Curr Opin Microbiol* 8. 208-215.

Bishop, A., Fielding, S., Dyson, P., and Herron, P. (2004). Systematic insertional mutagenesis of a *streptomyces* genome: a link between osmoadaptation and antibiotic production. *Genome Res* 14, 893-900.

Blizzard, A. T., Ruby, L. C., Mrozik. H., Preiser, A. F y Fisher, H. M. (1988). Brine shrimp (*Artemia salina*) as a convenient bioassay for avermectin analogs. *J. Antibiotics* XLII, 8. 1304-1307.

Bullock, J. D. (1961). Intermediary metabolism and antibiotic synthesis. *Advances in Applied Microbiology* 3, 293-342.

Burg, W. Richard., Miller, M. Brinton., Baker, E. Edward., Birnbaum, Jerome., Currie, A. Sara., Hartman, Robert., Kong, Lin-Yu., Monaghan, L. Richard., Olson, George., Putter Irving., Tunac, B. Josefino., Wallick, Hyman., Stapley, O. Edward., Oiwa, Ruiko y Omura, Satoshi. (1979). Avermectins, New family of potent agents: Producing organism and fermentation. *Antimicrob Agents Chemother* 15:3. 361-367.

Cane, D. E., Liang, T. C., Kaplan, L., Nallin, M, K., Schulman, M. D., Hensens, O, D., Douglas, A. W y Albers-Schonberg, G. (1983). Biosynthetic origin of the carbon skeleton and oxygen atoms of the avermectins. *J. Amer. Chem. Soc* 105, 4110-4112.

Chater K. F., M. J. Bibbs (1997) *Products of Secondary Metabolism*, VCH, Weinheim pp. 57-105.

Chen, Y., Smanski, M.J., and Shen, B. (2010). Improvement of secondary metabolite production in *Streptomyces* by manipulating pathway regulation. *Appl Microbiol Biotechnol* 86, 19-25.

Chouaib Meziadi, Sophie Blanchet, Manon M.S. Richard, Marie-Laure Pilet-Nayel, Valerie Geffroy y Stephanie Pflieger. (2016). Bean pod mottle virus: a new powerful tool for functional genomics studies in *Pisum sativum*. *Plant Biotechnol. J* pp. 1–11.

Chris B. Moore, Elizabeth H. Guthrie, Max Tze-Han Huang, y Debra J. Taxman. (2010). Short Hairpin RNA (shRNA): Design, Delivery, and Assessment of Gene Knockdown. *Methods Mol Biol* 629: 141–158.

Colosimo, A., Goncz, K.K., Holmes, A.R., Kunzelmann, K., Novelli, G., Malone, R.W., Bennett, M.J., and Gruenert, D.C. (2000). Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells. *BioTechniques* 29, 314-318, 320-312, 324 passim.

Dadzie Y. R. Hopkins y M. Neira. (2002) Final report of the Conference Eradicability of Onchocerciasis. Atlanta, Georgia, USA.

de Been. M, Francke. C, Siezen. R and Abee. T. (2011). Novel sB regulation modules of Gram-positive bacteria involve the use of complex hybrid histidine kinases. *Microbiol* 157: 3–12.

Dutta, R., and Inouye, M. (2000). GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. *Trends in biochemical sciences* 25, 24-28.

Egerton, J. R., Ostlind, D. A., Blair, L. S., Eary, C. H., Suhayda, D., Cifelli, S., Riek, R. F y Campbell, W. C. (1979). Avermectins, a new family of potent anthelmintic agents: Efficacy of the B1a component. *Antimicrob Agents Chemother* 15, 372-378.

Elliot, A. Marie y Talbot, J. Nicholas. (2004). Building filaments in the air: aerial morphogenesis in bacteria and fungi. *Curr Opin Microbiol* 7. 594-601.

Fernandez Martinez, L., Bishop, A., Parkes, L., Del Sol, R., Salerno, P., Sevcikova, B., Mazurakova, V., Kormanec, J., and Dyson, P. (2009). Osmoregulation in *Streptomyces coelicolor*: modulation of SigB activity by OsaC. *Mol Microbiol* 71, 1250-1262.

Flett, F., Mersinias, V., and Smith, C.P. (1997). High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes. *FEMS microbiology letters* 155, 223-229.

Goryshin, Y. Igor y Reznikoff, S. Williams. Tn5 in vitro transposition. (1998). *J Biol Chem* 273, 7367-737.

Hemingway J. and H. Ranson. (2000) Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu. Rev. Entomol* 45:371–391.

Henry JT, Crosson S. (2011). Ligand-binding PAS domains in a genomic, cellular, and structural context. *Annu Rev Microbiol* 65:261–286..

Hiroataka Matsuo, Yoshiyuki Kondo, Takashi Kawasaki, Shinji Tokuyama y Nobutaka Imamura. (2015). Borrelidin Isolated from *Streptomyces* sp. Inhibited Adipocyte Differentiation in 3T3-L1 Cells via Several Factors Including GATA-Binding Protein 3. *Biol. Pharm. Bull* 38, 1504–1511.

Hoch, J.A. and Silhavy, T.J. (1995) Two-Component Signal Transduction, ASM Press.

Huguet-Tapia JC, Bignell DRD, Loria R. (2014). Characterization of the Integration and Modular Excision of the Integrative Conjugative Element PAISt in *Streptomyces turgidiscabies* Car8. *PLoS ONE* 9(6): e99345.

Ikeda Haruo., Ishikawa Jun., Hanamoto Akiharu., Shinose Mayumi., Kikuchi Hisashi., Shiba Tadayoshi., Skaki Yoshiyuki., Hattori Masahira and Omura Satoshi. (2003). Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotech* 21, 526-531.

Ikeda. H., Kazuo Shin-ya and Omura. S. (2014). Genome mining of the *Streptomyces avermitilis* genome and development of genome-minimized hosts for heterologous expression of biosynthetic gene clusters. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 41:233–250.

Kelley, S. W., L. Harris, M. A. Alexander, and L. S. Olsen. (1960). Hygromycin B for removing *Thysanosoma actinioides*, fringed tapeworms from feedlot lambs. *J. Am. Vet. Med. Assoc* 136:505-507.

Khan ST. (2011). *Streptomyces* associated with a marine sponge *Haliclona sp.*; biosynthetic genes for secondary metabolites and products. *Environ Microbiol Black Sci Pub*13:391–403.

Kieser, T., Bib, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., and Hopwood, D.A. (2000). *Practical Streptomyces Genetics* (Norwich, UK: John Innes Foundation).

Kim, D. & Forst, S. (2001). Genomic analysis of the histidine kinase family in bacteria and archaea. *Microbiol* 147, 1197–1212.

Kimball's biology pages: Transposons  
<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/T/Transposons.htmlml>).

- Komatsu, M., Uchiyama, T., Omura, S., Cane, D.E., and Ikeda, H. (2010). Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *107*, 2646-2651.
- Lamb DC, Ikeda Nelson DR, Ishikawa J, Skaug T, Jackson C, Omura S, Waterman MR, Kelly SL (2003) Cytochrome P450 complement of the avermectin-producer *Streptomyces avermitilis* and comparison to that of *Streptomyces coelicolor* A3(2). Biochem Biophys Res Commun *307*:610–619.
- Lee, E.J., Karoonuthaisiri, N., Kim, H.S., Park, J.H., Cha, C.J., Kao, C.M., and Roe, J.H. (2005). A master regulator sigmaB governs osmotic and oxidative response as well as differentiation via a network of sigma factors in *Streptomyces coelicolor*. Mol Microbiol *57*, 1252-1264.
- Letunic, I., Doerks, T., and Bork, P. (2012). SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. Nucleic acids research *40*, D302-305.
- Li W, Ying X, Guo Y, et al. (2006). Identification of a gene negatively affecting antibiotic production and morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). J Bacteriol. *188*:8368–75.
- Lorence, A., and Verpoorte, R. (2004). Gene transfer and expression in plants. Methods in molecular biology *267*, 329-350.
- MacNeil, D. J. (1988). Characterization of a unique methyl-specific restriction system in *Streptomyces avermitilis*. J. Bac. *170*, 5607-5612.
- Marsden, A. F. A., Wilkinson, B., Cortes, J., Dunster, N. J., Staunton, J y Leadlay, P. F. (1998). Engineering broader specificity into an antibiotic-producing poliketide synthase. Science *279*. 199-202.
- McArthur, M., and Bibb, M.J. (2008). Manipulating and understanding antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2) with decoy oligonucleotides. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *105*, 1020-1025.
- Miller., J. R. Davey., D. Oehler., M. Pound y J. George. (2001) The Ivomec SR Bolus for Control of *Boophilus annulatus* (Acari: Ixodidae) on Cattle in South Texas. J. Econ. Entomol. *94*(6): 1622-1627.
- Mironov, et.al. (2003) Dependence of the composition of the avermectin complex of *Streptomyces avermitilis* on the Glucose Content in the medium. Appl Microbiol Biotechnol *39*. **2**. 183-187.

- Miyamoto Kiyoko T., Kitani Shigeru., Komatsu Mamoru., Ikeda Haruo and Nihira Takuya. (2011). The autoregulator receptor homologue AvaR3 plays a regulatory role in antibiotic production, mycelial aggregation and colony development of *Streptomyces avermitilis*. *Microbiol* 157, 2266–2275.
- Nguyen Huy Thuan., Ramesh Prasad Pandey and Jae Kyung Sohng. (2014). Recent advances in biochemistry and biotechnological synthesis of avermectins and their derivatives. *Appl Microbiol Biotechnol.* 98:7747–7759.
- Novotna, J., Vohradsky, J., Berndt, P., Gramajo, H., Langen, H., Li, X.M., Minas, W., Orsaria, L., Roeder, D., and Thompson, C.J. (2003). Proteomic studies of diauxic lag in the differentiating prokaryote *Streptomyces coelicolor* reveal a regulatory network of stress-induced proteins and central metabolic enzymes. *Mol Microbiol* 48, 1289-1303.
- Olano, C., Lombo, F., Mendez, C., and Salas, J.A. (2008). Improving production of bioactive secondary metabolites in actinomycetes by metabolic engineering. *Metabolic engineering* 10, 281-292.
- Omura S, Ikeda H, Ishikawa J, et al. (2001). Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proc Natl Acad Sci.*98:12215–20.
- Ortiz de Orué Lucana D1, Groves MR. (2009). The three-component signalling system HbpS-SenS-SenR as an example of a redox sensing pathway in bacteria. *Amino Acids* 37(3):479-86.
- Ou X, Zhang B, Zhang L, Dong K, Liu C. (2008). SarA influences the sporulation and secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* M145. *Acta Biochim Biophys Sin.*40:877–82.
- Patzer SI, Volkmar B. (2010). Gene cluster involved in the biosynthesis of griseobactin, a catechol-peptide siderophore of *Streptomyces sp.* ATCC 700974. *J Bacteriol.*192:426–35.
- Pitman, A., Herron, P., and Dyson, P. (2002). Cointegrate resolution following transposition of Tn1792 in *Streptomyces avermitilis* facilitates analysis of transposon-tagged genes. *J. Microbiol. Methods* 49, 89-96.
- Qiu J, Zhuo Y, Zhu D, Zhou X, Zhang L, Bai L, Deng Z. (2011). Overexpression of the ABC transporter AvtAB increases avermectin production in *Streptomyces avermitilis*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 92(2):337-45.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

- Samia Siddique., Quratulain Syed., Ahmad Adnan and Fahim Ashraf Qureshi. (2014). Production and Screening of High Yield Avermectin B1b Mutant of *Streptomyces avermitilis* 41445 Through Mutagenesis. *Jundishapur J Microbiol.* 7(2): e8626.
- Schatz, A., Bugie, E y Waksman, S. A. (1994). Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Proc. Soc. Exp. Biol and Med* 55, 66-69.
- Schauer, A. T., Nelson, A. D. y Daniel, J. B. (1991) Tn4563 transposition in *Streptomyces coelicolor* and its application to isolation of new morphological mutants. *J. Bac* 173, 5060-5067.
- Schauer, A., Santamaria, R., Raney, Guijarro, J y Losick, R. (1988). Visualizing gene expression in time and space during morphological differentiating in *Streptomyces coelicolor*. *Heredity* 61, 276-277.
- Sevcikova, B., and Kormanec, J. (2004). Differential production of two antibiotics of *Streptomyces coelicolor* A3(2), actinorhodin and undecylprodigiosin, upon salt stress conditions. *Archives of microbiology* 181, 384-389.
- Sigel, E y Baur, R. (1987). Effect of avermectin-B1a on chick neuronal gamma-aminobutyrate receptor channels expressed in *Xenopus oocytes*. *Mol. Pharmacol* 32, 749-752.
- Stefano Sanselicio, Patrick H. Viollier. (2015). Convergence of Alarmone and Cell Cycle Signaling from Trans-Encoded Sensory Domains. *MBio.* 6(5):e01415-15.
- Stock, A.M. et al. (2000) Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 183–215
- Talbot, J. Nicholas. (1999). Coming up for air and sporulation. *Nature* 398. 295-296.
- Thomas, L., Hodgson, D.A., Wentzel, A., Nieselt, K., Ellingsen, T.E., Moore, J., Morrissey, E.R., Legaie, R., Consortium, S., Wohlleben, W., et al. (2012). Metabolic switches and adaptations deduced from the proteomes of *Streptomyces coelicolor* wild type and phoP mutant grown in batch culture. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 11, M111 013797.
- Thuan NH, Pandey RP, Sohng JK. (2014). Recent advances in biochemistry and biotechnological synthesis of avermectins and their derivatives. *Appl Microbiol Biotechnol.* 18:7747-59.
- Vicente C., M., J. Santos-Aberturas., T. D. Payero., E. G. Barreales A. de Pedro., J. F. Aparicio. (2014). PAS-LuxR transcriptional control of filipin biosynthesis in *S. avermitilis*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 98:9311–9324.

Waksman, S. A y Woodruff, H. B. (1940). The soil as a source of microorganisms antagonistic to disease-producing bacteria. *J. Bacteriol* *40*, 581-600.

Wang, G., Hosaka, T., and Ochi, K. (2008). Dramatic activation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* by cumulative drug resistance mutations. *Applied and environmental microbiology* *74*, 2834-2840.

Weber, J. M., Wierman, C. K y Hutchinson, C. R. (1985). Genetic analysis of erythromycin production in *Streptomyces erythreus*. *J. Bacteriol* *164*, 425-433.

Wei W, Wang W, Cao Z, Yu H, Wang X, Zhao J, Tan H, Xu H, Jiang W, Li Y. (2007). Comparative analysis of two-component signal transduction system in two streptomycete genomes. *Acta Biochim Biophys Sin.* *39(5)*:317-25.

Wenshuai Liu, Qinling Zhang, Jia Guo, Zhi Chen, Jilun Li y Ying Wen. (2015) Increasing Avermectin Production in *Streptomyces avermitilis* by Manipulating the Expression of a Novel TetR-Family Regulator and Its Target Gene Product. *Appl Environ Microbiol* *81*:5157–5173.

Xiuping L, Ying W, Meng L, Zhi C, Jia G, Yuan S, Jilun L. (2009). A new strain of *Streptomyces avermitilis* produces high yield of oligomycin A with potent anti-tumor activity on human cancer cell lines in vitro. *Appl Microbiol Biotechnol* *81*:839–845.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* *33*, 103-119.

Yin, P., Li, Y.Y., Zhou, J., Wang, Y.H., Zhang, S.L., Ye, B.C., Ge, W.F., and Xia, Y.L. (2013). Direct proteomic mapping of *Streptomyces avermitilis* wild and industrial strain and insights into avermectin production. *J. proteomics* *79*, 1-12.

Zhang J, Yan YJ, An J, Huang SX, Wang XJ y Xiang WS. (2015). Designed biosynthesis of 25-methyl and 25-ethyl ivermectin with enhanced insecticidal activity by domain swap of avermectin polyketide synthase. *Microb Cell Fact.* *14(1)*:152.

Zhang, J., Wang, X., Diao, J., He, H., Zhang, Y., and Xiang, W. (2013). Streptomycin resistance-aided genome shuffling to improve doramectin productivity of *Streptomyces avermitilis* NEAU1069. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* *40*, 877-889.

Zhinan. X y Peili. C. (1999). Enhanced production of avermectin B1a by medium optimization and glucose feeding with *Streptomyces avermitilis*. *Bioprocess Engineering* *20*: 64-71.



Zhuo, Y., Zhang, W., Chen, D., Gao, H., Tao, J., Liu, M., Gou, Z., Zhou, X., Ye, B.C., Zhang, Q., *et al.* (2010). Reverse biological engineering of hrdB to enhance the production of avermectins in an industrial strain of *Streptomyces avermitilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 11250-11254.