



Universidad de León  
Departamento de Biología Molecular

INBIOTEC  
Instituto de Biotecnología de León



**Caracterización de la agrupación génica  
de biosíntesis de holomicina  
en *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064**

Vanesa Robles Reglero  
León 2014



# Contenido

<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>9</b>
<b>ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS .....</b>	<b>12</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1. Características del género <i>Streptomyces</i> .....</b>	<b>6</b>
1.1.1. Descripción y hábitat natural.....	9
1.1.2. Ciclo de vida .....	12
1.1.3. Características del genoma de <i>Streptomyces</i> sp.....	16
1.1.4. Metabolismo secundario .....	20
<b>1.2. <i>Streptomyces clavuligerus</i> .....</b>	<b>33</b>
1.2.1. Producción de metabolitos secundarios por <i>S. clavuligerus</i> .....	33
1.2.2. Biosíntesis de ácido clavulánico y cefamicina C.....	34
1.2.3. Biosíntesis de holomicina.....	36
<b>1.3. Objetivos .....</b>	<b>45</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>46</b>
<b>2.1. Microorganismos utilizados.....</b>	<b>48</b>
2.1.1. Cepas de <i>Escherichia coli</i> .....	48
2.1.2. Cepas de <i>Streptomyces</i> .....	49
2.1.3. Otros microorganismos .....	49
<b>2.2. Medios de cultivo .....</b>	<b>50</b>
2.2.1. Medios de cultivo para <i>E. coli</i> .....	50
2.2.2. Medios de cultivo para <i>Streptomyces</i> .....	51
<b>2.3. Crecimiento y conservación de los microorganismos.....</b>	<b>53</b>
2.3.1. Crecimiento.....	53
2.3.2. Determinación del crecimiento de los microorganismos.....	54
2.3.3. Conservación de los microorganismos.....	54
<b>2.4. Reactivos químicos .....</b>	<b>55</b>
2.4.1. Antibióticos.....	55

2.4.2. Enzimas .....	55
2.4.3. Marcadores de peso molecular .....	56
2.4.4. Oligonucleótidos .....	57
<b>2.5. Vectores Plasmídicos.....</b>	<b>57</b>
<b>2.6. Análisis bioinformático .....</b>	<b>58</b>
<b>2.7. Estudio de la producción de holomicina y de antibióticos <math>\beta</math>- lactámicos en <i>S. clavuligerus</i>.....</b>	<b>59</b>
2.7.1. Desarrollo de las fermentaciones .....	59
2.7.2. Determinación de la concentración de ADN .....	61
2.7.3. Cuantificación de ácido clavulánico.....	62
2.7.4. Cuantificación de Cefamicina C.....	63
2.7.5. Cuantificación de Holomicina.....	64
<b>2.8. Métodos relacionados con la extracción de ADN.....</b>	<b>64</b>
2.8.1. Limpieza y precipitación de ADN .....	64
2.8.2. Eliminación enzimática del ARN.....	65
2.8.3. Aislamiento de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> .....	66
2.8.4. Aislamiento de ADN total de <i>Streptomyces</i> .....	69
2.8.5. Evaluación de la concentración y pureza del ADN.....	70
<b>2.9. Tratamiento enzimático del ADN .....</b>	<b>70</b>
2.9.1. Digestión mediante endonucleasas de restricción.....	70
2.9.2. Desfosforilación de los extremos 5' del ADN .....	72
2.9.3. Modificación enzimática de los extremos.....	72
2.9.4. Ligación de fragmentos de ADN.....	73
<b>2.10. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....</b>	<b>74</b>
<b>2.11. Electroforesis de ADN en geles de agarosa .....</b>	<b>77</b>
<b>2.12. Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa .....</b>	<b>78</b>
2.12.1. Método de congelación rápida ( <i>Freeze-squeeze</i> ).....	78
2.12.2. Método de purificación en columnas GFX.....	79
<b>2.13. Secuenciación de ADN.....</b>	<b>80</b>
<b>2.14. Hibridación de ADN (<i>Southern blotting</i>).....</b>	<b>80</b>

2.14.1. Transferencia del ADN a una membrana de nailon.....	80
2.14.2. Transferencia <i>in situ</i> de ADN de colonias.....	82
2.14.3. Marcaje de sondas de ADN.....	83
2.14.4. Hibridación y detección de ADN.....	84
<b>2.15. Introducción de ADN en <i>E. coli</i>.....</b>	<b>86</b>
2.15.1. Obtención de células competentes.....	86
2.15.2. Procedimiento de transformación.....	89
<b>2.16. Introducción de ADN en <i>Streptomyces</i>.....</b>	<b>89</b>
<b>2.17. Construcción y amplificación de una genoteca de <i>S. clavuligerus</i></b>	
<b>ATCC 27064 en el vector SuperCos 1.....</b>	<b>90</b>
2.17.1. Preparación del vector SuperCos 1.....	91
2.17.2. Preparación del ADN genómico.....	92
2.17.3. Ligación y empaquetamiento.....	95
2.17.4. Titulación de la reacción de empaquetamiento.....	96
2.17.5. Amplificación de la genoteca.....	98
<b>2.18. Obtención de mutantes mediante ReDirect®.....</b>	<b>98</b>
2.18.1. Purificación del molde para la obtención del producto de PCR.....	99
2.18.2. Diseño de los cebadores para la obtención del producto de PCR.....	100
2.18.3. Amplificación por PCR del casete de resistencia.....	101
2.18.4. Transformación de <i>E. coli</i> BW25113/pIJ790 con el cósmido de <i>Streptomyces</i> que contiene el gen a sustituir.....	102
2.18.5. Sustitución del gen de interés por el casete de resistencia.....	102
2.18.6. Transferencia del cósmido recombinante a <i>Streptomyces</i> .....	103
<b>2.19. Métodos relacionados con la extracción de ARN.....</b>	<b>104</b>
2.19.1. Aislamiento de ARN total de <i>Streptomyces clavuligerus</i> .....	104
2.19.2. Valoración de la concentración y pureza del ARN.....	107
2.19.3. Valoración de la integridad del ARN.....	107
<b>2.20. Análisis de la transcripción mediante RT-PCR a tiempo final.....</b>	<b>109</b>
<b>2.21. Determinación del inicio de transcripción mediante la técnica RACE... 111</b>	
<b>3. RESULTADOS Y ANÁLISIS I (BIOSÍNTESIS DE HOLOMICINA).....</b>	<b>114</b>

<b>3.1. Búsqueda y localización de la agrupación génica para la biosíntesis de holomicina en <i>Streptomyces clavuligerus</i> .....</b>	<b>116</b>
<b>3.2. Aislamiento de la agrupación génica responsable de la biosíntesis de holomicina en <i>S. clavuligerus</i> .....</b>	<b>119</b>
3.2.1. Construcción de una genoteca de ADN genómico .....	120
3.2.2. Aislamiento y purificación del ADN genómico .....	120
3.2.3. Digestión enzimática y separación de fragmentos por gradiente de sacarosa .....	121
3.2.4. Ligación de fragmentos, empaquetamiento y titulación de la genoteca .....	123
3.2.5. Organización de la librería génica .....	125
3.2.6. Rastreo de la librería génica para la localización de la agrupación <i>hlm</i> .....	127
3.2.7. Análisis de los cósmidos positivos para el agrupamiento génico <i>hlm</i> .....	129
<b>3.3. Análisis transcripcional de la agrupación <i>hlm</i> .....</b>	<b>131</b>
3.3.1. Análisis de la expresión génica mediante RT-PCR a tiempo final .....	131
3.3.2. Análisis del inicio de transcripción de la agrupación <i>hlm</i> mediante RACE .....	137
<b>3.4. Caracterización funcional de genes implicados en la biosíntesis de holomicina .....</b>	<b>143</b>
3.4.1. Caracterización funcional del gen <i>hlmA</i> .....	144
3.4.2. Caracterización funcional del gen <i>hlmF</i> .....	150
3.4.3. Caracterización funcional del gen <i>hlmE</i> .....	156
<b>3.5. Expresión heteróloga de la agrupación <i>hlm</i> .....</b>	<b>161</b>
3.5.1. Construcción del plásmido pVR-hol para la expresión heteróloga de la agrupación <i>hlm</i> en <i>S. coelicolor</i> M1154 .....	162
3.5.2. Expresión y análisis de la agrupación <i>hlm</i> en <i>S. coelicolor</i> M1145 .....	165
<b>4. RESULTADOS Y ANÁLISIS II (RIBOSWITCH EN <i>S. CLAVULIGERUS</i>)</b>	<b>170</b>
<b>4.1. Introducción .....</b>	<b>172</b>
<b>4.2. Análisis de la expresión génica de <i>metH</i> y <i>metE</i> en <i>S. clavuligerus</i> .....</b>	<b>173</b>
4.2.1. Análisis génico de <i>metH</i> y <i>metE</i> en las cepas de <i>S. clavuligerus</i> .....	173
4.2.2. Análisis de la expresión génica de <i>metH</i> y <i>metE</i> mediante RT-PCR a tiempo final .....	174
<b>4.3. Análisis del gen <i>metH</i> en <i>S. clavuligerus</i> .....</b>	<b>175</b>

4.3.1 Búsqueda del gen <i>metH</i> en la genoteca de <i>S. clavuligerus</i> ATCC 27064 .....	176
4.3.2. Caracterización funcional del gen <i>metH</i> .....	178
<b>4.4. Análisis del gen <i>metE</i> en <i>S. clavuligerus</i>.....</b>	<b>190</b>
4.4.1 Búsqueda del gen <i>metE</i> en la genoteca de <i>S. clavuligerus</i> .....	190
4.4.2. Caracterización funcional del gen <i>metE</i> .....	192
<b>4.5. Análisis del doble mutante <i>metH-E</i> en <i>S. clavuligerus</i> .....</b>	<b>197</b>
4.5.1 Obtención del doble mutante $\Delta$ <i>metH-E</i> .....	197
4.5.2 Estudio del crecimiento de la cepa <i>S. clavuligerus</i> $\Delta$ <i>metH-E</i> .....	200
<b>5. DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>203</b>
5.1. Aislamiento y caracterización de la agrupación génica para la biosíntesis de holomicina en <i>S. clavuligerus</i> .....	205
5.2. Biosíntesis de metionina: <i>riboswitch</i> en <i>S. clavuligerus</i> .....	208
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>212</b>
<b>7. ANEXOS.....</b>	<b>217</b>
7.1. Oligonucleótidos usados para las RT-PCR de Holomicina .....	219
7.2. Oligonucleótidos utilizados en experimentos ReDirect, expresión heteróloga y comprobaciones.....	220
7.3. Oligonucleótidos usados para las RT-PCR de Riboswitch.....	221
<b>8. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>222</b>



## AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la ayuda recibida a la contratación de personal investigador de reciente titulación universitaria (Orden EDU/330/2008, de 3 de marzo, apartado 6) de la Junta de Castilla y León cofinanciada por el fondo social europeo. Del mismo modo, el trabajo desarrollado a lo largo de esta tesis doctoral se ha sustentado gracias a la financiación obtenida a través de los proyectos BIO2009-09820 y BIO2012-34723 concedidos por los Ministerios de Innovación y Ciencia y de Economía y Competitividad y el proyecto LE046A11-2 concedido por la Junta de Castilla y León.

A Irene Santamarta Hernández, Directora de esta Tesis, por haber confiado en mí al darme la oportunidad de realizar este trabajo bajo su dirección. Gracias por confiar en mí incluso en los momentos en los que daba todo por perdido. Gracias por demostrarme que luchando con la verdad por delante se puede con todo. Y gracias por ser una excelente “jefa”, tanto en los buenos como en los malos momentos.

A la Dirección de INBIOTEC por permitir que realizase este trabajo en sus instalaciones y por el interés y consideración mostrados en todo momento tanto hacia mi trabajo como a mi persona.

A Josefina, Berna, Andrea y Alcira, que sin su apoyo técnico y administrativo sería imposible sacar el trabajo adelante.

A todos los “habitantes” de INBIOTEC por su humanidad y colaboración en todo momento. En especial a Antonio Rodríguez, Clara, Silvia Albillos y Carmen “cañi” por su paciencia, amabilidad, trabajo, esfuerzo y ayuda. A todas las personas que trabajaron conmigo en el cuarto 103 y que colaboraron, de una forma u otra, a la formación de mi carrera investigadora: Nuria, Maite, Rubén, y el resto de cuantos pasaron un tiempo por allí. A todos los compañeros no sólo del laboratorio sino de escapadas, cumpleaños, cenas y fiestas varias: Miri-Miri, Mafe, Pedrinchi, Rebeca, Lore-Lore, Paula, Don José, Charly, Kenny, Gigi, Martuki y el resto que compartieron alguno de esos momentos conmigo, porque no todo es trabajar y somos “seres sociales”. A Fanny y sus compis por acogerme con su cariño y simpatía cuando más lo necesitaba. A las profes Ángeles (“La Mary” y “La Vidales”), Ethel y Silvia por acogerme en mi primera etapa de INBIOTEC y hacerme sentir como una más desde el primer momento.

A Tamara, con la que comencé esta andadura, gracias por ser una persona maravillosa y estar siempre a mi lado, el destino nos ha mantenido cerca desde hace mucho tiempo y confío en que nunca se separen nuestros caminos

A mis “compañeros de la vida”: Maripaz, Bane, Ibán, Marimar, Ana, Lorena, Monyperry, Alex y todos los que han compartido conmigo una buena mañana, tarde o noche, gracias por aguantar mis charlas sobre ciencia y, sobre todo, gracias por reconfortarme en los malos momentos que ultimamente he pasado. A Jenny y a Laura, porque además de compartir grandes momentos e historias conmigo, también saben lo que es hacer una tesis y todo lo que ello conlleva.

A mi hermano y a mi madre, por su apoyo incondicional y su cariño, gracias a sus consejos y a sus ánimos he podido seguir adelante y conseguir las metas que me he propuesto. Gracias por estar siempre a mi lado.

A mi padre que, aunque no pudo ver como comenzaba esta historia, seguro que estaría orgulloso de su pequeña rapaza.



## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

A continuación se presentan las abreviaturas y acrónimos que han sido empleados a lo largo de esta memoria y que no son de uso extendido por la comunidad científica, por lo que podrían resultar problemáticos para la comprensión del texto.

**Abs:** absorbancia

**ADNasa:** desoxirribonucleasa

**ADNc:** ADN complementario

**ADNt:** ADN total o genómico

**ARNasa:** ribonucleasa

**ARNr:** ARN ribosomal

**ARNt:** ARN de transferencia

**ATCC:** Colección americana de cultivos tipo  
(*American Type Culture Collection*)

**CIA:** cloroformo-alcohol isoamílico

**CoA:** coenzima A

**DMSO:** dimetilsulfoxido

**dNTPs:** desoxinucleótidos trifosfato.

**DO600:** densidad óptica a 600 nm de  
longitud de onda

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético

**HPLC:** Cromatografía líquida de alta  
resolución (*High Performance Liquid  
Chromatography*)

**kb:** kilobase

**Mb:** megapares de bases

**M:** molar

**MOPS:** ácido 3-(N-morfolino)propanesulfónico

**nm:** nanometro

**nt:** nucleótido

**ORF:** marco de lectura abierto

**pb:** pares de bases

**p/v:** relación peso/volumen

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**RACE:** amplificación rápida de extremos de  
ADNc

**RBS:** sitio de unión a ribosomas

**RIN:** número de integridad del ARN

**rpm:** revoluciones por minuto

**RT-PCR:** PCR acoplada a retrotranscripción

**SCM:** sitio de clonación múltiple

**v/v:** relación volumen/volumen

**vol:** volumen

**TFA:** ácido trifluoroacético

**Tris:** tris-hidroximetil-aminometano.

**U:** unidades

**UFC:** unidades formadoras de colonias

**UV:** luz ultravioleta

**WT:** fenotipo salvaje (wild type)

# **1. INTRODUCCIÓN**



## 1.1. Características del género *Streptomyces*

### 1.1.1. Descripción y hábitat natural

El género *Streptomyces* pertenecía a la familia *Streptomycetaceae* y al orden de los *Actinomycetales*, y el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Garrity and Holt, 2001; Garrity *et al.*, 2005) dedicaba íntegramente su cuarto volumen a las bacterias Gram-positivas que presentan en sus genomas un elevado contenido en G+C (figura 1.1). En la segunda edición del mismo manual, el género *Streptomyces* está incluido en el volumen V *The Actinobacteria* (Goodfellow *et al.*, 2012), y aunque sigue perteneciendo a la familia *Streptomycetaceae* pero se encuadra en el orden nuevo de los *Streptomycetales* (figura 1.2). En esta nueva clasificación de los actinomicetos, las especies del género *Streptoverticillium* se han transferido al género *Streptomyces* debido a las homologías encontradas en los análisis de ARNr (Witt and Stackebrandt, 1990; Goodfellow *et al.*, 2012). Además del género *Streptomyces*, en la familia *Streptomycetaceae* se encuentran otros dos géneros más: *Kitasatospora*, ya incluido en la antigua familia, y *Streptacidiphilus*, género de actinomicetos acidófilos aislados del suelo, (Kim *et al.*, 2003). Estos dos géneros, *Kitasatospora* y *Streptacidiphilus*, se denominan géneros *incertae sedis* (o de situación cuestionable) debido a que muchas especies pertenecientes a estos dos géneros poseen una alta similitud de secuencia de ARNr con el género *Streptomyces* (Goodfellow *et al.*, 2012).

En este contexto, la clasificación taxonómica actual del género *Streptomyces* es la siguiente:

Dominio *Bacteria*  
Filo XXIV *Actinobacteria*  
Clase I *Actinobacteria*  
Orden XIV *Streptomycetales*  
Familia I *Streptomycetaceae*  
Género I *Streptomyces*

Las Actinobacterias constituyen un grupo filogenéticamente compacto, al que se ha asignado la categoría taxonómica de filo. La divergencia evolutiva entre las Actinobacterias y el resto de bacterias se considera muy antigua (entre 1.500 y 2.000 millones de años), hasta el

punto que hoy es imposible decidir con seguridad cuál es el grupo taxonómico filogenéticamente más próximo a ellas (Embley and Stackebrandt, 1994). Teniendo en cuenta los resultados de la secuenciación del ARN ribosomal 16S de los organismos que forman parte del filo *Actinobacteria*, ha sido posible agruparlos en un total de 6 clases, 22 órdenes, 53 familias y 221 géneros (Goodfellow *et al.*, 2012).

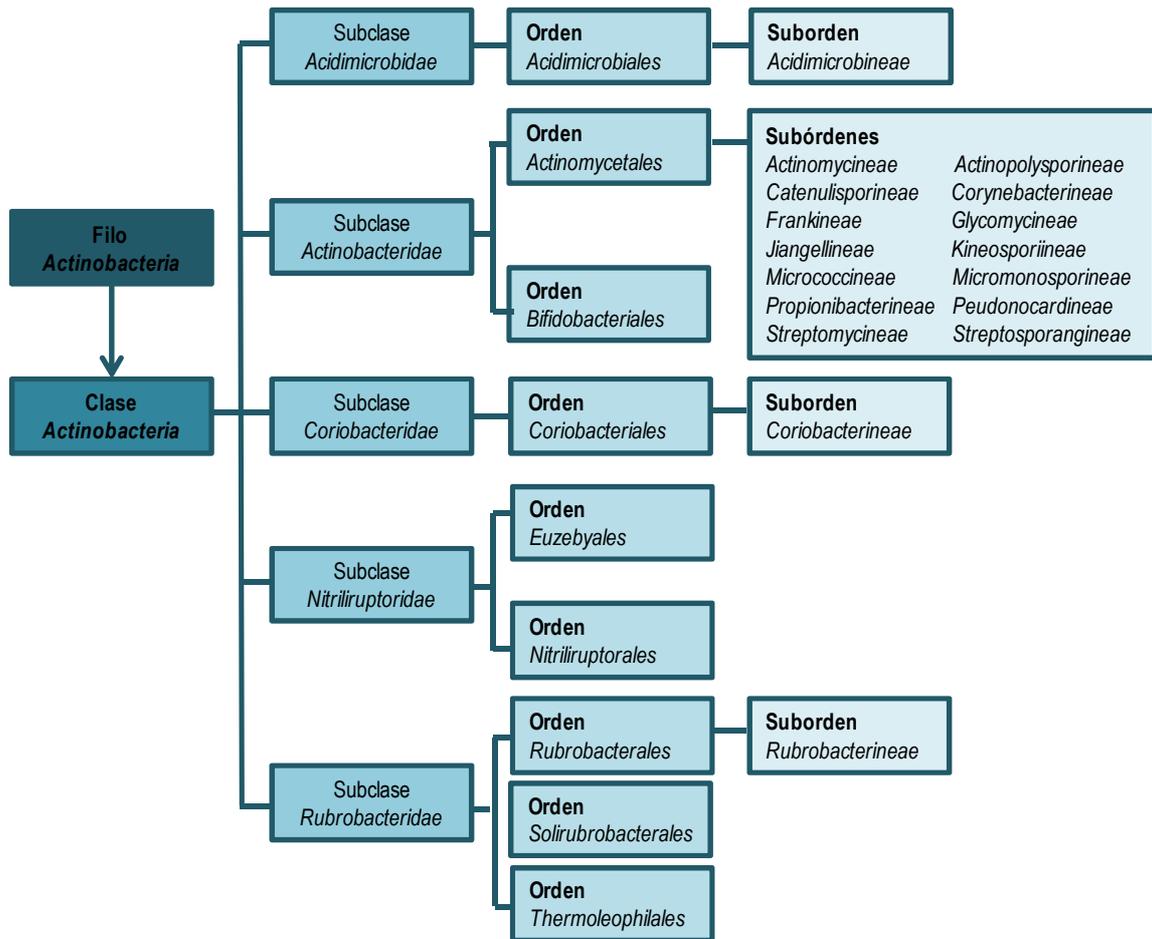


Figura 1.1. Esquema de la taxonomía del antiguo filo *Actinobacteria* según la clasificación existente hasta la fecha (Garrity *et al.*, 2005). Modificado de Gao *et al.* 2012.

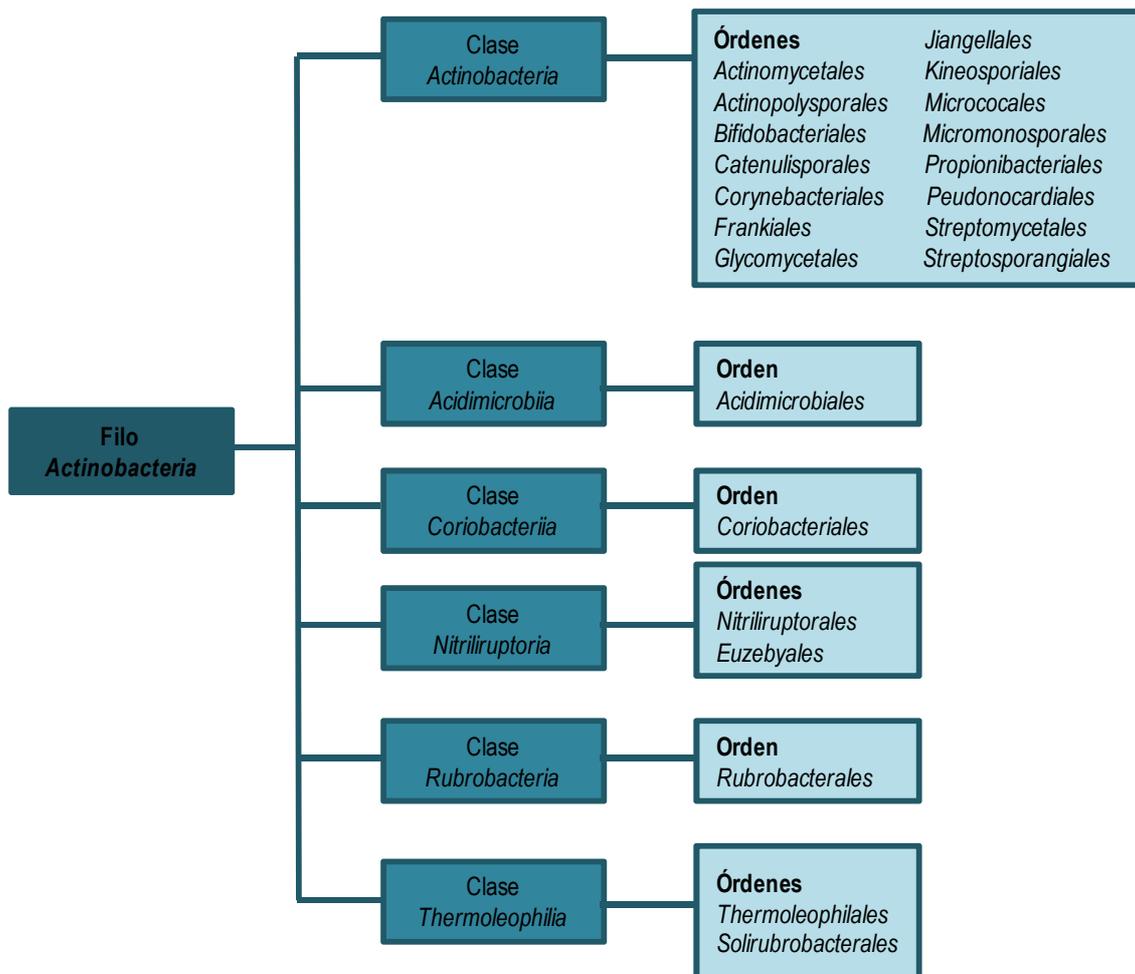


Figura 1.2. Esquema taxonómico del nuevo filo *Actinobacteria* (Goodfellow *et al.*, 2012).

Modificado de Gao *et al.* 2012.

En el género *Streptomyces* se engloban las bacterias filamentosas, miceliales, Gram-positivas, aerobias estrictas, capaces de utilizar un gran número de compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía y con un elevado contenido en guaninas y citosinas (74% G+C) en su genoma (Chater, 1993). La temperatura óptima de crecimiento para la mayoría de las especies de este género oscila entre 25 y 35 °C y el pH entre 6,5 y 8,0 (Goodfellow, 1989). Las especies de este género se encuentran distribuidas ampliamente en el suelo (a concentraciones entre  $10^5$  y  $10^8$  ufc/g), participando activamente en los ciclos biogeoquímicos de degradación de la materia orgánica (McCarthy and Williams, 1992). Son causantes del olor a tierra mojada, debido a la producción del metabolito secundario geosmina. Los microorganismos del género *Streptomyces* son productores de una gran cantidad de enzimas extracelulares que degradan polímeros, tanto de origen vegetal como animal, por lo que su contribución a la mejora de la fertilidad del suelo es importante.

Dentro de los actinomicetos se han descrito patógenos humanos en distintas especies de los géneros *Mycobacterium*, *Actinomadura*, *Nocardia* y *Actinomyces* y sólo dos dentro del género *Streptomyces* (*S. somaliensis* y *S. sudanensis*) (Kieser *et al.*, 2000; Quintana *et al.*, 2008). No son comensales humanos, presentan una actividad secretora notable y producen una enorme variedad de metabolitos secundarios y sustancias biológicamente activas, como por ejemplo antibióticos, lo que ha conferido al género gran importancia industrial. Los actinomicetos producen alrededor del 61% de todos los metabolitos secundarios conocidos (Kieser *et al.*, 2000), de los cuales el 70-80% son sintetizados por especies del género *Streptomyces* (Challis and Hopwood, 2003).

Además del papel de los metabolitos secundarios como antagonistas de organismos competidores, especialmente en el caso de los antibióticos (Martín and Demain, 1980) se les han asignado otras posibles funciones como: regulación de la simbiosis y del comensalismo, protección contra agentes fisicoquímicos (luz UV), capacidad de adquisición y detoxificación de elementos traza, detoxificación endógena de metabolitos, fuente de materiales especiales para la construcción de la pared celular o como material de reserva no accesible a otros microorganismos (von Döhren and Gräfe, 1997).

La capacidad de las especies del género *Streptomyces* para colonizar diferentes hábitats viene dada por la diversidad de su metabolismo, que les permite emplear fuentes de carbono muy variadas. Su presencia en el suelo se ve favorecida por su crecimiento micelial y su capacidad de formar esporas, las cuales constituyen un sistema de dispersión y una forma de resistencia que favorece la supervivencia durante largos periodos de escasez de agua y nutrientes ((Ensign, 1978); (McCarthy and Williams, 1992)).

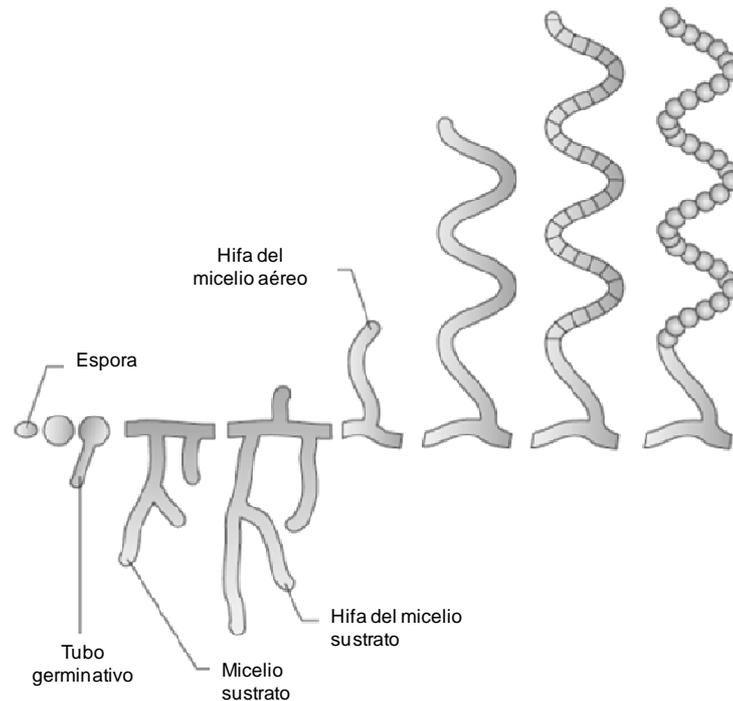
### **1.1.2. Ciclo de vida**

Los *Streptomyces* son actinobacterias aerobias que a lo largo de su complejo ciclo de vida desarrollan micelios altamente ramificados, formados por filamentos que se denominan hifas, y que dan lugar a largas cadenas de exosporas (Chater and Chandra, 2006). Poseen una pared celular de tipo I, con ácido LL-diaminopimélico formando parte del peptidoglicano (Lechevalier, 1989; Locci, 1989) y la fosfatidiletanolamina es el fosfolípido característico de su membrana celular (Goodfellow, 1989).

En condiciones ambientales favorables comienza la germinación de una espora de *Streptomyces* mediante un proceso que requiere energía (Hirsch and Ensign, 1978). La degradación del componente mayoritario de la espora, el disacárido trehalosa (Ensign, 1978), dispara procesos metabólicos celulares tales como la síntesis de ARN y proteínas. Aproximadamente dos horas más tarde comienza la síntesis de ADN, que tiene lugar una vez el tubo germinativo ha emergido (Hardisson *et al.*, 1978).

Las hifas del micelio sustrato, formadas a partir del tubo germinativo, se ramifican con frecuencia y crecen rápidamente penetrando en el sustrato, por extensión de la zona apical de la pared celular (Miguélez *et al.*, 1992). Las hifas del micelio sustrato están muy ramificadas, raramente se fragmentan y presentan un diámetro de 0,5-2,0  $\mu\text{m}$ . Por otro lado, cuando el micelio aéreo está maduro, se produce una separación en los extremos de las hifas dando lugar a largas cadenas de esporas que oscilan entre 5-10 esporas hasta 50 esporas por hifa (Hardisson and Manzanal, 1976). El avance de las hifas en el sustrato se produce gracias a la secreción de enzimas hidrolíticas (proteasas, nucleasas, lipasas, celulasas o amilasas) que permiten la incorporación de nutrientes. Cuando el crecimiento alcanza la fase logarítmica se producen ramificaciones en las hifas más viejas, y este incremento en el número de ramificaciones da lugar a un crecimiento exponencial del micelio (Allan and Prosser, 1983).

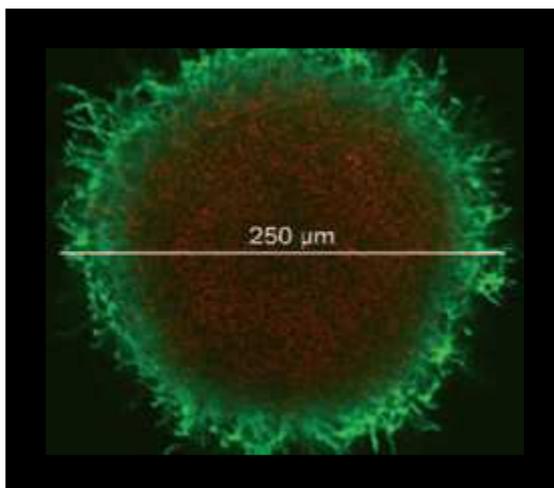
A continuación, las hifas del micelio aéreo emergen utilizando el material previamente asimilado por el micelio sustrato en forma de macromoléculas (ADN y proteínas) o en forma de compuestos almacenados (Méndez *et al.*, 1985; Brana *et al.*, 1986). Cuando cesa el crecimiento apical de las hifas del micelio aéreo, se forman septos a intervalos regulares que subdividen las mismas en varias secciones. El septo de esporulación consiste en dos capas de membrana separadas por una doble capa de material celular que permite la separación de las esporas adyacentes (McVITTIE, 1974). Cada compartimento resultante contiene una única copia del genoma que dará lugar a una espora (inmóvil, pigmentada e hidrófoba), cerrando así el ciclo celular (Hardisson and Manzanal, 1976). Generalmente, las cadenas constan de varias decenas de esporas, resistentes a la desecación y a la digestión con lisozima, que actúan como elementos de dispersión de los *Streptomyces* en el medio ambiente.



**Figura 1.3. Esquema del ciclo biológico de *Streptomyces*.** Modificado de Flårdh *et al.* 2009.

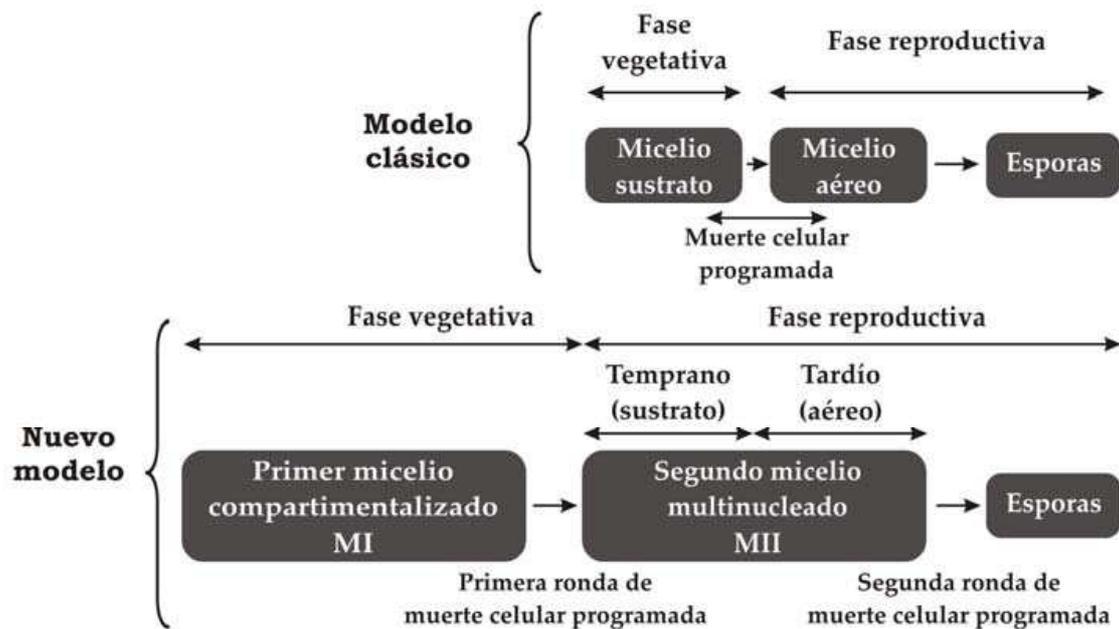
Recientemente se han descrito nuevos aspectos del proceso de diferenciación del género *Streptomyces*. El ciclo de vida tradicional, mencionado en las anteriores líneas, se compone de dos estructuras miceliales diferenciadas: micelio sustrato (vegetativo) y micelio aéreo (reproductivo). Exceptuando casos aislados de este género que esporulan en medio líquido como *Streptomyces griseus*, *Streptomyces acrimycini* o *Streptomyces albus* (Daza *et al.*, 1989), se asume que en medio líquido la diferenciación morfológica no tiene lugar.

Un reciente modelo describe nuevas fases de diferenciación tanto para crecimiento en superficie como en cultivos sumergidos. En una primera fase se produce la germinación de las esporas como micelio joven compartimentalizado (primer micelio). Este tipo de micelio forma agregados desde tiempos tempranos en el crecimiento y comienza a morir desde el centro del agregado hacia afuera, intercalándose segmentos de micelio viables y muertos (figura 1.4) y produciéndose finalmente una muerte celular programada. Este proceso de muerte supone una parada en el crecimiento que precede la formación de micelio multinucleado (segundo micelio) que crece a partir de los segmentos viables que quedan del primer micelio. Se han definido dos tipos de segundo micelio en base a la ausencia (temprano) o presencia (tardío) de las capas hidrofóbicas típicas de las hifas aéreas.



**Figura 1.4. Micelio de *Streptomyces* vivo y muerto.** Fotografía tomada con microscopio de fluorescencia confocal láser de micelio de *S. coelicolor*. Para analizar la viabilidad de las células se han usado dos tipos de colorantes, el yoduro de propidio que se une a los ácidos nucleicos de las células muertas y SYTO 9 que tiñe las células viables. El centro del agregado aparece de color rojo debido a que se produce una mayor acumulación de segmentos de micelio muerto, mientras que la zona externa es verde ya que el micelio de esta zona está vivo. Modificado de Manteca *et al.* 2008.

El micelio sustrato del modelo clásico se corresponde con un **segundo micelio** multinucleado **temprano** y el micelio aéreo con la fase tardía del segundo micelio, el cual ya se ha recubierto de la superficie hidrofóbica (figura 1.5). El **segundo micelio tardío** sufre una segunda ronda de muerte dando lugar a formación de esporas. En cultivos líquidos, el modelo clásico asume que los metabolitos secundarios son producidos por el micelio sustrato al alcanzar la fase estacionaria, ya que en estas condiciones es infrecuente la diferenciación morfológica; en cambio, el nuevo modelo propone la muerte celular programada del primer micelio y la generación del segundo micelio que es el verdadero productor de metabolitos secundarios. En este nuevo modelo existe diferenciación morfológica tanto en líquido como en sólido, siendo la diferencia más importante la ausencia de una segunda ronda de muerte celular y esporulación en cultivos sumergidos (Manteca *et al.*, 2008; Manteca and Sanchez, 2009).



**Figura 1.5. Fases de la diferenciación morfológica en *Streptomyces*.** Esquema del nuevo modelo del ciclo celular propuesto para *Streptomyces* en comparación con el modelo clásico. Se indican las diferentes estructuras miceliales (Primer micelio MI y segundo micelio MII) y la muerte celular, así como la correspondencia con el tipo de fase vegetativa o reproductiva. En vertical se marca la correspondencia con la estructuras del modelo clásico, así el micelio sustrato corresponde al segundo micelio temprano y el micelio aéreo al segundo micelio tardío. Modificado de Manteca *et al.* 2009.

### 1.1.3. Características del genoma de *Streptomyces* sp.

#### ➤ Organización genómica.

Aunque todas las demás actinobacterias estudiadas poseen cromosomas circulares (Oliynyk *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2010), los miembros del género *Streptomyces* poseen cromosomas lineales de entre 8 y 10 Mb de tamaño, con lo que sus genomas se cuentan entre los más grandes conocidos para las bacterias; de hecho el genoma de *Streptomyces coelicolor* A3(2) fue el primer genoma bacteriano conocido, con mayor número de marcos de lectura (7.825) que el de algunos eucariotas sencillos, como *Saccharomyces cerevisiae* (Bentley *et al.*, 2002). El contenido alto en G+C (de un 72%) determina un particular uso de codones por parte de *Streptomyces*, que utiliza preferentemente codones que contienen estos nucleótidos en la tercera posición, lo que convierte en raros a los codones TTA (leucina), CTA (leucina) y TTT (fenilalanina) (Wright y Bibb, 1992). Respecto al inicio de traducción el codón utilizado

mayoritariamente es AUG (metionina) pero también se puede encontrar GUG (valina) y CUG (Leucina).

El mecanismo de replicación de los telómeros de *Streptomyces* es único. El cromosoma lineal de este género presenta proteínas unidas covalentemente a los extremos 5' (Lin *et al.*, 1993; Leblond *et al.*, 1996) las cuales intervienen en la replicación de los mismos. La replicación del cromosoma tiene lugar de manera bidireccional desde un origen, *oriC*, localizado en el centro (Musialowski *et al.*, 1994) dejando los extremos 5' sin completar al eliminar el último cebador de ARN, los cuales son extendidos mediante la intervención de un complejo proteico Tap/Tpg unido a los telómeros (Bao y Cohen, 2003). Estos extremos del cromosoma están formados por secuencias repetidas e invertidas, cuyo tamaño puede variar en diferentes especies entre 24 y 600 kb. (Kieser *et al.*, 2000), y en sus proximidades aparecen numerosas repeticiones directas, inserciones y elementos transponibles. Se cree que todos estos elementos estructurales son los causantes de la elevada inestabilidad que caracteriza a los cromosomas de algunas especies del género, que de manera espontánea muestran una marcada tendencia a sufrir grandes amplificaciones y deleciones en sus extremos, e incluso a la aparición de formas circulares del cromosoma, que resultan aún más inestables que las lineales (Volff y Altenbuchner, 1998; Volff y Altenbuchner, 2000; Chen *et al.*, 2002).

La secuenciación del genoma completo del organismo modelo del género, *S. coelicolor* (Bentley *et al.*, 2002), a la que siguió la aparición de especies de interés industrial, como *S. avermitilis* (Ikeda *et al.*, 2003), *S. griseus* (Ohnishi *et al.*, 2008), *S. bingchengensis* (Wang *et al.*, 2010) o *S. clavuligerus* (Broad Institute (Cambridge)), ha puesto de manifiesto que, mientras los genes involucrados en el metabolismo primario se encuentran agrupados en la zona central del cromosoma (su cuerpo central o *core*, con un tamaño de entre 4 y 6 Mb), los clúster relacionados con la síntesis de metabolitos secundarios y los genes vinculados a otras respuestas adaptativas se encuentran sistemáticamente ocupando los brazos del mismo. Esta organización genómica permite establecer una interesante hipótesis sobre el origen evolutivo de los *Streptomyces* ya que, mientras que los genes del cuerpo central presentan una elevada sintenia con sus ortólogos entre las diferentes especies del género (Ikeda *et al.*, 2003) e incluso con los cromosomas circulares otras actinobacterias como *Mycobacterium tuberculosis*, muchos de los genes de los brazos ni siquiera tienen ortólogos entre las distintas especies de *Streptomyces*. Esto hace pensar que el género *Streptomyces* divergió evolutivamente a partir de una actinobacteria ancestral, con un genoma circular de unas 4 Mb que posteriormente se volvió lineal, formándose los brazos del cromosoma por la adición de información genética

gracias a fenómenos de transposición y recombinación (Bentley *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2002). En general, el análisis de estos genomas ha mostrado que la mayoría de las especies de *Streptomyces* contienen la información genética necesaria para producir un gran número de compuestos (una media de más de 20), muchos de ellos crípticos y hasta ahora desconocidos (Challis, 2008), lo que multiplica las posibilidades de obtener nuevos productos de interés farmacéutico a partir de estos microorganismos.

➤ **Elementos genéticos extracromosomales.**

La presencia de elementos genéticos extracromosomales es muy habitual en el género *Streptomyces*. Se trata de plásmidos circulares o lineales que en la mayoría de los casos contienen mecanismos que les confieren autonomía conjugativa intra e interespecífica (Kieser *et al.*, 2000).

Los plásmidos lineales, generalmente de entre 10 y 600kb, se replican de manera análoga al cromosoma (Chang y Cohen, 1994) y se cree que han podido estar involucrados en la evolución de éste hacia su forma lineal actual (Chen *et al.*, 2002). Estos plásmidos, al igual que el cromosoma, poseen proteínas unidas de manera covalente a sus extremos cumpliendo el mismo papel en la replicación. Recientemente se ha descrito que en los plásmidos lineales de *S. coelicolor* las proteínas de un extremo interactúan con las del otro, dotando a los plásmidos lineales de una estructura circular superenrollada, fenómeno que afectaría también a los cromosomas de estas bacterias (Tsai *et al.*, 2011).

Aunque es poco habitual, algunos plásmidos de *Streptomyces* contienen información relacionada con la biosíntesis y resistencia a antibióticos, así, el plásmido lineal pSCP1 de *S. coelicolor* contiene los genes relacionados con la síntesis y resistencia a metilenomicina (Bentley *et al.*, 2004), y el plásmido pSCL4 de *S. clavuligerus*, un elemento lineal de 1,8 Mb que constituye un inmenso reservorio de información exclusivamente relacionada con la síntesis de múltiples metabolitos secundarios (Medema *et al.*, 2010). Los plásmidos lineales pueden actuar como vectores mediando la transferencia horizontal de genes entre diferentes especies de *Streptomyces* (Ravel *et al.*, 2000). La dinámica transferencia de información genética que existe entre el cromosoma de *Streptomyces* y los plásmidos lineales puede haber facilitado la rápida evolución en el metabolismo secundario que presenta el género *Streptomyces* (Medema *et al.*, 2010). En *Streptomyces rimosus* se ha demostrado la existencia de interacciones entre el plásmido lineal pPZG101 y el cromosoma; así, diferentes variantes morfológicas y mutantes auxótrofos presentan la pérdida del plásmido o la integración de

partes del mismo en el cromosoma (Gravius *et al.*, 1994). Otro ejemplo de interacción genoma-plásmido lo encontramos en *S. clavuligerus*, cuyo genoma presenta un tamaño menor (6,7 Mb) al descrito en otras especies de *Streptomyces* y las secuencias de los extremos no presentan las características típicas de los otros extremos de otros genomas, las cuales sí aparecen en el megaplásmido pSCL4 de 1,8 Mb, lo que sugiere que dicho megaplásmido se ha originado por doble recombinación entre el cromosoma y un plásmido pequeño (Medema *et al.*, 2010).

Asimismo, en el género *Streptomyces* y en otras actinobacterias se encuentran ampliamente difundidos elementos genéticos con características intermedias entre los bacteriófagos y los plásmidos: los denominados AICEs (del inglés *Actinomycete integrative and conjugative elements*). Se trata de elementos integrativos, específicos de sitio que se integran en genes que codifican un ARNt (Mazodier *et al.*, 1990), y que suelen persistir a lo largo de las generaciones en el cromosoma del hospedador hasta que se transfieren mediante conjugación hasta otro hospedador diferente, pudiéndose comportar en él como plásmidos replicativos (Hopwood *et al.*, 1984; te Poele *et al.*, 2008).

Paralelamente a los plásmidos, numerosos transposones han sido descubiertos en *Streptomyces*, existiendo ejemplos tanto de elementos integrativos específicos de sitio como de elementos capaces de integrarse al azar en el genoma.

Por último, existe un gran número de fagos capaces de infectar a estas bacterias, los llamados actinofagos, presentando todos ellos su material genético en forma de ADN de doble cadena (Kieser *et al.*, 2000). Tanto unos como otros, junto a los plásmidos, han sido determinantes en la obtención de los vectores que han hecho posible la manipulación genética de estos microorganismos, así como de los elementos transponibles empleados en su mutagénesis aleatoria. (Baltz *et al.*, 1997; Kieser *et al.*, 2000).

#### ➤ **Inestabilidad genética.**

La inestabilidad genética es uno de los rasgos característicos del cromosoma de *Streptomyces* (Leblond y Decaris, 1994). Estas bacterias sufren espontáneamente grandes deleciones y amplificaciones debidas a procesos de recombinación en las regiones terminales poco conservadas (Volf y Altenbuchner, 2000). La inestabilidad afecta a diferentes características fenotípicas, con frecuencia de manera pleiotrópica, como la diferenciación molecular, la producción de metabolitos secundarios, la resistencia a antibióticos, la secreción

de enzimas extracelulares y algunas veces al metabolismo primario, particularmente a uno o más pasos de la ruta de biosíntesis de la arginina (Volf y Altenbuchner, 1998).

En un principio se creyó que la inestabilidad genética podría estar relacionada con la linealidad del cromosoma, pero se ha comprobado que mutantes con cromosomas circulares construidos en el laboratorio (las regiones terminales del cromosoma son dispensables en condiciones de laboratorio) son más inestables (Fischer *et al.*, 1997b). Aunque muchas de las reorganizaciones que se producen en genomas del género *Streptomyces* son neutras o desfavorables, la inestabilidad genética junto a la interacción cromosoma-plásmidos lineales puede ser la explicación a la gran variedad de polimorfismos que se encuentran en los extremos del cromosoma de diferentes especies que componen el género, lo que resulta en la existencia de numerosas y variadas agrupaciones de genes del metabolismo secundario (Fischer *et al.*, 1997a). Al ser *Streptomyces* un género cuyo hábitat más frecuente es el suelo, la inestabilidad genética le confiere un enorme potencial para adaptarse a los numerosos y frecuentes cambios que se dan en la naturaleza (Volf y Altenbuchner, 1998).

#### **1.1.4. Metabolismo secundario**

Desde la perspectiva del ser humano, el interés que suscitan los *Streptomyces* se fundamenta en la capacidad que las diferentes especies y cepas de estas bacterias tienen para producir una inmensa variedad de metabolitos secundarios, muchos de los cuales han encontrado aplicaciones farmacológicas de gran importancia. Así, entre las herramientas terapéuticas que estas bacterias proporcionan al ser humano se encuentran antibióticos (antibacterianos y antifúngicos), antitumorales, antivirales, inmunosupresores y antiparasitarios. Otros metabolitos secundarios producidos por especies de *Streptomyces* incluyen herbicidas, factores de crecimiento para plantas, insecticidas, pigmentos, sideróforos y una inmensa cantidad de compuestos a los que no ha sido posible asignar una actividad biológica hasta la fecha. En total, un 61% de los metabolitos secundarios con actividad conocida son producidos por microorganismos pertenecientes a las Actinobacterias y un 80% de ellos los producen miembros del género *Streptomyces*, como es el caso del 70% de los antibióticos comerciales (Weber *et al.*, 2003).

El metabolismo secundario se ha definido tradicionalmente como el conjunto de rutas anabólicas que determinan la producción de una serie de compuestos que, sin resultar

esenciales para los mecanismos básicos de la vida ni para el crecimiento de los organismos que los producen, confieren a éstos una serie de ventajas ecológicas. Sin embargo, como tantas veces en Biología, establecer una línea entre el metabolismo secundario y el primario resultaría una simplificación excesiva, y sería recomendable calificar como “difusa” la frontera que los separa (Challis y Hopwood, 2003). Las concentraciones de metabolitos secundarios que se alcanzan en el suelo, y otros ambientes naturales, son extraordinariamente bajas y su función en bastantes casos podría estar relacionada con la modulación transcripcional y la comunicación interespecífica de la microbiota del suelo, enormemente compleja e interdependiente, siendo quizá la antibiosis que observamos en el laboratorio fruto de una concentración extraordinariamente alta (y por ello artificial) de esas señales (Linares *et al.*, 2006; Yim *et al.*, 2007). En este sentido, por ejemplo, se ha comprobado recientemente que los sideróforos producidos por determinados microorganismos son indispensables para el crecimiento de otros presentes en la comunidad microbiana, que de otro modo resultaban incultivables en condiciones de laboratorio (D'Onofrio *et al.*, 2010). La amplísima dispersión de genes de resistencia a antibióticos en el seno de las comunidades microbianas naturales, en las que la presencia de concentraciones letales de antibióticos no puede haber constituido nunca una presión selectiva, permite también especular con la posibilidad de otras funciones para estas moléculas, más allá de la estricta antibiosis (Aminov, 2009).

Por lo general, en condiciones de laboratorio la producción de metabolitos secundarios por los *Streptomyces* se produce de manera dependiente de la fase de crecimiento del cultivo. En medios sólidos esto se traduce en una coincidencia con la diferenciación morfológica, mientras que en medios líquidos la producción de metabolitos secundarios coincide con el final de la fase exponencial de crecimiento o bien con el inicio de la fase estacionaria. Las especies de *Streptomyces* sólo esporulan en medio sólido salvo excepciones como las de *S. griseus*, *S. venezuelae* o *S. brasiliensis* (Daza *et al.*, 1989; Glazebrook *et al.*, 1990; Rueda *et al.*, 2001). Numerosas condiciones ambientales y fisiológicas influyen en la producción de metabolitos secundarios (Kieser *et al.*, 2000; Bibb, 2005), casi siempre a través de complejos mecanismos, que gobiernan la expresión de los genes que codifican la maquinaria enzimática encargada de su biosíntesis. También existe una estrecha coordinación entre los procesos de diferenciación en respuesta a la escasez de nutrientes y la producción de metabolitos secundarios debido a la existencia de una regulación genética común a ambos fenómenos.

Los genes implicados en la biosíntesis de un determinado metabolito secundario se encuentran agrupados en el genoma, formando agrupaciones génicas (*clusters*), cuyos

tamaños varían desde unas pocas kb hasta 100 kb (Bentley *et al.*, 2002; Ohnishi *et al.*, 2008). Además, se conocen algunos plásmidos lineales que acomodan genes del metabolismo secundario, como pSCP1 en *S. coelicolor* para la metilenomicina (Kirby y Hopwood, 1977), pPZG103 en *S. rimosus* para la oxitetraciclina (Gravius *et al.*, 1994), pSLA2-L en *Streptomyces rochei* para la lankacidina y la lankamicina (Kinashi *et al.*, 1994) y el megaplásmido pSCL4 de *S. clavuligerus* que contiene unas 25 agrupaciones de metabolitos secundarios (Medema *et al.*, 2010). Estas agrupaciones de genes biosintéticos (*clusters*) de metabolitos secundarios no son exclusivos de *Streptomyces*, sino que constituyen la típica forma en que estos genes aparecen organizados en todo el mundo microbiano debido a su origen de tipo evolutivo (Martin y Liras, 1989; Liras y Martín, 2006).

La activación del metabolismo secundario y la diferenciación morfológica están relacionadas (Demain y Fang, 1995). El crecimiento de las bacterias del género *Streptomyces* se caracteriza por un paro temporal del mismo (Granozzi *et al.*, 1990; Novotna *et al.*, 2003) el cual precede a la producción de antibióticos (Del Sol *et al.*, 2003) y puede activar los genes de biosíntesis y resistencia a antibióticos (Salah-Bey *et al.*, 1995), estimular una respuesta de estrés (Puglia *et al.*, 1995) así como el cese de la síntesis de algunas proteínas ribosomales (Blanco *et al.*, 1994). El modelo del ciclo de vida de *Streptomyces* propuesto recientemente por Manteca *et al.* (2008) (Manteca *et al.*, 2008), correlaciona la parada del crecimiento con la fase de transición entre el primer micelio compartimentalizado y el segundo micelio multinucleado, el cual posee el potencial para la producción de metabolitos secundarios.

Tradicionalmente, se han descrito diferentes niveles de regulación en la biosíntesis de metabolitos secundarios en *Streptomyces*. Un primer nivel corresponde a los genes que están implicados en la regulación de la producción de metabolitos secundarios y en la diferenciación morfológica, como los genes *bld* o los implicados en la respuesta estricta como *relA*. El segundo nivel está representado por genes con efecto pleiotrópico en una o varias rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios, como *afsR*. Y por último, el tercer nivel de esta cascada de regulación comprende a los reguladores específicos de ruta (Arias *et al.*, 1999).

Estudios recientes demuestran que los mecanismos de control en *Streptomyces* conforman una red mucho más compleja, en la cual existe una regulación cruzada entre los reguladores específicos de una ruta. Así, se encuentran reguladores asociados a un metabolito determinado implicados en la regulación de otras agrupaciones génicas de biosíntesis, y estos

reguladores del tercer nivel también ejercen su control sobre los reguladores designados como de alto nivel pleiotrópicos (Huang *et al.*, 2005).

➤ **Regulación nutricional**

Las fuentes fácilmente asimilables de carbono, nitrógeno y fosfato estimulan el crecimiento, mientras que sus metabolitos inhiben la mayor parte de los procesos no esenciales en el organismo.

Existe una gran variedad en la preferencia de utilización de fuentes de nitrógeno por los *Streptomyces* así, la asparragina y la glutamina favorecen la producción de cefalosporinas por *S. clavuligerus* (Aharonowitz y Demain, 1979), el ácido aspártico conduce a altos niveles de oleandomicina en *S. antibioticus* y, a veces, el efecto se debe a un papel como precursores como es el caso de *S. ambofaciens* con el que se consigue una buena producción de espiramicina utilizando valina e isoleucina como fuentes de nitrógeno (Lebrihi *et al.*, 1992). La adición de L-lisina (un precursor del ácido piperólico) al medio de fermentación provoca un incremento del 150% en la producción de rapamicina por *Streptomyces hygroscopicus*, (Cheng *et al.*, 1995), y un aumento del 400% en la producción de cefamicina C (Rius *et al.*, 1996). En otros casos se ha observado que un exceso de amonio provoca un descenso en la producción de metabolitos secundarios (Aharonowitz, 1980).

La producción de muchos metabolitos secundarios está regulada por el fosfato presente en el medio. Muchos antibióticos sólo se producen en condiciones nutricionales limitantes de fosfato (Martín, 2004; Apel *et al.*, 2007). La biosíntesis de antibióticos formados directamente a partir de aminoácidos es menos sensible a la regulación por fosfato que la síntesis de los policétidos (derivados del malonil-CoA) o aminoglicósidos (derivados de glucosa) (Martin, 1989). El sistema de dos componentes PhoR-PhoP en *S. coelicolor* afecta (directa o indirectamente) a la producción de actinorrodina y undecilprodigiosina (Sola-Landa *et al.*, 2003; Santos-Beneit *et al.*, 2011). El control por fosfato se ha estudiado en la producción de candicidina por *S. griseus* (Asturias *et al.*, 1990), pimaricina por *S. natalensis* (Mendes *et al.*, 2007), y oxitetraciclina por *S. rimosus* (McDowall *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2011), entre otros.

La limitación de aminoácidos en el medio de cultivo conduce a la activación del sistema de regulación conocido como *respuesta estricta*. En este mecanismo los ARNt descargados se unen al sitio A del ribosoma induciendo que la proteína *relA* asociada a los ribosomas, catalice la síntesis de ppGpp (guanosina 5'-difosfato-3'-difosfato) lo que conduce a un descenso de formación del ARNr y al bloqueo de la transcripción de muchos genes necesarios para el

crecimiento rápido (Ochi, 1990). En general se inicia la expresión de genes de la fase estacionaria (proteínas implicadas en morfogénesis o metabolismo secundario principalmente) (Hesketh *et al.*, 2007). El ppGpp es una señal para el comienzo de la biosíntesis de antibióticos (Kelly *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 2002) sin embargo este no es el caso de *S. clavuligerus*, donde se ha observado una superproducción de antibióticos en mutantes *relA* no productores de ppGpp (Gomez-Escribano *et al.*, 2008).

#### ➤ **Regulación pleiotrópica**

Estos reguladores participan en el metabolismo secundario influyendo sobre la expresión de los reguladores específicos de ruta, pero sin actuar de manera directa sobre los genes biosintéticos presentes en las agrupaciones génicas de los metabolitos secundarios.

La complejidad de la regulación pleiotrópica del metabolismo secundario de *Streptomyces* queda patente en el hecho de que sólo en *S. coelicolor* se conocen más de veinte reguladores pleiotrópicos encargados de modular la síntesis de los cuatro antibióticos clásicamente producidos por esta bacteria (Bibb, 1996). A esto hay que unirle que en el genoma de *S. coelicolor* existen otras 25 agrupaciones génicas responsables de la biosíntesis de otros tantos metabolitos secundarios y que se estima que hasta ocho reguladores diferentes podrían estar uniéndose de manera directa a los promotores de los reguladores específicos de ruta *actII-orf4* y *red* en *S. coelicolor* (Park *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2013). Además, existen múltiples subniveles en la actuación de los reguladores pleiotrópicos, actuando en cascada, y muchas veces esas interacciones parecen formar más una red que la clásicamente asumida jerarquía escalonada (Huang *et al.*, 2005). Así; algunos reguladores pleiotrópicos, como *adpA*, afectan a niveles muy elevados de la cascada de señales, perteneciendo sus efectos a múltiples funciones celulares, mientras que otros parecen restringir sus efectos al control del metabolismo secundario, como en el caso del sistema de dos componentes AbsA1-AbsA2, que reprime la producción de los cuatro antibióticos característicos de *S. coelicolor* (Brian *et al.*, 1996; Anderson *et al.*, 2001).

#### **A) Moléculas señal tipo $\gamma$ -butirolactonas**

Los microorganismos del género *Streptomyces* emplean moléculas de tipo  $\gamma$ -butirolactona (imagen 1.1) como señales químicas u hormonas bacterianas en el control de la producción de antibióticos y, en algunos casos como *S. griseus* o *S. rochei* (Arakawa *et al.*, 2007; Horinouchi, 2007), también en la diferenciación morfológica. Estas moléculas son efectivas a muy baja concentración (del orden nanomolar) y presentan diversas estructuras

que difieren en la longitud, ramificación y estereoquímica de la cadena lateral de tipo ácido graso (Takano, 2006).

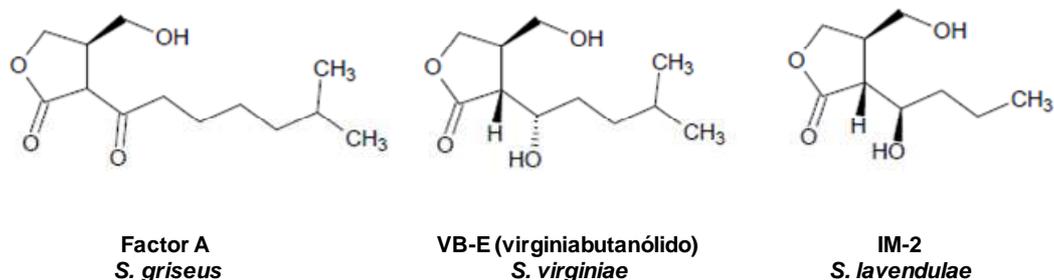


Imagen 1.1. Estructura química de algunas  $\gamma$ -butirolactonas de *Streptomyces*. Modificado de Takano 2006.

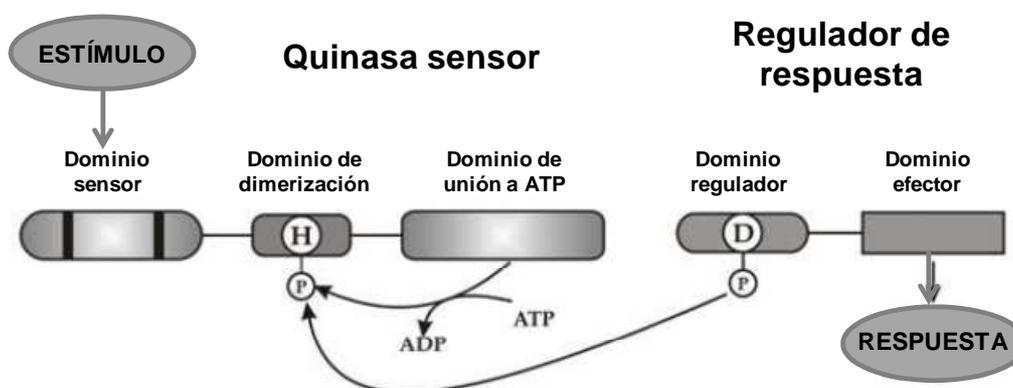
Las  $\gamma$ -butirolactonas se unen a un receptor citoplasmático impidiendo la interacción del mismo con su diana en el cromosoma. La mayoría de estos receptores son represores por lo que la unión a las moléculas señal provoca la activación de determinados genes. Las proteínas receptoras presentan una alta especificidad por una  $\gamma$ -butirolactona determinada (Ohnishi *et al.*, 2005). Los procesos de biosíntesis de estas moléculas señal no han sido completamente descifrados, pero sí se conocen algunas de las proteínas implicadas como *afsA* en *S. griseus*. La más representativa de las  $\gamma$ -butirolactonas y la primera en describirse fue el factor A (Khokhlov *et al.*, 1973), inductor de la producción de estreptomicina y de la esporulación en *S. griseus* (Horinouchi y Beppu, 1992).

La adición de  $\gamma$ -butirolactonas a un medio de fermentación de *Streptomyces* provoca un adelanto en el inicio de la producción de metabolitos secundarios (Takano *et al.*, 2001); lo que ha llevado a especular sobre la función de las  $\gamma$ -butirolactonas como moléculas de *quorum sensing* (Folcher *et al.*, 2001). Otros autores opinan que la síntesis de estas moléculas es debida a una señal fisiológica desconocida, como puede ser una limitación en los nutrientes, y no como indicadores de la densidad celular (Bibb, 2005).

## B) Regulación mediante sistemas de dos componentes

Los sistemas de dos componentes son un mecanismo conservado, para el control de la expresión de determinados genes en respuesta a factores del medio, fundamentalmente en procariontes (Stock *et al.*, 1990). Estos sistemas transductores de señales se componen de una quinasa sensora y un regulador de respuesta (Figura 1.6) donde el dominio extracitoplasmático de la proteína sensora responde a determinados estímulos. La transducción de la señal

requiere, en primer lugar, la autofosforilación en un residuo de histidina de la proteína sensora en su forma dimérica, la cual actúa fosforilando un residuo de aspartato presente en el regulador de respuesta (Hakenbeck y Stock, 1996). La fosforilación del regulador de respuesta controla la actividad de éste que, por lo general, actúa como activador transcripcional.



**Figura 1.6. Modo de activación de un sistema de dos componentes.** Un sistema de dos componentes está constituido por una quinasa sensora y un regulador de respuesta. Ante un determinado estímulo la quinasa sensora se autofosforila en un residuo de histidina y se transfiere un grupo fosfato a un residuo de aspartato del regulador de respuesta provocando su activación. Modificado de Hutchings *et al.* 2004.

Entre los sistemas de dos componentes descritos en *Streptomyces* están el operón *cutRS* y el sistema AbsA1-AbsA2. Mutantes de *Streptomyces lividans* defectivos en *cutR* o *cutS* producen en mayor cantidad actinorrodina (Tseng y Chen, 1991) y la sobreexpresión de *cutRS* en *S. coelicolor* reprime la producción (Chang *et al.*, 1996). El sistema AbsA1-AbsA2 también reprime la producción de antibióticos (McKenzie y Nodwell, 2007). El control por fosfato en la biosíntesis de metabolitos secundarios está mediado por el sistema de dos componentes PhoR-PhoP ya indicado previamente. La secuenciación del genoma de *S. coelicolor* permitió identificar 84 genes que codifican quinazas sensoras, 67 de los cuales se localizaban próximos a genes que codificaban reguladores de respuesta, por lo que se podría suponer la existencia de al menos 67 posibles sistemas de dos componentes (Hutchings *et al.*, 2004).

### C) Sistemas de serina-treonina quinazas

La transducción de señales en bacterias no sólo está mediada por sistemas de dos componentes, sino también por proteínas típicas de eucariotas como las serina-treonina quinazas (Zhang, 1996). Una de estas proteínas es el factor de transcripción AfsR que participa en la regulación del metabolismo secundario en *S. coelicolor* y en *S. lividans* (Atsushi *et al.*, 1994) y en la diferenciación morfológica en *S. griseus* (Umeyama *et al.*, 1999).

El regulador AfsR (homólogo al de muchos reguladores específicos de ruta, si bien no puede complementar la función de éstos) codifica una proteína de 993 aminoácidos que incorpora en su región N-terminal un dominio de unión a ADN de tipo SARP (del inglés *Streptomyces antibiotic regulatory proteins*), mientras que en su región central contiene dominios de unión a ATP de tipo A y B (Floriano y Bibb, 1996; Bibb, 2005). Al menos tres quinasas diferentes (*afsK*, *afsL* y *pkaG*) son capaces de autofosforilarse en respuesta a diferentes estímulos ambientales para después transferir ese grupo fosfato a *afsR* (Sawai *et al.*, 2004), que funciona como mecanismo integrador para esas señales (Horinouchi, 2003). Una vez fosforilada, AfsR se une al promotor de otro regulador pleiotrópico AfsS, activando su transcripción (Lee *et al.*, 2002; Tanaka *et al.*, 2007) (figura 1.7). AfsS es una proteína de 63 aminoácidos, con algunos residuos conservados respecto al dominio 3 de los factores sigma (Kim *et al.*, 2007) y cuyos homólogos en la naturaleza se circunscriben a pocas especies de *Streptomyces* (Lian *et al.*, 2008). Mediante un mecanismo que aún se desconoce, *afsS* afecta la expresión de hasta 117 genes en *S.coelicolor*, relacionados en su mayoría con la síntesis de actinorrodina y con la activación de respuestas frente a estrés nutricional (Lian *et al.*, 2008).

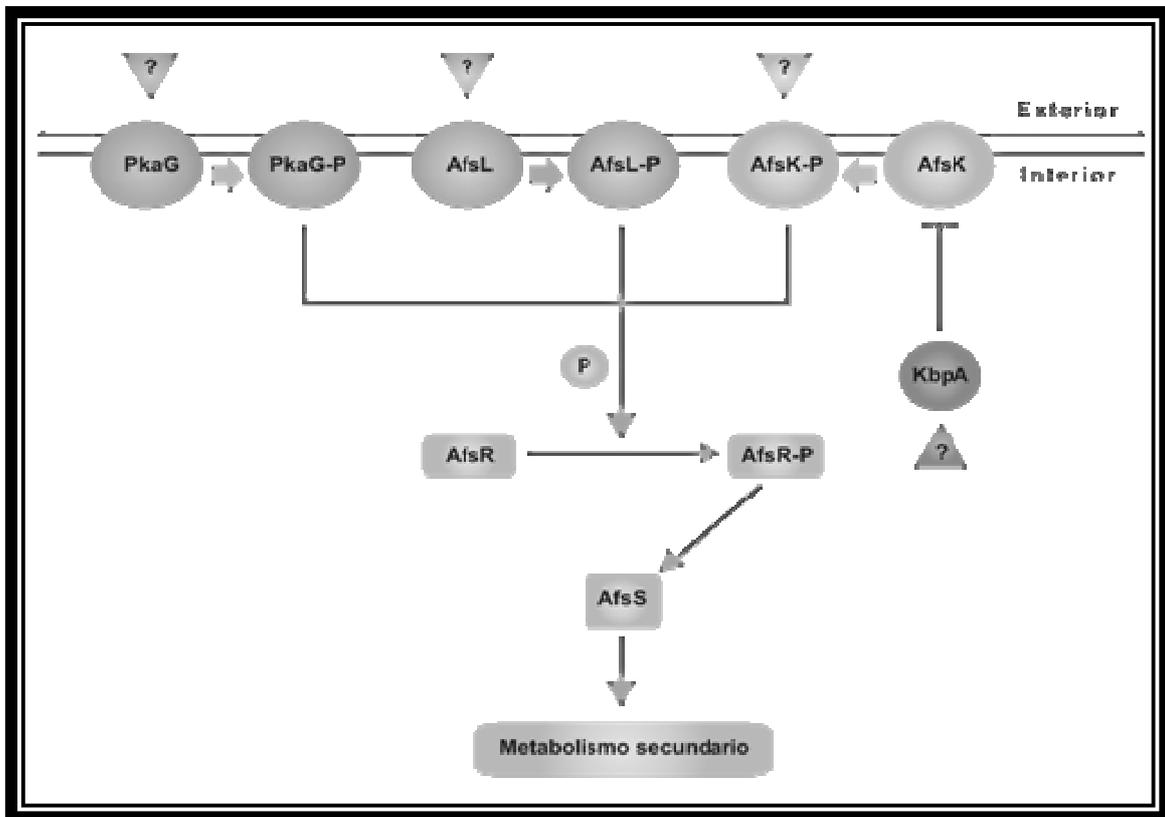


Figura 1.7. Modelo de la regulación de la producción de antibióticos por AfsK y AfsR. Modificado de Bibb 2005.

#### **D) Cascada reguladora de los genes *bld***

Los mutantes *bld* (del inglés *bald*, *calvo*) del género *Streptomyces* son incapaces de formar micelio aéreo y las colonias presentan una apariencia suave y brillante (Merrick, 1976). Este tipo de mutantes no producen la proteína SapB, necesaria para formar la capa hidrofóbica que recubre las hifas y romper la tensión superficial que permite emerger al micelio aéreo. Algunos mutantes *bld* son defectivos en la producción de antibióticos (Nodwell *et al.*, 1999).

Los genes *bld* codifican diferentes tipos de moléculas, como ARNt (*bldA* (Lawlor *et al.*, 1987)), un transportador de membrana (*bldK* (Nodwell y Losick, 1998)), un factor sigma (*bldN* (Bibb *et al.*, 2000)), un factor anti-anti-sigma (*bldG* (Bignell *et al.*, 2000)), y varios factores de transcripción (*bldB* (Pope *et al.*, 1998), *bldD* (Elliot *et al.*, 1998; Elliot *et al.*, 2001; Elliot *et al.*, 2003) y *bldM* (Molle y Buttner, 2000)).

Estudios de complementación de mutantes realizados con todos los posibles pares de mutantes *bld* (en forma de crecimiento próximo de dos determinados mutantes) restablecen la formación del micelio aéreo y han permitido determinar el orden de la cascada de los genes *bld* (Willey *et al.*, 1993; Nodwell *et al.*, 1999).

Uno de los genes *bld* mejor caracterizados es *bldA* (Piret y Chater, 1985), que codifica el único ARNt específico para los codones UUA para leucina (Lawlor *et al.*, 1987). Los codones TTA no aparecen en los genes que se expresan durante el crecimiento vegetativo, ni en los genes estructurales de la producción de antibióticos o la diferenciación morfológica; pero, en cambio, sí aparecen en genes que se expresan en la última fase del crecimiento, como son los genes que codifican reguladores específicos de las rutas de biosíntesis de antibióticos, genes de esporulación o enzimas extracelulares (Leskiw *et al.*, 1991; Chater y Chandra, 2008). Los niveles del ARNt codificado por *bldA* permanecen bajos hasta el inicio del metabolismo secundario y la diferenciación morfológica, siendo máximos en la última fase del crecimiento (Leskiw *et al.*, 1993; Trepanier *et al.*, 1997).

#### **➤ Regulación específica de ruta**

En las agrupaciones génicas para la biosíntesis de metabolitos secundarios es muy frecuente encontrar uno o más genes reguladores encargados específicamente de la modulación directa de los genes de la agrupación. Estos efectores son, en todos los casos, proteínas de unión a ADN generalmente activadores transcripcionales y, en algunas ocasiones, represores.

Más del 95% de las proteínas de unión a ADN en procariotas contienen un motivo hélice-giro-hélice (HTH, del inglés *helix-turn-helix*) de unión al ADN, mientras que en el 5% restante se encuentran representados por otros motivos más comunes en los eucariotas, como los dedos de zinc, los hélice-bucle-hélice (HLH, del inglés *helix-loop-helix*) o las láminas  $\beta$  antiparalelas (Harrison, 1991; Maddocks y Oyston, 2008). Los reguladores específicos de ruta pertenecen, en todos los casos conocidos hasta ahora, a familias de proteínas reguladoras que se caracterizan por poseer diferentes versiones del motivo HTH en sus dominios de unión al ADN.

#### **A) Familia de reguladores SARP**

El grupo de reguladores mejor representado en las agrupaciones génicas de antibióticos de *Streptomyces* son los denominados SARPs (del inglés, *Streptomyces activator regulatory proteins*), los cuales presentan en sus dominios de unión a ADN una elevada similitud con los de las proteínas de la familia OmpR, (Wietzorrek y Bibb, 1997) y por ello algunos autores los consideran como una subfamilia de los OmpR (Pérez-Rueda y Collado-Vides, 2000). Poseen además un dominio BTAD (del inglés, *Bacterial transcriptional activator domain*) junto al dominio HTH (Tanaka *et al.*, 2007). Resulta notable que, al contrario que la mayoría de los miembros de la familia OmpR y siendo también activadores transcripcionales (Martínez-Hackert y Stock, 1997), los SARP tienen su motivo de unión al ADN de tipo HTH en las proximidades de su extremo N-terminal, un rasgo mucho más corriente entre los represores (Pérez-Rueda *et al.*, 1998).

Son ejemplo de reguladores SARP: el regulador de la biosíntesis de actinorrodina ActII-*orf4* en *S. coelicolor*, (Arias *et al.*, 1999), el regulador de la biosíntesis de daunorrubicina en *S. peucetius*, DnrI (Madduri y Hutchinson, 1995; Tang *et al.*, 1996), el de la biosíntesis de cefamicina C y ácido clavulánico en *S. clavuligerus*, CcaR (Pérez-Llarena *et al.*, 1997b; Santamarta *et al.*, 2002; Santamarta *et al.*, 2011), el de biosíntesis de mitramicina en *S. argillaceus*, MtmR (Lombó *et al.*, 1999), el de biosíntesis de filipina en *S. avermitilis*, PteR (Ikeda *et al.*, 2003), o el de biosíntesis de pimarcina en *S. natalensis*, PimR (Antón *et al.*, 2004; Santos-Aberturas *et al.*, 2012) entre otros muchos.

En general, los miembros de la familia SARP actúan como reguladores específicos de ruta, excepto en el caso de AfsR, cuyo efecto es integrador de múltiples señales que se traducen como una cascada de fosforilación (Horinouchi, 2003).

## B) Familia de reguladores LAL

Las proteínas de la familia de reguladores transcripcionales LAL (del inglés, *large ATP-binding regulators of the LuxR family*) contienen en el extremo amino terminal un bucle P de unión a ATP y un dominio de unión a ADN del tipo hélice-vuelta-hélice característico de la familia LuxR en el extremo carboxilo terminal (De Schrijver y De Mot, 1999). Este tipo de reguladores aparecen asociados especialmente a genes de biosíntesis de policétidos como picromicina (Wilson *et al.*, 2001), anfotericina (Carmody *et al.*, 2004), geldanamicina (He *et al.*, 2008) o rapamicina (Kuščer *et al.*, 2007).

Se han identificado dos de éstos reguladores, SCO0877 y SCO7173, en el genoma de *S. coelicolor*. Deleciones de estos genes mostraron una menor producción de actinorrodina, atribuible a la disminución de la expresión de *actII-orf4*, junto con algunos efectos sobre los genes reguladores globales para la producción de antibióticos (Guerra *et al.*, 2012).

### ➤ Regulación mediante Riboswitch

Un mecanismo de regulación descubierto recientemente implica el control de la traducción por metabolitos de bajo peso molecular y es conocido como **Riboswitch**. Se denominan *riboswitches* a los ARNm capaces de unir a algún metabolito para, de esta manera, controlar su propia expresión. El término *riboswitch* fue acuñado originalmente (Nahvi *et al.*, 2002) para designar un interruptor genético de ARN que se une directamente a metabolitos sin la participación obligada de proteínas. Las bacterias suelen utilizar estos elementos genéticos como reguladores de las vías metabólicas y como mediadores de los cambios en la fisiología celular. Muchos *riboswitches* se han localizado a través de búsquedas en las regiones no codificantes de los genomas bacterianos y algunos de ellos son sorprendentemente complejos. Hay *riboswitches* capaces de unir vitaminas como la tiamina, cianocobalamina y riboflavina (Mironov *et al.*, 2002; Nahvi *et al.*, 2002; Winkler *et al.*, 2002; Winkler *et al.*, 2002), purinas como adenina y guanina (Mandal *et al.*, 2003; Mandal y Breaker, 2004), aminoácidos como glicina y lisina (Grundy *et al.*, 2003; Sudarsan *et al.*, 2003; Mandal *et al.*, 2004) el ión magnesio, la S-adenosil metionina (Epshtein *et al.*, 2003; McDaniel *et al.*, 2003; Winkler *et al.*, 2003) la glucosamina-6-fosfato, un componente de los glucosaminoglicanos, los proteoglicanos y los glicolípidos (Barrick *et al.*, 2004; Serganov y Nudler, 2013). De algunos *riboswitches*, denominados *riboswitches* “huérfanos” se desconoce tanto el metabolito que unen como la vía metabólica que regulan. Curiosamente, dos de las diez clases más comunes son los llamados *candidatos a riboswitch* *yybP* (Barrick *et al.*, 2004) y *ydaO* (Block *et al.*, 2010). Se

conocen 24 clases de *riboswitch* que son, probablemente, una pequeña parte del total que existe en la naturaleza (Ames y Breaker, 2010; Breaker, 2011).

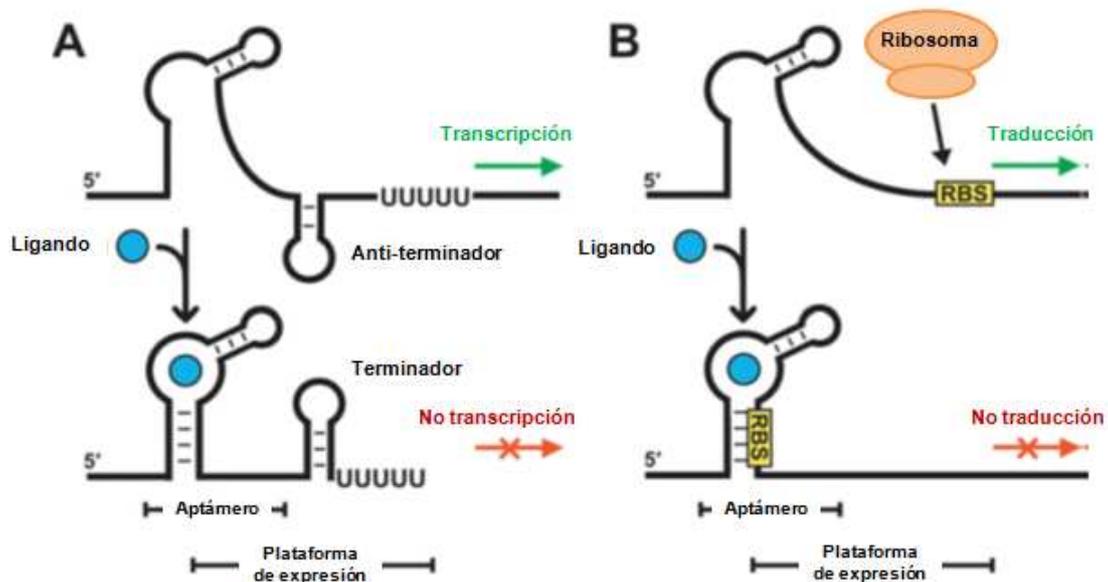
En 1976 (White III, 1976) se propuso que antes de que existiera la vida como la conocemos, basada en el ADN y las proteínas, existió una época en la que el ARN por sí solo era el portador de la información genética y tenía funciones catalíticas. Posteriormente se postuló el denominado *mundo de ARN* (Gilbert, 1986) el cual se basa en la capacidad del ARN de almacenar, transmitir y duplicar la información genética de la misma forma que lo hace el ADN, y actuar también como una ribozima desarrollando las funciones de las proteínas siendo capaz de tener su propia vida independiente. De esta forma, la mayoría de las coenzimas modernas surgieron como ayudantes químicos de ribozimas mucho antes de que las proteínas comenzaran a hacerse cargo de la mayoría de las funciones enzimáticas (Gilbert, 1986; Joyce, 1991). En este contexto algunos de los *riboswitches* comunes que vemos hoy en día pueden tener sus orígenes en el mundo del ARN (Breaker, 2011; Breaker, 2012). Algunos aptámeros que forman parte de los distintos *riboswitches* originalmente pudieron haber servido como dominios reguladores alostéricos de ribozimas o podrían haber regulado la antigua transcripción para controlar la producción de ribozimas y otros ARN no codificantes (en lugar de ARNm) (Breaker, 2011).

Aunque la mayoría de los *riboswitches* se han encontrado exclusivamente en bacterias, también se han identificado en plantas y hongos (Kubodera *et al.*, 2003; Sudarsan *et al.*, 2003; Galagan *et al.*, 2005; Cheah *et al.*, 2007), e incluso pueden estar presentes en eucariotas (Borsuk *et al.*, 2007).

Las primeras pruebas experimentales de que algunos ARN mensajeros tenían dominios de unión específicos a metabolitos para controlar la expresión génica fueron publicados hace casi una década (Mironov *et al.*, 2002; Nahvi *et al.*, 2002; Winkler *et al.*, 2002; Winkler *et al.*, 2002). Estos estudios han confirmado las especulaciones anteriores (Gelfand *et al.*, 1999; Nou y Kadner, 2000; Miranda-Ríos *et al.*, 2001; Stormo y Ji, 2001) de que los ARN mensajeros pueden detectar y responder directamente a los cambios en las concentraciones de pequeñas moléculas.

Los *riboswitches* están formados por dos regiones, la plataforma de expresión y el dominio de unión al metabolito diana (aptámero) (Mandal y Breaker, 2004; Nudler y Mironov, 2004; Winkler y Breaker, 2005). Los aptámeros son oligonucleótidos de cadena sencilla con

tamaños entre 70 y 100 nucleótidos capaces de reconocer de forma específica y con alta afinidad a varios tipos de moléculas diana mediante un plegamiento tridimensional de su cadena y, además, están muy conservados a través de la evolución. En contraste, la plataforma de expresión de cada *riboswitch*, responsable de modular la expresión génica como resultado de la unión del ligando, puede variar considerablemente (Barrick y Breaker, 2007). En las bacterias, las plataformas de expresión típicamente controlan la transcripción (figura 1.8.A), mediante la formación de un terminador, o la traducción (figura 1.8.B) mediante la “ocultación” de la secuencia de Shine-Dalgarno que necesita ser reconocida por el ribosoma durante la iniciación de la traducción.



**Figura 1.8. Mecanismos de control de genes mediante *riboswitch*.** (A) Regulación de la transcripción. Cuando no existe el ligando, la transcripción del gen corriente abajo está permitida debido a la formación de un anti-terminador. Sin embargo, cuando el aptámero que forma parte del *riboswitch* es capaz de unirse al ligando, se forma un terminador de la transcripción. (B) Regulación de la traducción. En ausencia de ligando, un ribosoma se une a la región RBS (sitio de unión al ribosoma) en el ARNm dando lugar al inicio de la traducción. Cuando el ligando está disponible, éste se une al aptámero “ocultando”, de esta manera, la región RBS que no es reconocida por el ribosoma y, por tanto, no puede iniciarse la traducción. Modificado de Kim *et al.* 2008 .

Otra característica de los *riboswitches* bacterianos es su localización casi exclusiva en las regiones 5' no traducidas (UTRs) de los ARNm cuya expresión controlan. Esta disposición permite que sea sintetizado en primer lugar y responda a la unión del ligando antes de que se transcriba el gen o grupo de genes que se encuentran corriente abajo (Breaker, 2011).

## 1.2. *Streptomyces clavuligerus*

*S. clavuligerus* se aisló inicialmente como productor del compuesto  $\beta$ -lactámico cefamicina C, un antibiótico que inhibe la biosíntesis de peptidoglicano por interacción con las transpeptidasas de la pared celular (Nagarajan *et al.*, 1971). La cefamicina C es una molécula de tipo cefalosporina (Whitney *et al.*, 1972) cuya biosíntesis comparte algunos pasos con la ruta de formación de penicilinas y cefalosporinas (Aharonowitz *et al.*, 1992). Durante un sistema de búsqueda de microorganismos productores de inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, se descubrió que *S. clavuligerus* producía ácido clavulánico (Brown *et al.*, 1976) y otras clavamas, moléculas con estructura similar al ácido clavulánico pero con estereoquímica 5S en vez de 5R, las cuales carecen de actividad inhibidora de  $\beta$ -lactamasas, aunque algunos representantes de esta familia poseen actividad antifúngica o antibacteriana (Brown *et al.*, 1979).

Combinaciones de ácido clavulánico y un antibiótico  $\beta$ -lactámico son prescritos actualmente como preparados comerciales, en la mayoría de los países, haciendo del ácido clavulánico un producto muy rentable en la industria farmacéutica (Saudagar *et al.*, 2008). Uno de los más empleados es el Augmentin<sup>®</sup>, que en 1995 era el segundo antibacteriano más vendido en el mundo con unas ventas de 1,3 billones de dólares en EE.UU (Demain, 1999; Elander, 2003).

El tamaño determinado para el cromosoma de *S. clavuligerus* es de 6,7 Mb y su contenido en G+C del 69%. Además, posee al menos tres plásmidos: pSCL1 (11.7 kb), pSCL2 (120 kb) y pSCL3 (430 kb) (Keen *et al.*, 1988; Wu y Roy, 1993; Netolitzky *et al.*, 1995) junto con el megaplásmido pSCL4 de 1,8 Mb que constituye un inmenso reservorio de información relacionada con la síntesis de múltiples metabolitos secundarios en casi su totalidad (Medema *et al.*, 2010).

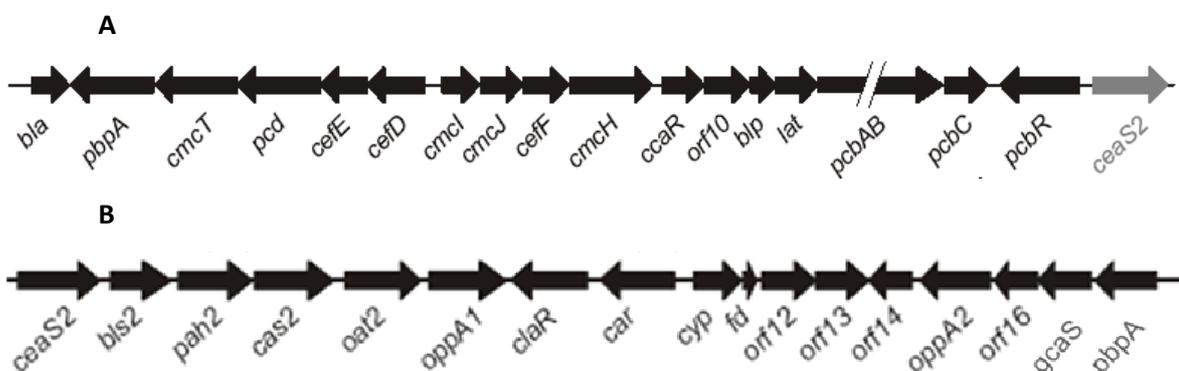
### 1.2.1. Producción de metabolitos secundarios por *S. clavuligerus*

Debido a la importancia clínica y comercial del ácido clavulánico, la producción de estos metabolitos secundarios ha sido objeto de una intensa investigación en los últimos años, y las revisiones que se han publicado son muy numerosas (Song *et al.*, 2010; Liras *et al.*, 2011; Jensen, 2012; Paradkar, 2013; Barredo *et al.*, 2014). La coproducción de ácido clavulánico y cefamicina C en un mismo microorganismo se haya debido posiblemente a la fuerte presión

selectiva ejercida por bacterias resistentes a  $\beta$ -lactamasas que comparten el mismo nicho ecológico que *S. clavuligerus* (Challis y Hopwood, 2003). Otras especies de *Streptomyces* como *S. jumonjinensis* y *S. katsurahamanus* también producen ácido clavulánico (Brown *et al.*, 1976; Ward y Hodgson, 1993). Además del ácido clavulánico y cefamicina C, en *S. clavuligerus* se han descrito dos proteínas inhibidoras de  $\beta$  lactamasas: BLIP (Doran *et al.*, 1990) y BLP (Perez-Llarena *et al.*, 1997a), aunque estudios de Thai *et al.* 2001 (Thai *et al.*, 2001) indican que sólo la proteína BLIP posee actividad inhibidora de  $\beta$ -lactamasas. Otros compuestos formados por *S. clavuligerus* son: 1) derivados del ácido olivánico (Brown *et al.*, 1977), 2) penicilinas y cefalosporinas, como intermediarios de la biosíntesis de cefamicina C (Nagarajan *et al.*, 1971), 3) holomicina, un antibiótico del tipo pirrotina que inhibe la síntesis de ARN (Kenig y Reading, 1979) y 4) una molécula de tipo tunicamicina (Kenig y Reading, 1979). También se ha descrito la producción del inmunosupresor tacrolimus por algunas cepas de *S. clavuligerus* (Kim y Park, 2008).

### 1.2.2. Biosíntesis de ácido clavulánico y cefamicina C

Las agrupaciones para la biosíntesis de cefamicina C (figura 1.9.A) y de ácido clavulánico (figura 1.9.B) en *S. clavuligerus* se encuentran contiguas en el genoma, al igual que en *S. katsurahamanus* y *S. jumonjinensis* (Ward y Hodgson, 1993). La información referente a ambas agrupaciones génicas ha sido ampliamente revisada (Martín y Liras, 2010; Liras *et al.*, 2011; Jensen, 2012).

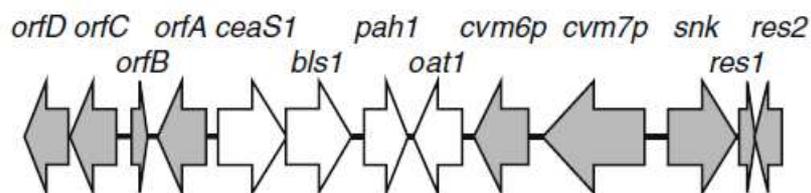


**Figura 1.9. Agrupación biosintética de cefamicina C (A) y ácido clavulánico (B).** Nótese que el gen *ceaS2* se ha incluido en A y B para indicar que ambas agrupaciones son adyacentes. El tamaño de los genes no está a escala. Modificado de Santamarta *et al.* 2011.

En la agrupación de cefamicina C se encuentra el gen CcaR, que codifica un regulador transcripcional de la familia SARP cuya interrupción elimina la producción de cefamicina C y de ácido clavulánico pero no de otras clavamas (Perez-Llarena *et al.*, 1997b; Santamarta *et al.*, 2011). CcaR controla la producción de ácido clavulánico uniéndose al promotor del gen *ceaS2* y también regulando la expresión de ClaR, activador transcripcional tipo LysR, que controla los genes para las etapas tardías que van desde el ácido clavamínico hasta el ácido clavulánico (Paradkar *et al.*, 1998; Perez-Redondo *et al.*, 1998; Tahlan *et al.*, 2004).

Existen fragmentos duplicados de la agrupación de genes de ácido clavulánico (figura 1.10). Salowe *et al.* (1990) (Salowe *et al.*, 1990) purificaron dos isoenzimas con actividad clavaminato sintasa en *S. clavuligerus* y a partir de ellas se clonaron y secuenciaron los genes *cas1* y *cas2* (Marsh *et al.*, 1992), localizados en la agrupación de clavamas (Mosher *et al.*, 1999) y en la agrupación de ácido clavulánico (Aidoo *et al.*, 1994), respectivamente. Otros genes parálogos detectados son *ceaS1*, *bls1*, *pah1* (etapa temprana de la vía) y *oat1* (Tahlan *et al.*, 2007). La agrupación de genes parálogos contiene a *cvm6p* y *cvm7p*, que se asemejan a *cvm6* y *cvm7* de la agrupación de las clavamas. Sin embargo, a diferencia de *cvm6* y *cvm7*, la mutación de *cvm6p* (codifica una aminotransferasa putativa) o *cvm7p* (codifica un activador transcripcional de la biosíntesis de clavamas (Kwong *et al.*, 2012) suprime la producción de las clavamas (Tahlan *et al.*, 2007) y no manifiesta efecto sobre la producción de ácido clavulánico. Se ha propuesto que *cvm6p* desamina el ácido clavamínico para producir el aldehído intermedio predicho por Egan *et al.* (1997) (Egan *et al.*, 1997). *Cvm7p* es un regulador de vía específico para los pasos finales de la biosíntesis de clavamas localizado corriente arriba del conjunto de tres genes, *snk-res1-res2*, que codifica los elementos de un “atípico” sistema regulador de dos componentes (Jensen, 2012). Mutaciones de los genes *snk* y *res2* causan la pérdida de producción de clavamas sin ningún efecto en la producción de ácido clavulánico, mientras que la mutación de *res1* aumenta la producción de clavamas (Kwong *et al.*, 2012). Los genes por debajo de *res2* en la agrupación paróloga parecen no estar relacionados con la producción de las clavamas (Jensen, 2012). En el otro extremo de la agrupación paróloga, se encuentran *orfA*, *orfB*, *orfC*, y *orfD*, genes que tienen funciones específicas en la biosíntesis de alanilclavamas (Zelyas *et al.*, 2008). La mutación de cualquiera de los genes *orfA-orfD* suprime la producción de alanilclavamas sin afectar la producción de cualquiera de los otros compuestos, incluyendo el ácido clavulánico. Además, los mutantes en *orfC* y *orfD* acumulan el intermediario 8-hidroxialanilclavama que no se encuentra en la cepa silvestre. Los genes corriente arriba de *orfD* parecen no estar relacionados con la biosíntesis de clavamas (Jensen, 2012). Un estudio reciente demostró que el cultivo en medio líquido de soja de las cepas

delecionadas en *ceaS1* produce una reducción leve de biosíntesis de clavamas, mientras que la interrupción de *ceaS2* la abolía por completo (Kwong *et al.*, 2013).

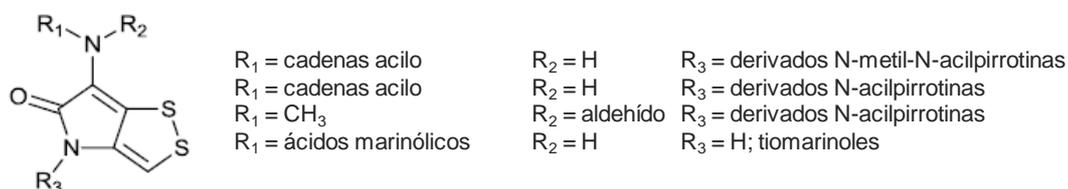


**Figura 1.10. Clúster parálogo de ácido clavulánico y clavamas en *Streptomyces clavuligerus*.** Con flechas blancas se representan los genes tempranos; las flechas grises corresponden a los genes tardíos. Modificado de Jensen 2012.

### 1.2.3. Biosíntesis de holomicina

#### ➤ Características de la molécula de holomicina

La holomicina es un metabolito secundario que pertenece a la clase de las ditiolopirrolonas. Las ditiolopirrolonas constan de un cromóforo formado por dos anillos heterocíclicos pentagonales fusionados, en el que un anillo presenta un enlace disulfuro y el otro anillo presenta diferentes radicales N-acilos. Las ditiolopirrolonas de origen biológico se pueden dividir en tres grupos: de tipo tiolutina (derivados N-metilo, N-acilpirrotina), de tipo holomicina (derivados N-acilpirrotinas) y de tipo tiomarinol (derivados complejos), dependiendo de los sustituyentes del anillo pirrotínico en las posiciones R1, R2 y R3 (tabla 1.1 y figura 1.11) que son los que marcan las diferencias entre las distintas moléculas (Qin *et al.*, 2013b).

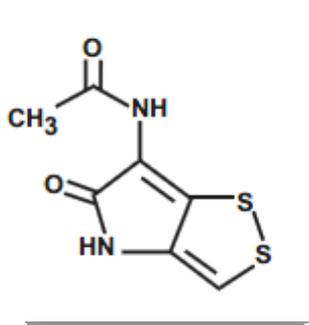


**Figura 1.11. Estructura general de las ditiolopirrolonas de origen biológico.** Modificado de Qin *et al.*, 2013b.

Nombre	Estructura			Cepa originaria
	R1	R2	R3	
Aureotricina	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CO	H	CH <sub>3</sub>	<i>Streptomyces</i> sp. 26A
Tiolutina	CH <sub>3</sub> CO	H	CH <sub>3</sub>	<i>Streptomyces albus</i>
Isobutanoilpirrotina	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCO	H	CH <sub>3</sub>	<i>Saccharothrix algeriensis</i>
Butanoilpirrotina	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO	H	CH <sub>3</sub>	<i>Saccharothrix algeriensis</i>
Seneciopilpirrotina	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> C=CHCO	H	CH <sub>3</sub>	<i>Saccharothrix algeriensis</i>
Tigloilpirrotina	(CH <sub>3</sub> )CH=C(CH <sub>3</sub> )CO	H	CH <sub>3</sub>	<i>Saccharothrix algeriensis</i>
Xenorabdina 4	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CO	H	CH <sub>3</sub>	<i>Xenorhabdus nematophilus</i> XQ1 (ATCC 39497)
Xenorabdina 5	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO	H	CH <sub>3</sub>	<i>Xenorhabdus nematophilus</i> XQ1 (ATCC 39497)
Holomicina	CH <sub>3</sub> CO	H	H	<i>Streptomyces griseus</i> (NRRL 2764)
N-Propanoilholotina	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CO	H	H	<i>Streptomyces</i> sp. P662
vD844	CHO	CH <sub>3</sub>	H	<i>Actinomycete</i> sp.
Xenorabdina 1	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CO	H	H	<i>Xenorhabdus nematophilus</i> XQ1 (ATCC 39497)
Xenorabdina 2	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO	H	H	<i>Xenorhabdus nematophilus</i> XQ1 (ATCC 39497)
Xenorabdina 3	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CO	H	H	<i>Xenorhabdus nematophilus</i> XQ1 (ATCC 39497)
Xenorabdina 8	decanoil	H	H	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. SANK 73390
Xenorabdina 9	dodecanoil	H	H	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. SANK 73390
Xenorabdina 10	E-dec-3-enoil	H	H	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. SANK 73390
Xenorabdina 11	Z-dec-4-enoil	H	H	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. SANK 73390
Xenorabdina 12	E-tetradecenoil	H	H	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. SANK 73390
Xenorabdina 13	Z-hexadecenoil	H	H	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. SANK 73390
Tiomarinol A	Ácidos Marinólico A	H	H	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. SANK 73390
Tiomarinol B	Ácidos Marinólico B	H	H	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. SANK 73390
Tiomarinol C	Ácidos Marinólico C	H	H	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. SANK 73390
Tiomarinol D	Ácidos Marinólico D	H	H	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. SANK 73390
Tiomarinol E	Ácidos Marinólico E	H	H	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. SANK 73390
Tiomarinol F	Ácidos Marinólico F	H	H	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. SANK 73390
Tiomarinol G	Ácidos Marinólico G	H	H	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. SANK 73390

**Tabla 1.1. Resumen de las ditiolopirrolonas de origen biológico.** Modificado de Qin *et al.*, 2013b.

La holomicina, que lleva un grupo acetilo en la posición R1 y sendos hidrógenos en las posiciones R2 y R3 (figura 1.12), fue aislada y caracterizada por primera vez en *Streptomyces griseus* (Ettlinger *et al.*, 1959), y más tarde en *Streptomyces* sp. P6621 (Okamura, 1977) y en mutantes de *S. clavuligerus* (Kenig y Reading, 1979).



**Figura 1.12. Estructura de la molécula de holomicina.** Modificado de Chorin *et al.* 2009.

Las ditiolopirrolonas producidas por especies de *Streptomyces*, además de la holomicina, son la holotina (holomicina deacetilada), la tiolutina y la aureotricina (Celmer *et al.*, 1952; Celmer y Solomon, 1955). La mayoría de las ditiolopirrolonas son producidas por *Streptomyces* u otros actinomicetos como *Saccharothrix* sp. (LAMARI *et al.*, 2002; Lamari *et al.*, 2002). Sin embargo, se han encontrado recientemente bacterias Gram negativas productoras de compuestos bioactivos con estructura de tipo ditiolopirrolona; de esta forma la holomicina fue hallada en *Photobacterium halotolerans* S2753 (Wietz *et al.*, 2010) y en *Yersinia ruckeri* (Qin *et al.*, 2013a). Las bacterias Gram negativas producen también la familia de las xenorabdinas, compuestos con el núcleo tipo holomicina característico y largos sustituyentes acilo en el grupo amino del cromóforo (tabla 1.1 y figura 1.11). Las xenorabdinas son productos de diferentes especies de *Xenorhabdus*, enterobacterias mutualistas de nematodos entomoparásitos del género *Steinernema* (McInerney *et al.*, 1991), y también son producidas por *Pseudoalteromonas* SANK73390,  $\gamma$ -proteobacterias aisladas en Japón a partir de invertebrados marinos (Murphy *et al.*, 2011). También producidos por las *Pseudoalteromonas* sp. se encuentran los tiomarinoles (tiomarinol A-G) (Shiozawa *et al.*, 1993), grupo de compuestos con estructura ditiolopirrolona pero más complejos ya que además de contener el cromóforo característico portan en su estructura ácidos marinólicos unidos por un grupo amida al cromóforo (tabla 1.1 y figura 1.11).

Las ditiolopirrolonas poseen un amplio espectro de actividad contra bacterias Gram positivas y la mayoría de las bacterias Gram negativas. Muchas ditiolopirrolonas actúan contra levaduras y hongos aunque la holomicina no es activa contra *Saccharomyces cerevisiae*. Debido al amplio espectro de acción que poseen las ditiolopirrolonas se llevaron a cabo estudios de

modificación y sustitución en los que se encontraron moléculas que actúan como fármacos citotóxicos contra varias líneas celulares tumorales de mamíferos (Webster *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2007). La mayoría de los estudios sobre el modo de acción de las ditiolopirrolonas se han hecho con tiolutina y holomicina. La tiolutina es un potente inhibidor de las ARN polimerasas I, II y III de *S. cerevisiae* (Jimenez *et al.*, 1973; Tipper, 1973). Tanto la tiolutina como la holomicina inhiben *in vivo*, pero no *in vitro*, la síntesis de ARN en *E. coli* (Khachatourians y Tipper, 1974; Oliva *et al.*, 2001) y son activos en mutantes resistentes a rifampicina, contienen modificadas las subunidades  $\beta$  de las ARN polimerasas (O'Neill *et al.*, 2000). El modo de acción de estas moléculas en células procariontas aún no está claro, antifúngica, esta última no observada en el caso concreto de la holomicina (Oliva *et al.*, 2001).

Puesto que el efecto inhibitorio directo de la holomicina y la tiolutina sobre la ARN polimerasa observado *in vitro* es débil se ha sugerido su función como precursores de drogas más activas que son las inhibidoras de las ARN polimerasas en el interior de las células (Oliva *et al.*, 2001). Asimismo, Juhl y Clark (1990) (Juhl y Clark, 1990) observaron que mutaciones en el gen *thdA* de *Escherichia coli* producen un aumento de actividad sulfona oxidasa que elimina dobles enlaces del anillo de la tiolutina y originan una molécula más activa. Se ha propuesto que los antibióticos del grupo de las pirroquinas como la tiolutina pueden ser análogos tóxicos de la biotina, el ácido lipoico u otros cofactores o vitaminas que contienen azufre (Juhl y Clark, 1990).

➤ **Producción de holomicina por *Streptomyces clavuligerus***

La holomicina fue aislada por primera vez en *S. clavuligerus* por Kenig y Reading en 1979 (Kenig y Reading, 1979). La estructura de la molécula de holomicina difiere totalmente de los compuestos  $\beta$ -lactámicos producidos por *S. clavuligerus*. La holomicina posee un color amarillo característico y muestra actividad antibiótica frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Liras *et al.*, 2008). Durante la producción de holomicina se obtienen pequeñas cantidades de holotina, que es el precursor desacetilado. La cepa silvestre, *S. clavuligerus* ATCC 27064 produce trazas de ambos compuestos que se encuentran en el límite de detección (menos de 11 $\mu$ g de holomicina por mg de ADN) (de la Fuente *et al.*, 2002).

El análisis por espectrometría de masas de la holomicina origina fragmentos con valores m/e de 214 (M<sup>+</sup>) y 172 (M<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>CO), así como de 72 (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>SN) y 143 (C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>SN<sub>2</sub>), debidos a la ruptura del enlace S-S y del enlace peptídico interno del anillo de la holomicina, indicando una masa de 213,98 para la estructura de la molécula (C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>). El espectro de

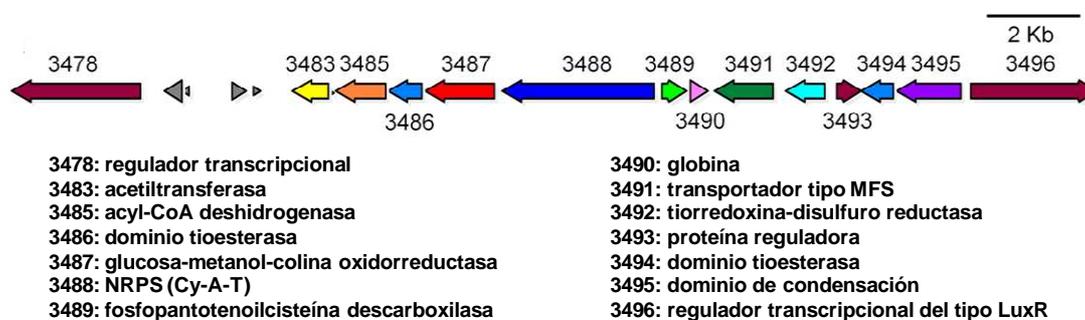
absorción ultravioleta de la holomicina disuelta en metanol muestra picos a longitudes de onda de 246, 300 y 384 nm, característicos del anillo pirrotínico (de la Fuente *et al.*, 2002).

La biosíntesis de holomicina en *S. clavuligerus* está relacionada con la biosíntesis de ácido clavulánico. Mutantes interrumpidos en diferentes genes de la ruta de biosíntesis de ácido clavulánico, no productores de ácido clavulánico, producen niveles elevados de holomicina (de la Fuente *et al.*, 2002; Lorenzana *et al.*, 2004), así:

- ✧ los mutantes interrumpidos en los genes reguladores *ccaR* y *claR*, y el mutante interrumpido en el gen biosintético tardío *car* (codifica la enzima ácido clavulánico reductasa), producen entre 200 y 450 µg de holomicina por mg de ADN.
- ✧ los mutantes interrumpidos en los genes *cyp* (codifica un citocromo p450), *orf12* (implicado en la conversión de ácido clavamínico en clavaldehído) y *oppA2* (codifica una oligopéptido permeasa) producen 1.200 µg de holomicina por mg de ADN.

Este es uno de los primeros ejemplos observados de activación de una agrupación génica silenciada y las bases moleculares para su activación están empezando a conocerse. Se ha comprobado que la producción de holomicina está estimulada por compuestos que inducen estrés oxidativo (Nardiz *et al.*, 2011), también por la adición de arginina y se ha sugerido que algún compuesto intermediario de biosíntesis de clavulánico pudiera regular la formación de holomicina. Sin embargo este último no parece ser el caso a la vista de los últimos resultados relacionados con los plásmidos de *S. clavuligerus* (Charusanti *et al.*, 2012) donde se obtuvo una cepa de *S. clavuligerus* de alta producción de holomicina por la evolución adaptativa contra *Staphylococcus aureus* N315 resistente a metilicina. Esta cepa productora de holomicina había perdido el megaplásmido de 1.8 Mb, pSCL4, visto mediante análisis de los genes internos por PCR. Estudios recientes en nuestro laboratorio han mostrado que la cepa *S. clavuligerus* *oppA2::aph*, superproductora de holomicina contiene un bajo número de copias de los plásmidos pSCL4, pSCL2 y pSCL1. La capacidad de superproducir holomicina está relacionada específicamente con la pérdida del plásmido pSCL4 (Álvarez-Álvarez *et al.*, 2013). La mutación en el gen *oppA2* estimula pero no es esencial para la superproducción de holomicina. La ausencia de pSCL4 es suficiente para la superproducción habiéndose sugerido que este plásmido contiene un gen regulador que reprime la formación de holomicina. La delección de *oppA2* y la ausencia de pSCL4 producen efectos aditivos en relación a la producción de holomicina (Álvarez-Álvarez *et al.*, 2013).

Al inicio de este trabajo de investigación no se conocía la agrupación de biosíntesis de holomicina en *S. clavuligerus*. En paralelo al trabajo que presentamos en esta memoria, en septiembre de 2010, Li y Walsh (Li y Walsh, 2010) publicaron la identificación de la agrupación génica de la holomicina en este microorganismo (figura 1.13). Mediante una búsqueda informática en el genoma de *S. clavuligerus* identificaron un grupo de genes candidatos incluyendo una péptido sintetasa no ribosomal (NRPS), codificada por el marco de lectura *orf3488* y denominada *hlmE*, una aciltransferasa (*orf3483*, *hlmA*), una fosfopantotenoilcisteína descarboxilasa (*orf3489*, *hlmF*) y tres oxidorreductasas. La delección génica tanto de *hlmE* como de *hlmF* anulaba la producción tanto de holomicina como de holotina, apoyando fuertemente la implicación de este clúster de genes en la biosíntesis de la molécula de holomicina.

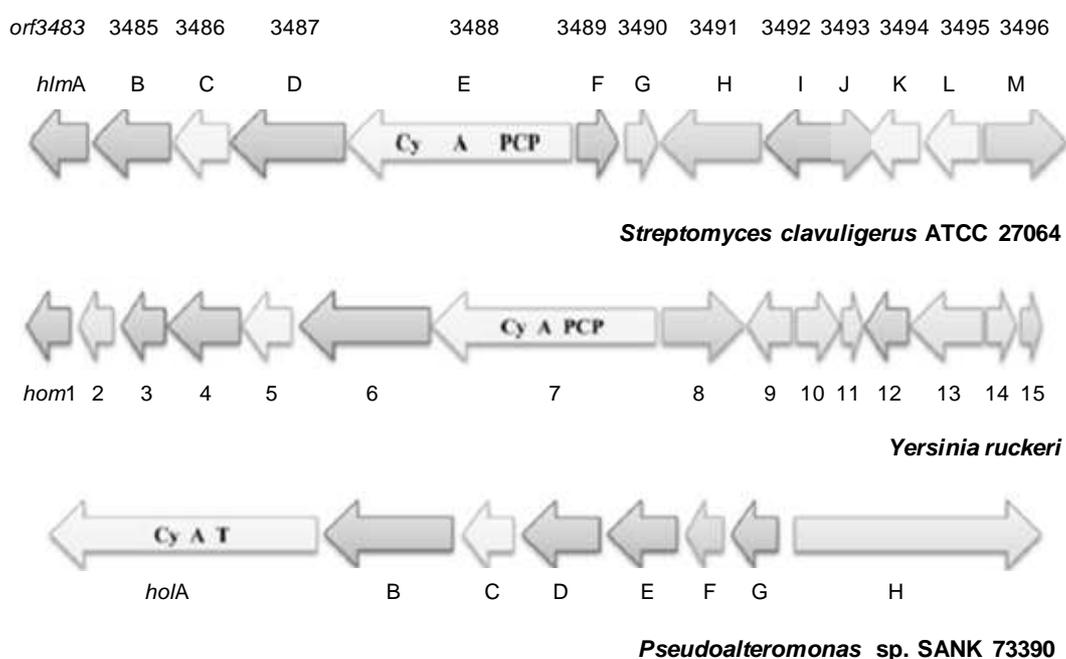


**Figura 1.13. Agrupación de genes propuesta por Li y Walsh para la biosíntesis de holomicina en**

*S. clavuligerus*. La agrupación de genes propuesta para la biosíntesis de holomicina consta de catorce genes. Destacan entre ellos el *orf3483*, que codifica una acetiltransferasa que llevaría a cabo la acetilación de la holotina para convertirla en holomicina, y el *orf3488* que codifica una péptido sintetasa no ribosomal (NRPS) la cual posee un módulo con tres dominios: ciclación (Cy), adenilación (A), y tiolación (T) en el orden canónico Cy-AT (Sattely *et al.*, 2008). Modificado de Li y Walsh 2010.

Todos estos genes, desde *orf3483* hasta el *orf3496*, forman la agrupación génica en *S. clavuligerus* para la producción de holomicina. El grupo está formado por un gen (*hlmE*) que codifica una NRPS con tres dominios: de ciclación (Cy), adenilación (A) y tiolación (T); dos genes independientes que codifican tioesterasas (*hlmC* y *hlmK*); un gen independiente que posee un dominio de condensación (*hlmL*); un gen que codifica una proteína tipo globina (*hlmG*); una acil-CoA deshidrogenasa codificada por *hlmB*; tres oxidorreductasas dependientes de flavina (*hlmI*, *HlmD* y *hlmF*); un gen que codifica una acetiltransferasa (*hlmA*); dos proteínas reguladoras (*hlmJ*, *hlmM*) y, finalmente, un gen que codifica un transportador de tipo MFS (*hlmH*). Este grupo de genes es suficiente para producir holomicina heterológamente, es decir,

en otras especies como es el caso de *Streptomyces albus* (Huang *et al.*, 2011) y *Streptomyces coelicolor* (Robles-Reglero *et al.*, 2013), aunque algunos genes adicionales podrían ser necesarios para la regulación o la resistencia. La nomenclatura de la agrupación génica difiere según autores y microorganismos (figura 1.14), así, se han denominado como *hlm* (Li y Walsh, 2010; Robles-Reglero *et al.*, 2013) y *hom* (Huang *et al.*, 2011) en *S. clavuligerus*, como *hom* en el caso de *Yersinia ruckeri* (Qin *et al.*, 2013a) y como *hol* en *Pseudoalteromonas* sp. SANK 73390 (Fukuda *et al.*, 2011). Algunos genes esenciales para la biosíntesis de holomicina en *S. clavuligerus*, como *hlmI* o *hlmL* no están presentes en el *Y. ruckeri* o en *Pseudoalteromonas* sp (Fukuda *et al.*, 2011; Qin *et al.*, 2013a). Este hallazgo sugiere que, aunque los primeros pasos de la vía son similares, tal vez los pasos finales son diferentes entre las bacterias Gram positivas y Gram negativas (Qin *et al.*, 2013b; Liras, 2014).



**Figura 1.14.** Comparación de las agrupaciones génicas para la biosíntesis de holomicina en *S. clavuligerus* ATCC 27064, *Y. ruckeri* y *Pseudoalteromonas* sp. SANK 73390, respectivamente. Modificado de Qin *et al.*, 2013b.

Al inicio de la biosíntesis de holomicina (figura 1.15), dos moléculas de cisteína se condensan y se transforman en el “andamio” de la futura molécula, donde el dominio de adenilación (A) de la NRPS (HlmE) forma reversiblemente el anhídrido mixto activado L-Cys-AMP. La formación del anhídrido L-Cys-AMP realizada por HlmE, la cual posee una Km de 1

mM, es específica para L-cisteína ya que nunca usa los demás aminoácidos proteínogénicos, L-metionina, L-alanina o L-serina. La falta de otro dominio de activación de aminoácidos para la segunda cisteína, la cual se requiere para la formación de holomicina, sugiere que HImE puede actuar de forma consecutiva en la formación de la molécula. En la vía propuesta, la cisteína se modifica secuencialmente mediante la acil-CoA deshidrogenasa (codificada por *hImB*) que elimina dos átomos de hidrógeno de la molécula de cisteína y el dominio de condensación independiente HImL, que une la segunda cisteína produciéndose, a continuación, la ciclación por el dominio Cy de HImE (o de forma espontánea) formándose el primer anillo de la holomicina. El dipéptido L-Cys-L-Cys se ha detectado en solución durante los ensayos con HImE purificada (Li y Walsh, 2010).

En esta vía propuesta (figura 1.15), la tioesterasa codificada por *hImC* libera el dipéptido modificado a partir de HImE y tendría lugar la descarboxilación de la molécula llevada a cabo por HImF, una flavoproteína con actividad oxidoreductasa que pertenece a una subfamilia de flavoenzimas, capaz de llevar a cabo descarboxilaciones como las que ocurren en la biosíntesis de los compuestos de tipo lantibióticos, sin embargo, esta reacción de descarboxilación no ha sido demostrada experimentalmente. El intermediario descarboxilado se reduce por la oxidoreductasa HImD y espontáneamente se modifica para dar lugar a la holomicina reducida (Li y Walsh, 2010).

Los pasos finales de la vía implican una acetiltransferasa (*hImA*) y una oxidoreductasa (*hImI*). En el caso de la actividad acetiltransferasa (holomicina sintasa), forma irreversible holomicina a partir de holotina en presencia de acetil-CoA (de la Fuente *et al.*, 2002). La actividad específica de la enzima HImA es proporcional al nivel de holomicina producida por diferentes mutantes de *S. clavuligerus* y se mantiene o aumenta a lo largo de la fermentación. A partir de la gran cantidad de ditiolopirrolonas naturales descubiertas (LAMARI *et al.*, 2002; Lamari *et al.*, 2002), y la capacidad de *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 para formar nuevas ditiolopirrolonas después de la adición de ácidos orgánicos (valérico, benzoico o ácido cinámico) al medio (Bouras *et al.*, 2007; Bouras *et al.*, 2008) condujeron a los estudios *in vitro* de la aciltransferasa de *S. algeriensis* donde se observó que la enzima utiliza acetil-CoA y benzoil-CoA como sustratos para formar holomicina o benzoilpirrotina a partir de tiolutina. Sin embargo, el patrón de actividad de la enzima usando acetil-CoA y benzoil-CoA a lo largo de la fermentación es diferente, dejando en duda si la actividad aciltransferasa medida corresponde a una o a más enzimas. La aciltransferasa recombinante obtenida mediante la expresión del gen *hImA* utiliza como sustratos (en orden de disminución de eficiencia) acetil-CoA, propionil-

CoA, hexanoil-CoA, octanoil-CoA y palmitoil-CoA. La  $K_m$  para el acetil-CoA es de 6-15  $\mu\text{M}$  (Li y Walsh, 2010). Esta enzima utiliza in vitro la forma ditiol reducida de holomicina (dihidroholomicina) y holotina como sustratos (figura 1.15) (Li y Walsh, 2011).

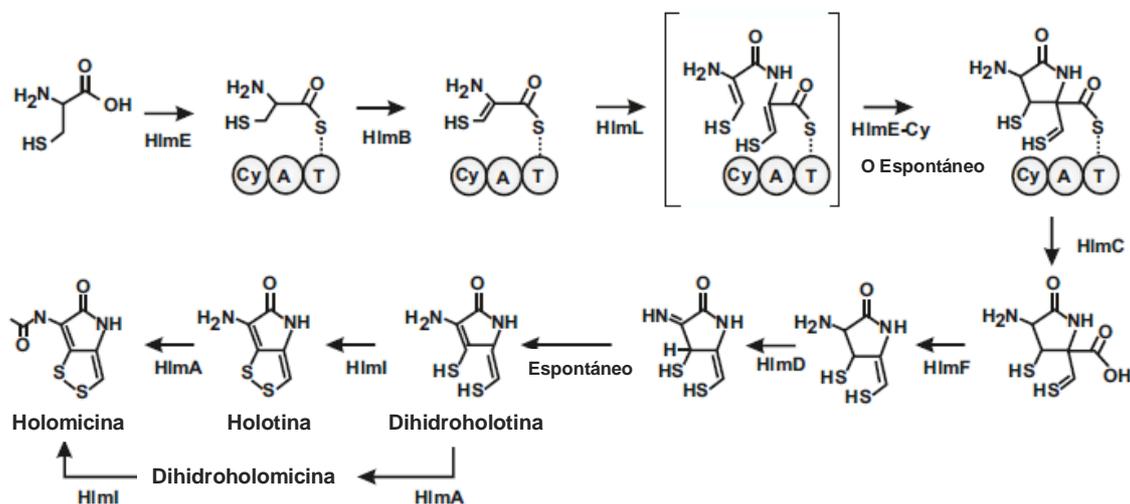


Figura 1.15. Ruta biosintética propuesta por Li y Walsh para la biosíntesis de holomicina.

Modificado de Li y Walsh 2011.

La proteína oxidorreductasa codificada por *hlmI* (*orf3492*) ha sido purificada como proteína recombinante. Esta enzima, homóloga a la gliotoxina tiorredoxina reductasa fúngica, actúa como una ditiol oxidasa dependiente de FAD usando las formas reducidas de holotina y holomicina (dihidroholotina y dihidroholomicina) como sustratos. Las oxidaciones llevadas a cabo por esta enzima sólo se llevan a cabo en condiciones aerobias, lo que indica que el  $\text{O}_2$  es un co-sustrato en la reacción. La acción de esta ditiol oxidasa (*hlmI*) da como resultado el cierre del segundo anillo del cromóforo de la molécula. Con menor afinidad la misma reacción se lleva a cabo por la gliotoxina de *Aspergillus fumigatus* (Li y Walsh, 2011). La delección de *hlmI* da como resultado la pérdida completa de la biosíntesis de holomicina y sensibilidad frente a holomicina en el mutante obtenido (Huang *et al.*, 2011; Li y Walsh, 2011). La holomicina parece ser bastante estable durante la incubación a temperatura ambiente, mientras que la holotina muestra una vida media de  $\approx 30$  min a pH neutro, lo que sugiere cierta inestabilidad (Li y Walsh, 2010), por lo que la acilación del grupo amino en la holotina puede ser una respuesta de autoprotección en los organismos productores y/o de estabilización del producto natural final. (Li y Walsh, 2011; Li *et al.*, 2012), como es el caso de la gliotoxina y el FK228 (Scharf *et al.*, 2010).

### 1.3. Objetivos

- 1) Creación de una genoteca en cósmidos ordenada en forma piramidal de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064.
- 2) Búsqueda y aislamiento de la agrupación génica responsable de la biosíntesis de holomicina en *S. clavuligerus*.
- 3) Análisis transcripcional de la agrupación génica responsable de la producción de holomicina en *S. clavuligerus*. Estudios de expresión diferencial de los genes de la posible agrupación en la cepa silvestre *S. clavuligerus* ATCC 27064 (no productora de holomicina) y en la cepa súper productora de holomicina *S. clavuligerus oppA2::aph*.
- 4) Análisis de la organización transcripcional de los genes que constituyen la agrupación biosintética de holomicina en *S. clavuligerus*.
- 5) Comprobación de la implicación de los genes aislados, en la producción de holomicina: desarrollo de mutantes en distintos genes de la agrupación génica.
- 6) Expresión heteróloga de la agrupación génica responsable de la biosíntesis de holomicina en una cepa no productora del compuesto.

Durante el desarrollo de este trabajo experimental, surgió un nuevo objetivo en colaboración con el Dr. Yair Aharonowitz de la Universidad de Tel Aviv (Israel):

- 7) Determinación de la existencia de un fenómeno de *Riboswitch* en *S. clavuligerus*: efecto sobre diferenciación morfológica y producción de antibióticos.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**



## 2.1. Microorganismos utilizados

### 2.1.1. Cepas de *Escherichia coli*

***E. coli* DH5 $\alpha$**  (Hanahan, 1983). Cepa utilizada habitualmente para la clonación rutinaria de construcciones génicas en experimentos de transformación y amplificación de ADN plasmídico. Entre sus características destacan la alta eficiencia de transformación de sus células competentes y su baja tasa de recombinación. Posee una delección en el extremo 5' del gen *lacZ* del operón *lac*, la cual permite seleccionar los transformantes portadores de cualquier plásmido capaz de realizar la complementación de dicha mutación.

Genotipo: F<sup>-</sup> *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, (rk-mk+), *supE44*, *relA1*,  $\lambda$ -, ( $\phi$ 80d *lacZ* $\Delta$ M15),  $\Delta$ (*lacZYA-argF*), U169.

***E. coli* BW25113/PIJ790** (Datsenko y Wanner, 2000). Cepa utilizada en la tecnología ReDirect<sup>®</sup>. El plásmido PIJ790 contiene la función  $\lambda$ RED (*gam*, *bet*, *exo*) la cual incrementa la tasa de recombinación utilizando ADN lineal, el gen de resistencia a cloranfenicol que permite la selección de cepas transformada con derivados del SuperCos 1 (contiene los genes de resistencia a apramicina y a kanamicina) y un origen de replicación sensible a la temperatura (requiere 30 °C para la replicación).

Genotipo: *lacI*<sup>q</sup> *rrnB*<sub>T14</sub>  $\Delta$ *lacZ*<sub>WJ16</sub> *hsdR514*  $\Delta$ *araBAD*<sub>AH33</sub>  $\Delta$ *rhaBAD*<sub>LD78</sub>

***E. coli* ET12567/pUZ8002** (MacNeil *et al.*, 1992). Cepa donadora en el proceso de conjugación con especies del género *Streptomyces*. Carece de un sistema de metilación funcional (*dam*-, *dcm*-, *hsd*) por lo que el material genético que se transfiere no es metilado y por lo tanto no es degradado por el potente sistema de restricción sensible a la metilación de algunas especies de *Streptomyces*. El plásmido no movilizable pUZ8002 contiene las funciones necesarias para que se produzca la transferencia de vectores que contengan el origen de transferencia *oriT*. Se cultiva en presencia de cloranfenicol para mantener la mutación *dam*- y kanamicina para mantener el plásmido pUZ8002.

Genotipo: *dam-13::Tn9*, *dcm-6*, *hsdM*, *hsdR*, *recF143*, *zjj201::Tn10*, *galK2*, *galT22*, *ara14*, *lacY1*, *xy15*, *leuB6*, *thi1*, *tonA31*, *rpsL136*, *hisG4*, *tsx78*, *mtli glnV44*, F<sup>-</sup>.

***E. coli* XL1-Blue** (Bullock *et al.*, 1987). Cepa deficiente para la recombinación, necesaria para mantener la estabilidad de las construcciones que porta. La mutación *hsdR* evita la digestión del ADN clonado por el sistema de endonucleasas EcoK de *E. coli*. Esta es la cepa hospedadora de la genoteca construida en SuperCos 1.

Genotipo: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI<sup>q</sup>ΔM15 Tn10* (Tet<sup>r</sup>)].

***E. coli* Ess22-31** (Hu *et al.*, 1984). Cepa sensible a los antibióticos β-lactámicos. Microorganismo indicador para la valoración de cefamicina C mediante la técnica del bioensayo.

### 2.1.2. Cepas de *Streptomyces*

***Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064** (Higgins y Kastner, 1971). Cepa silvestre.

***Streptomyces clavuligerus ΔoppA2::aph*** (Lorenzana *et al.*, 2004). Cepa interrumpida en el gen que codifica la oligopéptido permeasa *oppA2*.

***Streptomyces coelicolor* M1154** (Gomez-Escribano y Bibb, 2011). Cepa utilizada para llevar a cabo la expresión heteróloga del clúster de biosíntesis de holomicina.  
Genotipo:  $\Delta act \Delta red \Delta cpk \Delta cda$  *rpoB*[C1298T] *rpsL*[A262G].

***Streptomyces albus* J1074** (Chater y Wilde, 1980). Cepa utilizada para llevar a cabo la expresión heteróloga del clúster de biosíntesis de holomicina.  
Genotipo: *ilv-1, sal-2, RM-*.

### 2.1.3. Otros microorganismos

***Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665**. Cepa productora de una β-lactamasa de clase C. Microorganismo indicador para la valoración de ácido clavulánico mediante la técnica del bioensayo.

***Micrococcus luteus* ATCC 9341.** Cepa sensible a la acción de la holomicina. Microorganismo indicador que se utilizó en la valoración de holomicina mediante la técnica del bioensayo (de la Fuente *et al.*, 2002).

## 2.2. Medios de cultivo

Las composiciones de los medios que a continuación se describen están referidas a volúmenes de 1L, excepto cuando se indique lo contrario. Todos los medios se repartieron en botellas en alícuotas de 100 ml, a no ser que otro volumen aparezca indicado. Para la preparación de medios sólidos se añadió el agar directamente a las botellas. Todos los medios se esterilizaron en autoclave u olla a presión a 121 °C durante 20 minutos.

### 2.2.1. Medios de cultivo para *E. coli*

- **LB (Luria Bertani)** (Miller, 1972). Medio utilizado tanto en forma sólida como líquida para el cultivo de *E. coli*.

Bacto triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g

Ajustar el pH a 7,5 con NaOH 1 N.

- **SOB** (Hanahan, 1983). Medio líquido utilizado para la obtención de células competentes de *E. coli*. Cuando se suplementa con glucosa (50%) se denomina medio **SOC**.

Triptona	20 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	0.584 g
KCl	0.186 g

Antes de utilizar el medio se le añaden  $MgCl_2$  y  $MgSO_4$  esterilizados por filtración, hasta una concentración final de 10mM.

### 2.2.2. Medios de cultivo para *Streptomyces*

- **ME** (Sanchez y Brana, 1996). Medio optimizado para la esporulación de *S. clavuligerus*.

MOPS	21 g
Glucosa	5 g
Extracto de levadura	0.5 g
Extracto de carne	0.5 g
NZ amina	1 g

Se ajusta el pH a 7 y se añade agar al 2%.

- **MS** (Hobbs *et al.*, 1989; Kieser *et al.*, 2000). Medio sólido utilizado para la conjugación intergenérica de *Streptomyces* con células de *E. coli*. Debe esterilizarse en autoclave dos veces.

Manitol	20 g
Harina de soja	20 g

- **SA** (Aidoo *et al.*, 1994). Medio líquido optimizado para la producción de antibióticos en *S. clavuligerus*.

almidón	10 g
L–asparragina	2 g
MOPS	21 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.6 g
$K_2HPO_4$	4.4 g
Fe $SO_4$ 1%	100 $\mu$ l
$MnCl_2$ 1%	100 $\mu$ l

ZnSO <sub>4</sub> 1%	100 µl
CaCl ·3H <sub>2</sub> O 1%	87 µl

En primer lugar, hay que disolver lentamente el almidón en agua caliente (temperatura próxima a su punto de ebullición). Una vez que el almidón esté completamente disuelto se pueden añadir el resto de componentes. Ajustar el pH a 6,8 con KOH.

- **TSB.** Medio utilizado tanto en sólido como en líquido para el crecimiento rápido de cepas de *Streptomyces*. También se utilizó para el crecimiento de los cultivos de *M. luteus*, empleado como inóculo en la elaboración de las placas para bioensayos.

Peptona de caseína	17 g
NaCl	5 g
Peptona de soja	3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5 g
Glucosa	2,5 g

Ajustar el pH a 7,2. Su forma sólida (**TSA**) se utiliza para el crecimiento de *S. clavuligerus*, con agar al 1,3%, y para preparar las placas de bioensayo, con agar al 2%.

- **TBO** (Higgins y Kastner, 1971). Medio sólido utilizado para la esporulación de *Streptomyces coelicolor*.

Pasta de tomate	20 g
Copos de avena	20 g

Ajustar el pH a 6,5 con NaOH 1N.

- **2XTY** (Kieser *et al.*, 2000). Medio utilizado para la germinación de las esporas de *Streptomyces coelicolor* mediante choque térmico.

Triptona	1,6 g
Extracto de levadura	10 g
NaCl	85 mM

Ajustar el pH a 7,2 con NaOH 1 N.

- **YEME.** (Chater *et al.*, 1982). Medio líquido para el crecimiento rápido de *Streptomyces coelicolor*.

Extracto de levadura	3 g
Peptona	5 g
Extracto de malta	3 g
Glucosa	10

## 2.3. Crecimiento y conservación de los microorganismos

### 2.3.1. Crecimiento

Para iniciar los cultivos microbianos se utilizó el método de resiembra, o bien, se emplearon como inóculos viales de cultivos o esporas congelados en glicerol al 20%.

El crecimiento de *E. coli* (excepto la cepa *E. coli* Ess22-31) se llevó a cabo a 37 °C en medio LB, tanto en sólido como en líquido. Los cultivos líquidos se realizaron en matraces lisos, con una agitación de 250 rpm.

La temperatura de crecimiento de *S. clavuligerus* fue de 28 °C. Se utilizaron matraces indentados para los cultivos en medio líquido TSB y SA con una agitación de 220 rpm. El crecimiento estático se realizó en los medios sólidos ME, MS, TSA y SA.

El crecimiento de *Streptomyces coelicolor* se llevó a cabo a 30 °C tanto en medio sólido, TBO y TSA, como en medio líquido, YEME y SA. Cuando se cultivaron en medio líquido, se mantuvieron en un incubador de agitación orbital a 250 rpm en matraces con indentaciones para facilitar la dispersión y oxigenación del micelio.

Los microorganismos indicadores para los bioensayos (*E. coli* Ess22-31, *K. pneumoniae* ATCC 29665 y *Micrococcus luteus* ATCC 9341) se cultivaron en matraces sin indentación a 30 °C y 250 rpm.

### 2.3.2. Determinación del crecimiento de los microorganismos

Cuando fue necesario, el crecimiento tanto de los cultivos líquidos de *E. coli* y de las distintas especies de *Streptomyces* fue estimado basándose en la densidad óptica de los mismos frente a una longitud de onda de 600nm, determinada con la ayuda de un espectrofotómetro Hitachi U-2900.

### 2.3.3. Conservación de los microorganismos

**Conservación de *E. coli* y microorganismos indicadores:** las diferentes cepas utilizadas durante este trabajo se conservaron en placas con medio sólido LB o TSB, protegidas con Parafilm, durante 2 y 4 meses a 4 °C. La conservación a largo plazo se realizó en una suspensión de glicerol, concentración final del 20% (v/v), a -80 °C.

**Conservación de *Streptomyces* spp.:** la conservación a corto plazo se realizó en placas de medio sólido TSA protegidas con Parafilm, durante 2 y 4 meses a 4 °C. La conservación a medio plazo se realizó en una suspensión de glicerol, concentración final del 20% (v/v), a -80 °C. La producción de esporas por algunas cepas de *Streptomyces* permitió la conservación de las mismas en estas formas de resistencia durante largos periodos de tiempo. Las esporas de *Streptomyces* se obtuvieron siguiendo el siguiente protocolo:

1. Sembrar esporas o micelio en placas de medio de esporulación e incubar a 28 °C o 30 °C durante 10-15 días.
2. Verter sobre el cultivo 1 ml de glicerol 20% y raspar la superficie con un bastoncillo de algodón estéril, de manera que las esporas se desprendan de la placa.
3. Recoger la solución de esporas y repetir el proceso hasta que se hayan recolectado la mayor parte de las esporas.
4. Agitar la solución de esporas vigorosamente (*vortex*) y filtrar a través de una punta de micropipeta de 5 ml obturada con un poco de algodón hidrófilo estéril.
5. Centrifugar la solución a 4 °C, durante 10 minutos a 6000 rpm y retirar el sobrenadante.
6. Resuspender el precipitado de esporas en glicerol 20% y conservar a -80 °C en alícuotas de 10 µl.

## 2.4. Reactivos químicos

### 2.4.1. Antibióticos

Las soluciones concentradas de antibióticos (*stocks*) disueltas en agua se esterilizaron por filtración a través de filtros estériles de 0,22 µm de diámetro de poro (Millipore). Los antibióticos disueltos en compuestos orgánicos no necesitan ser esterilizados. Todas estas disoluciones se conservaron a -20 °C.

A continuación se muestra un cuadro con la concentración de las soluciones de antibióticos utilizados para la selección de transformantes y concentración final de uso tanto en medio sólido como en líquido:

Antibiótico	Solución inicial	Concentración final	
		<i>S. clavuligerus</i>	<i>E. coli</i>
Ácido Nadilíxico	25 mg/ml en NaOH 1N		25 µg/ml
Ampicilina	200 mg/ml en agua		100 µg/ml
Apramicina	50 mg/ml en agua	40 µg/ml	50 µg/ml
Cloranfenicol	100 mg/ml en etanol		25 µg/ml
Higromicina	100 mg/ml en agua	50 µg/ml	30 µg/ml
Tetraciclina	100 mg/ml en agua		5 µg/ml

### 2.4.2. Enzimas

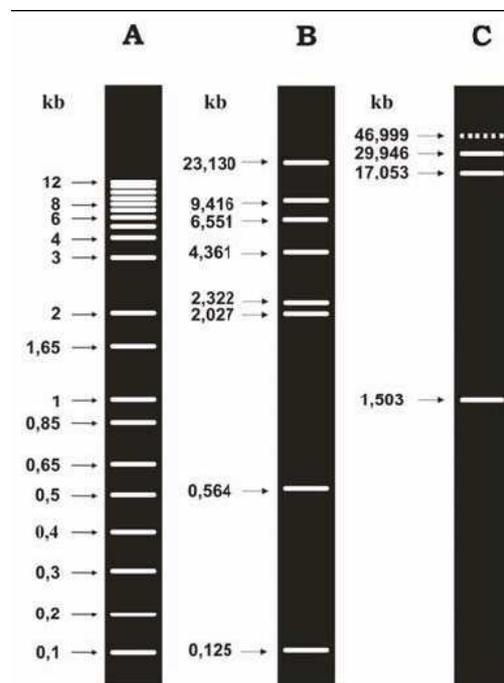
Las enzimas de restricción mencionadas en esta memoria fueron suministradas por las casas comerciales: New England BioLabs, MBI Fermentas y Takara.

Otro tipo de enzimas utilizadas fueron: Fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* (Roche); T4 ADN polimerasa (Fermentas); ligasa del fago T4 (Roche), fosfatasa (Antarctic Phosphatase-BioLabs); lisozima (Fluka Chemical & Biochemical Co); proteinasa K (Merck), *Taq* ADN polimerasa (Promega) Go *Taq*™ ADN polimerasa (Promega); Platinum® Pfx ADN

polimerasa de alta fidelidad (Invitrogen), Phusion® ADN polimerasa de alta fidelidad (New England Biolabs), Dnasa (tanto de Quiagen como de Ambion).

### 2.4.3. Marcadores de peso molecular

- **1kb Plus DNA Ladder** (Invitrogen), marcador comercial que presenta bandas desde 12 kb a 100 pb. Este marcador se diluye en TE a una concentración final de 50 ng/μl. Se utilizan 5 μl por gel.
- **DNA Molecular Weight Marker II, Digoxigenin-labeled** (Roche), marcador comercial marcado con digoxigenina que presenta bandas desde 23 kb a 125 pb (ADN del fago λ digerido con HindIII). Se utilizan 10 μl por gel.
- **ADN del fago λ digerido con KpnI**, presenta bandas de gran tamaño entre 47 y 1,5 kb.
- **ADN del fago λ digerido con PstI**, presenta bandas desde 11,5 kb a 15 pb.



**Figura 2.1.** Esquema de algunos patrones de peso molecular de ADN en gels de agarosa (al 1% en los esquemas A y B y al 0,4% en el esquema C). Mediante flechas se indica el tamaño de los fragmentos en kilobases. **A)** 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); **B)** DNA Molecular Weight Marker II, Digoxigenin-labeled (Roche); **C)** ADN del fago λ digerido con la enzima de restricción KpnI.

#### 2.4.4. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos sintéticos utilizados fueron adquiridos a Sigma-Aldrich® o a Bonsai Technologies en el caso de cebadores necesarios para la tecnología ReDirect® y cebadores marcados con fluoróforos.

Cuando se necesitó añadir secuencias de corte para enzimas de restricción, se siguieron las recomendaciones presentes en el catálogo comercial de New England Biolabs Inc.

### 2.5. Vectores Plasmídicos

- **pIJ773** (Gust *et al.*, 2002). Plásmido que contiene el casete de conjugación *acc(3)IV-oriT* formado por el gen de resistencia a apramicina *acc(3)IV* y el origen de transferencia *oriT* que permite la introducción del plásmido en *Streptomyces* por conjugación con *E.coli*.
- **pIJ10701** (Gust *et al.*, 2002). Plásmido que contiene el gen de resistencia a higromicina *hyg* y el origen de transferencia *oriT* que permite la introducción del plásmido en *Streptomyces* por conjugación con *E.coli*.
- **pIJ787** (Eustaquio *et al.*, 2005). Vector de clonación, usado para la expresión heteróloga, con todos los elementos necesarios para la integración funcional en *Streptomyces* (*attB*, *int* y *oriT*). Contiene el gen de resistencia a tetraciclina.
- **pMS83** (Gregory *et al.*, 2003). Vector bifuncional *E.coli* –*Streptomyces*, transferible mediante conjugación. Se integra en el genoma de *Streptomyces* mediante el reconocimiento del sitio de integración del fago  $\Phi$ BT1.
- **SuperCos 1** (Agilent Technologies Genomics): Cósmido (7,6 kb) (Evans *et al.*, 1989) que se caracteriza por contener: a) secuencias promotoras de bacteriófagos T3 y T7 flanqueando un sitio único de clonación (BamHI); b) sitios *cos* que permiten la inserción de fragmentos de ADN de un tamaño determinado (30-42 kb); c) secuencias de reconocimiento para llevar a cabo con rapidez mapas de restricción; d) sitios únicos de restricción NotI, SacII y SfiI flanqueando el sitio de clonación que permiten extraer

el ADN inserto del vector y e) genes que permiten la amplificación y expresión de los cósmidos recombinantes en células eucariotas. Presenta el origen de replicación en *E. coli ColE1* y además contiene los genes de resistencia a ampicilina y a kanamicina.

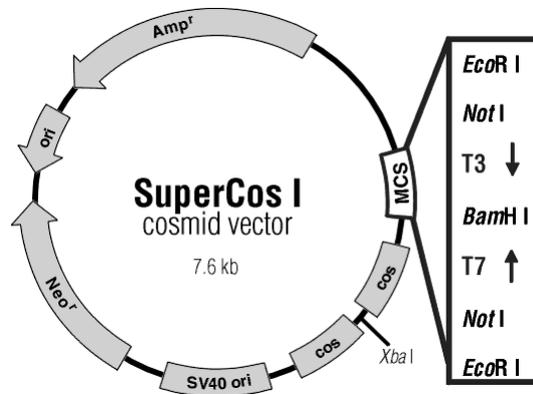


Imagen 2.1. Esquema del Supercos1 (Evans *et al.*, 1989).

- **pGEM<sup>®</sup>-T Easy** (Promega): Vector (3,0 kb) comercial para la clonación de productos de PCR. Este vector se suministra digerido con *EcoRV* y con una timidina en cada extremo 3', de tal forma que los productos de PCR generados con determinadas ADN polimerasas, que añaden una desoxiadenosina en los extremos 3' de los fragmentos amplificados, tienen una elevada compatibilidad para ligar con el vector. Contiene promotores de las ARN polimerasas T7 y SP6 flanqueando un policonector con sitios de restricción específicamente dispuestos para el uso del kit Promega's Erase-a-Base System para la generación de deleciones. Presenta también un origen de replicación de *E. coli* (ColE1) y un origen de replicación monocatenario del fago f1, además de contener un gen de resistencia a ampicilina.

## 2.6. Análisis bioinformático

El análisis y tratamiento rutinario de las secuencias de ADN y proteínas ha sido realizado mediante el paquete informático **Vector NTI Advance<sup>™</sup>** (Invitrogene<sup>™</sup>).

Diversos recursos de internet han sido de gran utilidad, especialmente las bases de datos:

- **EMBL-EBI** ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)).

- GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/)).
- PubMed ([www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/)).

Además se han utilizado diferentes motores de búsqueda y comparación disponibles *online*:

- **BLAST:** Basic Local Alignment Search Tool disponible *online* por European Bioinformatic Institute, EBI ([www.ebi.ac.uk/Tools/blast2/nucleotide.html](http://www.ebi.ac.uk/Tools/blast2/nucleotide.html)) o por National Center of Biotechnology Information, NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)). Motor de búsqueda de las secuencias que presentan una mayor identidad a una secuencia problema.
- **ClustalW2:** herramienta para la realización de alineamientos múltiples ([www.ebi.ac.uk/clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/)).

## 2.7. Estudio de la producción de holomicina y de antibióticos $\beta$ -lactámicos en *S. clavuligerus*

### 2.7.1. Desarrollo de las fermentaciones

A lo largo del desarrollo de este trabajo, las fermentaciones se realizaron en el medio complejo TSB y en el medio definido SA. En el primero de ellos, el crecimiento de *S. clavuligerus* es más rápido generando una mayor biomasa, y da lugar a una mayor producción de cefamicina C. En medio SA, el micelio se desarrolla de forma más dispersa, y la producción de ácido clavulánico y holomicina es mayor que en TSB.

En general, los cultivos para la fermentación se inician directamente inoculando un número determinado de esporas. En cambio, cuando las cepas a analizar están afectadas en la esporulación, como es el caso de la cepa *Streptomyces clavuligerus*  $\Delta oppA2::aph$  (Lorenzana *et al.*, 2004), la fermentación comienza con un preinóculo a partir de micelio congelado en glicerol a -80 °C, haciendo así posible su comparación entre las distintas cepas y también con fermentaciones realizadas previamente en el laboratorio, tanto en la evolución temporal de la producción de antibióticos como en el crecimiento.

El análisis de cada cepa y condición de cultivo empleadas en la fermentación se realizó a partir de los datos obtenidos provenientes de tres o cuatro réplicas. En todas las fermentaciones de este trabajo la producción se ha referido a la concentración de ADN.

Para una correcta realización de la fermentación, incluyendo la recogida y tratamiento de las muestras, se siguió el protocolo indicado a continuación:

Protocolo:

- 1) **Preparación de preinóculos.** Inocular 100 ml de TSB con 0,1-1 ml de micelio congelado en glicerol al 20%.
- 2) Cultivar durante 24-36 horas hasta alcanzar una  $DO_{600}$  entre 5 y 8, para asegurarse que se halle en fase exponencial de crecimiento. Se deben inocular varios matraces por cepa con distintos volúmenes de micelio congelado en glicerol, para asegurarse que alguno de ellos esté en el rango de DO adecuada. Es importante que el inóculo de cepas diferentes partan de preinóculos que se encuentren a una densidad óptica y estado morfológico similar.
- 3) **Inóculos (de  $DO_{600}$  final 0,25).** Recoger 5 ml del preinóculo a  $DO_{600} = 5$  en tubos de 10 ml. Si el valor de la DO es superior, ajustar el volumen de manera inversamente proporcional.
- 4) Centrifugar 10 minutos a 4.200 rpm a temperatura ambiente y desechar el sobrenadante. Si la fermentación se va a realizar en medio SA, lavar el micelio con 10 ml de NaCl 0,9% y volver a centrifugar, desechando el sobrenadante.
- 5) Resuspender el micelio en 100 ml de medio SA o TSB.
- 6) **Recogida de muestras.** Recoger 1 ml de cultivo de cada matraz en tubos de 2 ml, mantenidos en hielo.
- 7) Centrifugar 10 minutos a 14.000 rpm y a 4 °C. Transferir el sobrenadante a tubos de 1,5qml, mantener los tubos en hielo. Realizar inmediatamente el análisis de la producción de ácido clavulánico mediante bioensayo. Almacenar el sobrenadante restante a -80 °C.
- 8) Resuspender el micelio en 1ml de NaCl 0.9%, centrifugar 10 minutos a 14.000 rpm y 4 °C. Eliminar el sobrenadante y guardar a -20 °C, para medir posteriormente la concentración de ADN.

## 2.7.2. Determinación de la concentración de ADN

La medida del crecimiento durante las fermentaciones se realizó a través de la cuantificación de la concentración de ADN, mediante el método colorimétrico de la difenilamina (Burton, 1968). El método se basa en la producción de un compuesto coloreado medible espectrofotométricamente, que se genera al reaccionar la difenilamina con la desoxirribosa.

### Protocolo:

- 1) Resuspender las muestras de micelio en el doble del volumen (2 ml) de la muestra de partida con NaCl 0,9% y homogeneizar en el vórtex. Se pueden hacer diluciones mayores si se espera una alta concentración de ADN.
- 2) Añadir 400  $\mu$ l de HClO<sub>4</sub> a 400  $\mu$ l de cada muestra (incluidos los patrones y un blanco de NaOH 5 mM). Mezclar por inversión e incubar durante 20 minutos a 70 °C. Añadir 800  $\mu$ l (2 volúmenes) de reactivo de difenilamina a cada tubo, mezclar por inversión e incubar a 30 °C durante 15-17 horas.
- 3) Mezclar los tubos por inversión y centrifugar durante 5 minutos a 14.000 rpm para precipitar los restos celulares.
- 4) Medir a 600nm la absorbancia de las muestras y de los patrones de ADN de concentración conocida.
- 5) Representar los valores de absorbancia de los patrones de ADN frente a su concentración.
- 6) Calcular, mediante regresión lineal, la concentración de las muestras referidas en  $\mu$ g ADN/ml. Multiplicar por el factor de dilución aplicado para obtener el valor final.

### **Soluciones:**

- **Acetaldehído acuoso (1,6%).** Mezclar 1 ml de acetaldehído frío en 50 ml de agua. Conservar a 4 °C.
- **Reactivo de difenilamina.** Disolver 1,5 g de difenilamina en 100 ml de ácido acético glacial. Añadir 1,5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La solución es estable durante 3 meses si se mantiene a 4 °C y en oscuridad. En el momento de usar, añadir 100  $\mu$ l de acetaldehído acuoso al 1,6% por cada 20 ml de reactivo de difenilamina.
- **Soluciones patrón de ADN.** Preparar una solución madre (0,3 mg/ml) diluyendo ADN de arenque (Sigma) en NaOH 5 mM. Guardar a 4 °C un máximo de 6 meses.

Utilizar NaOH 5 mM como blanco. Procesar los patrones de ADN y el blanco de la misma manera que las muestras de fermentación. Preparar las muestras patrón según las siguientes diluciones:

Patrón	Dilución	µg/ml	Patrón	Dilución	µg/ml
1	1:50	6	5	1:6	50
2	1:30	10	6	1:5	60
3	1:15	20	7	1:4	75
4	1:10	30	8	1:3	100

### 2.7.3. Cuantificación de ácido clavulánico

La determinación de la concentración de ácido clavulánico se realizó mediante bioensayo, utilizando como microorganismo indicador el productor de  $\beta$ -lactamasas *K. pneumoniae* ATCC 29665, sensible a ácido clavulánico en presencia de penicilina G. El ácido clavulánico en solución se degrada rápidamente, por lo que los bioensayos se llevaron a cabo inmediatamente después de recoger las muestras de fermentación. Todas las muestras se analizaron mediante réplicas en dos placas diferentes.

**Bioensayo para determinar la concentración de ácido clavulánico** (Romero *et al.*, 1984)

Protocolo:

- 1) Cultivar la cepa indicadora en medio TSB a 30 °C hasta que alcance una DO<sub>600</sub> de 0,9-1,1. Conservar a 4 °C durante un periodo de tiempo no superior a una semana.
- 2) Para preparar las placas de bioensayo de 24 cm de lado, fundir una botella de TSA (140 ml, 2% agar) y dejar enfriar a 47 °C en un baño. Añadir 140 ml de penicilina G 10 mg/ml y un volumen del cultivo de *K. pneumoniae* de forma que la DO<sub>600</sub> final sea de 0,033 (4,62 ml para 140 ml de TSB). Agitar suavemente para evitar la formación de burbujas y depositar sobre una placa de bioensayo, previamente nivelada. Una vez solidificado el agar, hacer pocillos de 6 mm de diámetro con un sacabocados.
- 3) Añadir 60 µl de muestra en los pocillos. Incluir en cada placa las soluciones de ácido clavulánico de concentración conocida, para realizar un recta patrón.
- 4) Incubar a 4 °C durante 2 h para que difunda el antibiótico.

- 5) Incubar a 30 °C durante 12-15 horas y medir los halos de inhibición. Descartar los halos de las muestras que tengan un diámetro mayor del halo generado por la solución patrón de ácido clavulánico más concentrada (10 µg/ml).
- 6) Realizar una recta patrón con las muestras de concentración conocidas, representando el logaritmo de la concentración frente al diámetro de halo. Para determinar la concentración de ácido clavulánico (µg/ml) de las muestras, extrapolar el diámetro de halo a la recta obtenida y hallar el valor del antilogaritmo.

**Soluciones:**

- **Soluciones patrón de ácido clavulánico.** Muestras de ácido clavulánico con las siguientes concentraciones: 10 - 7,5 - 5 - 3,75 - 2,5 - 1,25 - 0,625 - 0,312 y 0,156 µg/ml. Se realizan a partir de una solución de ácido clavulánico de 40 µg/ml, preparada en tampón MOPS 100 mM pH 6,8, que deben dar lugar a halos de inhibición de entre 30 y 15 mm de diámetro.

#### 2.7.4. Cuantificación de Cefamicina C

Para determinar la concentración de cefamicina C, se llevaron a cabo bioensayos usando como microorganismo indicador la cepa *E.coli* Ess22-31, sensible a antibióticos β-lactámicos. La cefamicina C es más estable que el ácido clavulánico, por lo que los bioensayos se pueden realizar a partir de los sobrenadantes almacenados a -80 °C (durante un tiempo no superior a una semana). Todas las muestras se analizaron mediante réplicas en dos placas diferentes.

Para realizar los bioensayos se utilizó el mismo protocolo que en el apartado anterior pero sin añadir penicilina G al medio TSA (140 ml, 2% agar), que en este caso debe enfriarse hasta una temperatura de 45 °C. Debido a la falta de cefamicina C pura para realizar patrones de concentración conocidos, la concentración de este antibiótico en las muestras de fermentaciones se determinó mediante la ecuación:

$$y = 10^{[(0.0033351 \cdot x^2) - (0.0162 \cdot x) - 0.07535]}$$

donde y representa la concentración de cefamicina C en µg/ml y x el diámetro del halo en milímetros. Se tuvieron en cuenta valores de halo de hasta 27 mm.

### 2.7.5. Cuantificación de Holomicina

La determinación de la concentración de holomicina se realizó tanto por bioensayo como por HPLC (cromatografía de alta afinidad). Para la realización de los bioensayos se utilizó el microorganismo indicador *Micrococcus luteus* ATCC 9341, sensible a este antibiótico. La estabilidad de la holomicina permitió conservar los sobrenadantes de las muestras de fermentación en metanol al 40% a -20 °C para su análisis.

Las placas de bioensayo se prepararon según el protocolo descrito para la cuantificación de ácido clavulánico y cefamicina C, sin penicilina G en el medio de bioensayo TSA (140 ml, 1% agar).

Para la cuantificación de holomicina por HPLC (de la Fuente *et al.*, 2002) se utilizó una columna Nucleosil C<sub>18</sub> (10 µm; 4 x 250 mm) de Scharlau controlada por un equipo de Shimadzu SPD-M10A VP, con un detector Photodiode Array fijado a 360 nm. La elución se llevó a cabo utilizando un gradiente de metanol 100% y agua mQ (Flujo 1 ml/min). La concentración de metanol fue la siguiente: 0-9 minutos al 40% m, 9-12 minutos al 100%, 12-15 minutos al 40%. Como controles se usaron holomicina y holotina de *S. clavuligerus* y se determinó el tiempo de elución de la holomicina en 4,9 minutos.

## 2.8. Métodos relacionados con la extracción de ADN

### 2.8.1. Limpieza y precipitación de ADN

La eliminación de proteínas y otras impurezas de las soluciones de ADN, se realizó mediante un proceso de extracción con fenol.

#### Protocolo:

- **Para la limpieza:**

- 1) Añadir a la solución de ADN un volumen (1:1) de fenol-CIA y mezclar bien mediante un vórtex.
- 2) Centrifugar la mezcla durante seis minutos a 10.000 rpm.

- 3) Recuperar cuidadosamente la fase superior acuosa y repetir de nuevo el proceso hasta que la solución de ADN presente la interfase libre de impurezas.
  - 4) Añadir a la solución un volumen (1:1) de CIA, para eliminar los restos de fenol.
  - 5) Agitar enérgicamente y centrifugar la mezcla durante cinco minutos a 10.000 rpm.
  - 6) Recuperar la fase acuosa.
- **Para la precipitación.**
    - 1) Añadir a la suspensión acuosa de ADN, 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M, pH 5,2 y dos volúmenes de etanol absoluto (mantenido a -20 °C). Mezclar por medio de un vórtex.
    - 2) Mantener la mezcla al menos durante dos horas a -20 °C ó 30 minutos a -80 °C.
    - 3) Centrifugar a 10.000 rpm durante 30 minutos y a 4 °C.
    - 4) Eliminar el sobrenadante. Lavar el precipitado con 0,5 volúmenes de etanol 70% y centrifugar nuevamente a 10.000 rpm durante cinco minutos a temperatura ambiente. Retirar el sobrenadante y dejar secar el precipitado.
    - 5) Resuspender en agua o en tampón TE. Conservar a 4 °C o congelado (-20 °C) durante largos periodos de tiempo.

**Soluciones:**

- **Fenol-CIA:** 1/2 volumen de fenol neutro pH 7,4: 1/2 volumen de CIA. Fenol neutro: Mezclar 50 g de fenol, 50 mg de hidroxiquinoleína y Tris-HCl 0,1M pH 8,5, dejar reposar hasta que se formen dos fases. Retirar la fase superior y añadir Tris-HCl 0,1M pH 8,5 hasta que se alcance pH 7,4-7,5. Conservar a 4 °C en un recipiente opaco.
- **CIA (Cloroformo-Alcohol isoamílico).** Mezclar 24 partes de cloroformo y una de alcohol isoamílico.

**2.8.2. Eliminación enzimática del ARN**

Los procesos de purificación de ADN conllevan habitualmente la obtención de muestras que presentan contaminación con ARN. Para eliminarlo selectivamente se empleó la enzima ribonucleasa A (RNasa A) de páncreas bovino, libre de DNasas. Se utilizó a una concentración final de 100 µg/ml, incubando la reacción a 37 °C durante una hora.

La solución madre de la RNasa A se preparada a 10 mg/ml en Tris-HCl 10 mM pH 7,5; NaCl 15 mM. Las DNasas presentes se eliminaron por ebullición de la solución durante 15 minutos. Se enfría lentamente y se guarda a -20 °C.

### **2.8.3. Aislamiento de ADN plasmídico de *E. coli***

- **Lisis alcalina.** Este procedimiento se utilizó para la obtención de ADN plasmídico a gran escala. El método fue esencialmente el descrito por Sambrook *et al.* (2001) (Sambrook *et al.*, 2001) con alguna modificación.

#### Protocolo:

- 1) Cultivar la cepa de *E. coli* en medio TB con el antibiótico de selección aproximadamente durante 12 horas a 37 °C y 250 rpm. Para recoger las células se centrifugan los 100 ml de cultivo en Sorvall y rotor GSA durante 5 minutos, a 5.000 rpm y a 4 °C.
- 2) Resuspender las células en 3,6 ml de la solución TEG y pasar a un tubo SS34. Añadir lisozima (10 mg/ml) y 8 ml de la solución 0,2 N NaOH-1% SDS. Mezclar bien por inversión y dejar reposar 5-10 minutos.
- 3) Añadir 4 ml de acetato potásico pH 5,45 frío, agitar fuertemente hasta que la solución adquiera un aspecto blancuzco y dejar reposar 10 minutos en hielo.
- 4) Centrifugar en Sorvall y rotor SS34 durante 15 minutos, a 4 °C y 10.000 rpm. Filtrar por algodón hidrófilo a un tubo de vidrio Corex® y añadir 0,6 volúmenes de isopropanol. Mezclar bien por inversión y precipitar 10 minutos a temperatura ambiente.
- 5) Centrifugar en Sorvall, rotor SS34 y adaptadores, durante 15 minutos a temperatura ambiente y 5.000 rpm. Resuspender el precipitado con 1 ml de etanol 70%. Centrifugar en Sorvall, rotor SS34 y adaptadores, durante 5 minutos a temperatura ambiente y 5.000 rpm. Eliminar el etanol con ayuda de una pipeta y dejar evaporar. Añadir 0,6 ml de tampón TE pH 8, resuspender el precipitado y pasar a un microtubo.
- 6) Añadir 0,6 ml de LiCl 5 M para precipitar el ARN y dejar reposar 5 minutos en hielo. Centrifugar 14.000 rpm a 4 °C durante 10 minutos. Recoger el sobrenadante.
- 7) Añadir 1 volumen de isopropanol. Dejar reposar 10 minutos. Centrifugar a 14.000 rpm durante 10 minutos y a 4 °C. Lavar el precipitado con 1 ml de etanol 70% frío.

- 8) Centrifugar a 14.000 rpm y 4 °C durante 15 minutos. Quitar el líquido con una pipeta y dejar evaporar. Disolver hasta 400 ml de volumen con tampón TE. Llevar a cabo el proceso de limpieza (Ver apartado 2.8.1).
- 9) Precipitar con 1/10 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 2 volúmenes de etanol absoluto y dejar 10 minutos a temperatura ambiente.
- 10) Centrifugar a 14.000 rpm y a temperatura ambiente durante 5 minutos. Lavar con 0,5-1 ml de etanol 70% y resuspender.
- 11) Centrifugar a 14.000 rpm 5 minutos y a temperatura ambiente, eliminar el líquido con una pipeta y dejar evaporar. Disolver en 100 µl de tampón TE y congelar.

**Soluciones:**

- **TEG.** 50 mM glucosa; 25 mM TrisHCl pH 8; 10 mM EDTA.
  - **Solución de lisozima.** 10 mg/ml en agua.
  - **Solución 0,2 N NaOH, 1% SDS.** Añadir en este orden: 7,44 ml H<sub>2</sub>O; 160 ml NaOH 10 N; 400 ml SDS 20%. Preparar en el momento de su uso.
- **Minilisis alcalina.** Este es un procedimiento abreviado de la lisis alcalina, en el cual se obtiene menor cantidad de ADN. Presenta como ventajas sobre la lisis alcalina que la extracción se realiza con menores volúmenes y en menor tiempo.

Protocolo:

- 1) Inocular 5 ml de medio LB con células de E. coli portadoras del plásmido que se pretende aislar. Cultivar durante 12-16 horas a 37 °C en agitación a 250 rpm. El medio debe estar suplementado con los marcadores de resistencia necesarios en cada caso para el mantenimiento del plásmido.
- 2) Recoger las células por centrifugación a 4.800 rpm durante cinco minutos y desechar el sobrenadante.
- 3) Resuspender el precipitado en 200 µl de una solución de lisozima (5 mg/ml) preparada en TEG. Pasar a un microtubo de 2 ml e incubar cinco minutos a temperatura ambiente.
- 4) Añadir 400 µl de solución II de lisis, agitar y mantener en hielo 5 minutos.
- 5) Añadir 300 µl de solución III de lisis, agitar fuertemente y mantener en hielo 10 minutos. Al finalizar este paso la mezcla ha de tener un aspecto mucoso. Centrifugar 10 minutos a 10.000 rpm.
- 6) Recoger con cuidado el sobrenadante para evitar retirar los restos celulares del fondo del microtubo y pasar el sobrenadante a un nuevo microtubo.

- 7) Añadir 0,6 volúmenes de isopropanol, mezclar y dejar 10 minutos a temperatura ambiente.
- 8) Centrifugar a 4 °C durante 20 minutos a 10.000 rpm.
- 9) Eliminar el sobrenadante, secar el precipitado y resuspender en 100 µl de agua Milli-Q.
- 10) Añadir 4 µl de RNasa A, preparada según se describe en el apartado 2.8.2, e incubar 30 minutos a 37 °C.
- 11) Realizar los procesos de limpieza y precipitación descritos en el apartado 2.8.1.
- 12) Resuspender finalmente en 30-50 µl de agua Milli-Q.

**Soluciones:** Las soluciones son las mismas que las empleadas para la lisis alcalina.

- **Minipreparaciones de ADN plasmídico (Minipreps).** Método empleado para el análisis de un alto número de muestras (Holmes y Quigley, 1981).

Protocolo:

- 1) Tomar una colonia con un palillo estéril e inocular un microtubo de 1,5 ml con 1 ml de medio LB suplementado con los marcadores de resistencia necesarios para el mantenimiento del plásmido. Incubar durante 8-14 horas a 37 °C en agitación a 250 rpm.
- 2) Precipitar las células mediante centrifugación a 8.000 rpm, entre tres y cinco minutos.
- 3) Mezclar 350 µl de STET y 3 µl de lisozima (de una solución madre preparada a 50 mg/ml) por cada minipreparación y añadir 350 µl de la mezcla a cada microtubo.
- 4) Resuspender el precipitado agitando vigorosamente durante 40 segundos y hervir durante 45 segundos. Es importante no rebasar este tiempo, o nos exponemos a la aparición de numerosos restos de ADN genómico fragmentado en nuestra purificación final de material plasmídico.
- 5) Centrifugar inmediatamente durante 15 minutos a 10.000-13.000 rpm y eliminar con un palillo estéril el precipitado de restos celulares y proteínas.
- 6) Añadir 360 µl de isopropanol y 36 µl de acetato sódico 3M pH 5,2. Mezclar unos segundos.
- 7) Dejar reposar cinco minutos y centrifugar a temperatura ambiente 15 minutos a 10.000-13.000 rpm.
- 8) Eliminar el sobrenadante y dejar secar el precipitado. Resuspender en 30 µl de agua Milli-Q.

**Soluciones:**

- **STET:** 8% (p/v) sacarosa; 0,5% (v/v) Tritón X-100; 50 mM EDTA, pH 8,0; 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; en solución acuosa.
- **Lisozima:** preparar en solución acuosa a una concentración final de 50 mg/ml.

#### 2.8.4. Aislamiento de ADN total de *Streptomyces*

El método empleado para el aislamiento de ADN total de *Streptomyces* fue el denominado como *Salting out* (Pospiech y Neumann, 1995). El ADN genómico así obtenido se empleó como molde en reacciones de PCR y para su digestión mediante enzimas de restricción, así como para experimentos de hibridación de ácidos nucleicos.

##### Protocolo:

- 1) De un cultivo de *S. clavuligerus* en medio TSB (30 ml) suplementado con glicina al 0,5% y que ha crecido a 28 °C durante 24-36 horas, recoger el micelio centrifugado en Sorvall con rotor GSA a 6.000 rpm durante 20 minutos. Resuspender en 5 ml de solución SET y añadir lisozima a concentración final 20 mg/ml, incubando a 37 °C de 30 a 60 minutos.
- 2) Resuspender el micelio en 5 ml de tampón SET con 100 µl de solución de lisozima (la solución madre de lisozima se preparó a 50 mg/ml y se conservó congelada a -20 °C).
- 3) Incubar a 37 °C durante 30-60 minutos.
- 4) Añadir 140 µl de proteinasa K y 600 µl de SDS 10%. Mezclar por inversión e incubar a 55 °C durante dos horas, mezclando por inversión ocasionalmente.
- 5) Añadir 2 ml de NaCl 5M y mezclar vigorosamente por inversión, dejar enfriar hasta los 37 °C.
- 6) Añadir 5 ml de cloroformo y mezclar por inversión. Mantener 30 minutos a temperatura ambiente invirtiendo el tubo cada cierto tiempo.
- 7) Centrifugar en un rotor Sorvall SS 34 durante 15 minutos a 4.500 rpm a temperatura ambiente. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y añadir 0,6 volúmenes de isopropanol.
- 8) Mezclar por inversión durante 3 minutos. Normalmente se forma un ovillo que se rescata con una punta y la micropipeta. Si el ovillo no puede ser observado a simple vista la mezcla puede ser centrifugada a 6.000 rpm durante 10 minutos para provocar la precipitación del ADN hacia la base del tubo.

- 9) Lavar el ADN con etanol 70% y disolverlo en 200-400 ml de tampón TE a 55 °C, en función de la cantidad de material obtenido. Es importante no forzar la disolución mediante pipeteo para no romper los cromosomas, especialmente en el caso de que el ADN genómico vaya a ser empleado en experimentos de hibridación de ácidos nucleicos.

#### **Soluciones**

- **Tampón SET.** 75 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 8, 20 mM Tris-HCl pH 7,5.
- **Proteinasa K.** preparar en solución acuosa a una concentración final de 20 mg/ml.
- **Tampón TE.** Tris-HCl 10 mM pH 8 y EDTA 1 mM pH 8.

### **2.8.5. Evaluación de la concentración y pureza del ADN**

Cuando las manipulaciones de las que fue objeto el ADN lo requirieron (esencialmente el caso de las aplicaciones descritas en los apartados 2.8.5 y 2.8.6), su concentración y pureza fueron evaluadas espectrofotométricamente con la ayuda de un equipo NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). Este aparato estima la concentración de la muestra basándose en su absorbancia a una longitud de onda de 260 nm (A260), teniendo en cuenta que la absorptividad específica (concentración de una sustancia que determina una unidad de absorbancia a una longitud de onda establecida) para el ADN de doble cadena (ADNdc) es de 50 µg/ml, mientras que en el caso del ADN de cadena sencilla (ADNsc) tiene un valor de 33 µg/ml.

Además, el cociente A260/A280 indica la pureza de la muestra. Una muestra pura de ADN presenta una relación A260/A280 de 1,8. (Sambrook *et al.*, 2001) La presencia de proteínas contaminantes en las muestras reduce este coeficiente, ya que algunos de los residuos de aminoácidos que típicamente aparecen formando parte de las proteínas presentan picos de absorción a 280 nm. Otra relación indicada por el equipo es el cociente A260/A230. Su valor en el caso de ácidos nucleicos puros se encuentra entre 1,8 y 2,2. Valores inferiores indican la presencia de contaminantes no proteicos en las muestras.

## **2.9. Tratamiento enzimático del ADN**

### **2.9.1. Digestión mediante endonucleasas de restricción**

Las enzimas de restricción empleadas a lo largo de este trabajo se utilizaron siguiendo las recomendaciones de los distintos proveedores (Takara Bio Inc., New England Biolabs Inc. y MBI Fermentas). Cada enzima requiere de unas condiciones particulares para su actividad óptima. De este modo, la temperatura de incubación, el pH, las condiciones salinas y los aditivos presentes en el tampón específico de cada enzima resultan factores determinantes para que pueda desarrollar su actividad endonucleasa de manera adecuada.

Se tuvieron en cuenta las siguientes recomendaciones:

- Añadir siempre menos de 1/10 de volumen de enzima con respecto al volumen final de la reacción, con objeto de diluir suficientemente el glicerol presente en las soluciones de conservación de las enzimas (que presentan un 50% volumétrico de este compuesto), evitando que pueda inhibir la actividad enzimática o inducir actividades inespecíficas de tipo STAR, fenómenos que pueden manifestarse desde que el glicerol alcanza el 5% (v/v) en la reacción de digestión.
- Si el ADN se encuentra suspendido en tampón TE, llevar a cabo la reacción en un volumen que supere al menos 10 veces el volumen de ADN a digerir. De esta manera se impide que el TE interfiera con el tampón de reacción.

El esquema seguido en la preparación de una reacción de digestión fue el siguiente:

- Mezclar en un microtubo:

Tampón de digestión (10x)	1/10 del volumen final
ADN	(x) µg de ADN a digerir
Enzima de restricción	1-2 unidades/µg de ADN
Agua Milli-Q	completar hasta volumen final

- Incubar la reacción a la temperatura adecuada para cada enzima, durante un tiempo variable, generalmente de entre dos y cuatro horas.
- Analizar mediante electroforesis en geles de agarosa o purificar y precipitar directamente el ADN desde la mezcla de reacción, según los objetivos que tengamos.

### 2.9.2. Desfosforilación de los extremos 5' del ADN

Este tipo de tratamiento se aplica a los vectores de clonación, que han sido linealizados, para prevenir su religación. Ponderando el tiempo empleado en este procedimiento y los resultados obtenidos, sólo es recomendable recurrir a la desfosforilación bien cuando se pretendan conseguir ligaciones que por algún motivo resulten problemáticas, o bien en el caso de vectores con alto riesgo de religación como los digeridos con una única enzima.

La fosfatasa hidroliza los extremos 5' fosfato del ADN, lo cual impide la formación de enlaces fosfodiéster entre los dos extremos de la misma molécula. Las pautas para una reacción de desfosforilación son las siguientes:

Tampón 10X	1/10 del volumen final
ADN	1-5 µg de ADN digerido
Fosfatasa antártica	1 µl (5 U)
Agua destilada	completar hasta el volumen final

**Condiciones de la reacción:** Incubar 15 minutos a 37 °C en el caso de extremos 5' protuberantes o extremos cohesivos o 60 minutos a 37 °C para la desfosforilación de extremos 3' protuberantes. Es conveniente realizar dos rondas de desfosforilación entre las cuales la mezcla se incuba a 65 °C 10 minutos para inactivar la enzima. Para finalizar, la enzima se elimina por fenolización o bien mediante el uso de los kit de extracción de ADN.

### 2.9.3. Modificación enzimática de los extremos

Los extremos protuberantes generados por las enzimas de restricción fueron, en ocasiones, modificados para obtener extremos romos o semi rellenados y poder ligar así fragmentos de ADN, en principio, no compatibles. En el caso de extremos 5' protuberantes el rellenado de los extremos lo lleva a cabo la actividad polimerasa 5'→3' del fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*. Si los extremos fuesen 3' protuberantes se consiguen extremos romos mediante la actividad exonucleasa 3'→5' de la T4 DNA polimerasa.

Las pautas para preparar una reacción con Klenow son las siguientes:

Nucleótidos (dNTPs)	1mM de cada dNTP necesario
Tampón 10X	1/10 del volumen final
ADN	1 µg
Klenow	1 U
Agua destilada	volumen variable entre 20-50 µl

**Condiciones de la reacción:** 15 minutos a 37 °C. La enzima se inactiva mediante la adición de 2 µl de 0,2 M EDTA (pH 8,0) o mediante el calentamiento a 65 °C durante 10 minutos.

El esquema de una reacción con T4 ADN polimerasa es el siguiente:

Tampón 5X	1/5 del volumen final
ADN digerido o producto de PCR	1 µg
dNTPs (2 mM)	1 µl
T4 ADN polimerasa	1 U
Agua destilada	hasta 20 µl

**Condiciones de la reacción:** Mezclar y centrifugar brevemente. Incubar a 11 °C durante 20 minutos o a temperatura ambiente durante 5 minutos. Parar la reacción calentado a 75 °C durante 10 minutos.

#### 2.9.4. Ligación de fragmentos de ADN

La ADN ligasa del fago T4 es una enzima que cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre los extremos 3'-hidroxilo y 5'-fosfato del ADN de doble cadena, requiriendo Mg<sup>2+</sup> y ATP como cofactores. Se empleó en todos los casos siguiendo las instrucciones del fabricante (Roche).

El esquema para preparar una reacción de ligación fue el siguiente:

- Mezclar en un microtubo:

ADN del vector	50-100 ng
ADN del inserto <sup>(*)</sup>	cantidad variable, depende de la situación <sup>(*)</sup>
Tampón de ligación (10x)	1/10 volumen final
Ligasa del fago T4	2-7 Unidades <sup>(^)</sup>
Agua destilada	completar hasta 10 µl <sup>(φ)</sup>

- La ligasa del fago T4 es enormemente flexible en cuanto a las temperaturas de incubación que admite su actividad. En general, para las ligaciones con extremos cohesivos se incubó la mezcla a 37 °C durante 30 minutos, y a temperatura ambiente y cuatro horas para los romos. También es posible probar a temperaturas más bajas (entre 4 °C y 16 °C) y tiempos más largos (toda la noche).
- Inactivar la ligasa por calentamiento a 65 °C durante 10 minutos. Centrifugar brevemente.
- Transformar en una cepa apropiada de *E. coli*.

<sup>(\*)</sup> La relación estequiométrica entre vector e inserto varió entre 1:3 y 1:15. En general, las ligaciones basadas en moléculas de ADN con los extremos romos resultan más improbables y complicadas, por lo que se procura que en esos casos exista un mayor número de moléculas de inserto en relación al vector que en los casos de extremos cohesivos, con el fin de facilitar su incorporación.

<sup>(^)</sup> La reacción se efectúa en el mínimo volumen posible (preferiblemente 10 µl), excepto cuando se trata de una auto-ligación. En este caso se recomienda emplear 50 µl como volumen final.

<sup>(φ)</sup> En una ligación de extremos cohesivos se utilizaron entre 2-4 unidades de enzima y la incubación duró entre 1 y 6 horas. Cuando se trató de una ligación con extremos romos se llegaron a usar hasta 7 unidades de enzima y se empleó polietilenglicol (PEG 4000) al 5% de concentración final, para favorecer la concentración “efectiva” de moléculas de ADN.

## 2.10. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta técnica descrita inicialmente por Mullis y Faloona (1987) (Mullis y Faloona, 1987) consiste en la obtención de un elevadísimo número de copias de un determinado fragmento de ADN, gracias a la repetición cíclica de tres pasos fundamentales:

**1. Desnaturalización.** Consiste en la separación de las dos cadenas del ADN molde (el ADN que incluye la secuencia que se desea amplificar) mediante la incubación a elevada temperatura (92–96 °C). Las hebras disociadas permanecerán de esta forma en la solución hasta que la temperatura baje lo suficiente como para permitir la unión de los cebadores.

**2. Anillamiento de los cebadores.** Consiste en la unión de dos oligonucleótidos a sus secuencias complementarias en el ADN molde. Cada uno de los cuales es complementario a una de las dos cadenas del ADN y están diseñados para quedar enfrentados por sus extremos 3' tras la hibridación, flanqueando la región a amplificar, cuyo tamaño quedará por lo tanto determinado por la distancia existente entre los dos cebadores. La temperatura escogida para llevar a cabo este paso constituye un factor crítico en la especificidad y en la eficiencia de la PCR, aunque como orientación puede decirse que suele estar unos 5 °C por debajo de la temperatura de fusión más baja de los dos oligonucleótidos de cada pareja.

**3. Extensión.** Consiste en la síntesis del ADN desde el extremo 3' de los cebadores por la acción de una ADN polimerasa termoestable que emplea como molde la región flanqueada por los mismos, a una temperatura próxima a los 72 °C, durante un tiempo que depende de la longitud del fragmento a amplificar.

En el mercado existen diversas ADN polimerasas que se pueden usar para PCR, teniendo cada una de ellas con unas características propias y requiriendo unas condiciones específicas para llevar a cabo la reacción. Para este trabajo, se han empleado dos enzimas siguiendo siempre las instrucciones de sus respectivos fabricantes:

- **GoTaq DNA polymerase** (Promega), cuando la introducción de un pequeño número de errores no resultaba crucial para el experimento o bien cuando se pretendía determinar la temperatura óptima de hibridación de unos nuevos oligonucleótidos. Esta enzima deja una desoxiadenosina en cada extremo 3'.
- **Phusion Hot Start DNA polymerase** (Finnzymes), se utilizó cuando la fidelidad en la copia se hizo imprescindible, es decir, siempre que los fragmentos amplificados fuesen

a ser objeto de una clonación posterior. Esta polimerasa genera extremos romos en los fragmentos amplificados.

En la Tabla 2.1 se especifican, de acuerdo al catálogo *PCR applications manual* (Roche), los valores normales de los distintos componentes para la realización de un típica reacción de amplificación por PCR. Estos valores son orientativos y han de ser ajustados en función de la ADN polimerasa (según las instrucciones de su fabricante), el tipo de región a amplificar y otros factores. En el caso concreto de la realización de reacciones de PCR que tengan como molde ADN de *Streptomyces*, dado su elevado contenido en G+C, es necesario emplear como aditivo DMSO (entre un 5 y un 7% del volumen final) en la mezcla de PCR, con el fin de facilitar la separación de las hebras del ADN molde (que tiende a formar estructuras secundarias) y aumentar la eficiencia de la reacción.

Los tiempos y temperaturas empleados para llevar a cabo una reacción de PCR dependen de diversos factores, como el contenido en G+C del ADN, la secuencia de los oligonucleótidos empleados como cebadores (que determina la temperatura de hibridación empleada), la longitud del fragmento a amplificar o la velocidad de procesamiento de la ADN polimerasa, entre otros. De modo genérico estos tiempos y temperaturas aparecen reflejados en la tabla 2.2.

<b>ADN Molde</b>	1-10 ng ADN genómico (ó 0,1-1 ng ADN plasmídico)
<b>Cebadores (18-24 pb)</b>	0,1-0,6 $\mu$ M
<b>ADN polimerasa</b>	0,5-2,5 unidades
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	1-5 mM (normalmente 1,5 mM)
<b>dNTPs</b>	50-500 $\mu$ M de cada uno (normalmente 200 $\mu$ M)
<b>Tampón 10x</b>	1x
<b>Agua</b>	completar volumen de reacción

**Tabla 2.1.** Componentes necesarios para realizar una reacción de PCR y concentraciones finales para 50  $\mu$ l de reacción.

Segmento		Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial		94-98 °C	4-6 minutos	1
Amplificación	Desnaturalización	94-98 °C	30-60 segundos	25-35
	Hibridación	Según el cebador	30-45 segundos	
	Extensión	72 °C	30-240 segundos	
Extensión final		72 °C	5-10 minutos	1

**Tabla 2.2.** Tiempos y temperaturas de reacción típicos para una reacción de PCR.

Al finalizar cualquier reacción de PCR, se debe analizar el resultado de la misma en un gel de agarosa, comprobando el tamaño y la cantidad del fragmento amplificado, así como la presencia o ausencia de bandas de amplificación inespecíficas.

## 2.11. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

La electroforesis en geles de agarosa se realizó básicamente según las descripciones realizadas por Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.*, 2001). Se utilizó agarosa (Pronadisa) disuelta por calentamiento en tampón TAE (\*) con concentraciones entre 0,3% y 2% (p/v) dependiendo del rango de tamaños de los fragmentos de ADN a separar (Tabla 2.3). Las muestras de ADN se mezclaron con tampón de carga 10x (Takara), a una concentración final 1x, para ayudar en la carga de los pocillos y para servir de referencia de la movilidad de la muestra durante la electroforesis. Por norma general, la electroforesis se llevó a cabo en cubetas de metacrilato diseñadas a tal efecto (Bio-Rad) y a un voltaje de entre 70 y 90 V. La duración de la electroforesis vino dada por la longitud del gel empleado, así como del tamaño de los fragmentos de ADN a estudiar en cada caso. Tras ese tiempo, el gel era teñido mediante su inmersión en una solución de bromuro de etidio, y el resultado visualizado y fotografiado durante su exposición a luz ultravioleta en un transiluminador.

El tamaño de los fragmentos de ADN separados por electroforesis se determinó por comparación con marcadores de peso molecular de ADN.

Concentración de agarosa (%)	Tamaño de los fragmentos de ADN separados (kb)
0,5	1-20
0,7	0,8-12
1	0,5-10
1,5	0,2-3
2	0,05-2

**Tabla 2.3.** Concentraciones de agarosa utilizadas en los geles para la resolución de fragmentos de ADN de diferentes tamaños.

(\*) TAE 50x: 242 g de Tris base (2 M); 57,1 ml de ácido acético glacial [5,7% (v/v)]; 100 ml de EDTA 0,5 M pH 8,0 (50 mM) y agua destilada hasta completar un litro.

## 2.12. Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa

En determinadas ocasiones, tras la separación de muestras de ADN mediante electroforesis, fue necesario purificar de la agarosa fragmentos concretos con el fin de ser empleados en manipulaciones posteriores.

Para realizar la extracción de ADN de geles de agarosa se utilizaron dos métodos. El primero de ellos es una técnica tradicional basada en la congelación rápida de la banda de agarosa y su posterior centrifugación a través de lana de vidrio o algodón hidrófobo. El segundo es un método comercial que fue utilizado siguiendo las recomendaciones del fabricante.

### 2.12.1. Método de congelación rápida (*Freeze-squeeze*)

Esta técnica es conocida como *freeze-squeeze* (Tautz y Renz, 1983). Es un método rápido y sencillo, con un porcentaje de recuperación de ADN del 80%. En este procedimiento ha sido sustituido el uso de lana de vidrio (nociva por inhalación) por algodón hidrófobo.

Protocolo:

- 1) Una vez separado el ADN mediante electroforesis, tras la tinción y visualización, cortar la banda del gel procurando escindir la menor cantidad de agarosa posible. Introducir el fragmento de agarosa en un microtubo de 1,5 ml y congelar la banda a -20 °C durante 10-15 minutos.
- 2) Colocar un microtubo, al que se ha practicado un orificio en el fondo y se ha obturado con algodón hidrófobo, sobre un microtubo intacto. Situar la banda en el microtubo agujereado y centrifugar a 11.000 rpm durante 5-8 minutos.
- 3) Recoger la fase acuosa recolectada en el tubo inferior. Limpiar y precipitar tal como se describe en el apartado 2.8.1.
- 4) Resuspender el precipitado en un volumen de agua Milli-Q de 10-20 µl.

### **2.12.2. Método de purificación en columnas GFX**

La extracción de los fragmentos de ADN se realizó mediante el *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham-Biosciences). Este kit emplea un agente caotrópico que desnaturaliza las proteínas, disuelve la agarosa y promueve la unión del ADN de doble cadena (0,1-48 Kb) a la matriz de la columna. Una vez que el ADN es retenido, las proteínas y sales contaminantes son eliminadas mediante un lavado. El ADN es posteriormente eluído en un buffer de baja fuerza iónica. El porcentaje de recuperación es mayor del 60%.

Protocolo, una vez separado el ADN mediante electroforesis, cortar la banda del gel procurando escindir la menor cantidad de agarosa posible:

- 1) Introducir el fragmento de agarosa en un microtubo de 1,5 ml de peso conocido, pesándose posteriormente el conjunto tubo-agarosa. Deducir el peso de agarosa.
- 2) Adicionar 10 ml de tampón de captura (\*) por cada 10 mg de agarosa. Mezclar vigorosamente en vórtex e incubar a 60 °C durante 5-15 minutos (hasta completa disolución de la agarosa).
- 3) Transferir la muestra a una columna GFX e incubar un minuto a temperatura ambiente. Centrifugar durante 30 segundos a 10.000 rpm.
- 4) Descartar el eluído y adicionar a la columna 500 µl de tampón de lavado (\*).
- 5) Centrifugar durante 30 segundos a 10.000 rpm.
- 6) Transferir la columna a un nuevo microtubo de 1,5 ml y añadir 15-50 µl de tampón de elución (\*) e incubar por un minuto a temperatura ambiente.

7) Centrifugar durante un minuto a 10.000 rpm, para recuperar el ADN purificado.

(\*) Tampones de captura y de lavado: soluciones incluidas en el kit.

(\*) Tampón de elución: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0. También se puede usar agua Milli-Q.

## 2.13. Secuenciación de ADN

El proceso de secuenciación se realizó por el método de los didesoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977), que requiere como molde ADN de cadena sencilla para que la ADN polimerasa actúe. Este molde puede conseguirse a partir de vectores del tipo fagémido o por desnaturalización de ADN bicatenario en una reacción de PCR.

Para ello se ha empleado el sistema de secuenciación automática no radioactiva *ABI Prism 3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) y el *ABI PRISM®BigDye®Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems).

La síntesis de ADN complementario a un ADN de cadena sencilla a partir de un cebador la realiza la ADN polimerasa del fago T7. La síntesis se puede detener de forma aleatoria por la introducción de pequeñas cantidades de didesoxinucleótidos (ddNTP), análogos a los desoxinucleótidos (dNTP) que carecen del grupo 3' hidroxilo necesario para la formación del siguiente enlace fosfodiéster. Estos didesoxinucleótidos están conjugados con un fluoróforo específico para cada uno de los mismos.

En la fase de elongación, la ADN polimerasa incorpora los ddNTPs al azar en distintos tiempos, dando lugar a una población de moléculas fluorescentes de distintos tamaños. Las reacciones son sometidas a electroforesis en capilar y los fragmentos de ADN en su migración a lo largo del mismo atraviesan un haz fijo de luz láser, lo que genera señales fluorescentes que son detectadas y almacenadas por el sistema.

## 2.14. Hibridación de ADN (*Southern blotting*)

### 2.14.1. Transferencia del ADN a una membrana de nailon

La transferencia a un soporte sólido de fragmentos de ADN obtenidos por digestión con endonucleasas de restricción y sometidos a migración electroforética en geles de agarosa se denomina *Southern blotting* (Southern, 1975). Esta técnica se basa en la fragmentación *in situ* del ADN, desnaturalización del mismo y transferencia de los fragmentos en forma monocatenaria a la membrana, para su posterior fijación a la misma mediante radiación ultravioleta. Actualmente se lleva a cabo la transferencia empleando un sistema de vacío (VacuGene XL, GE Healthcare).

Procedimiento:

- 1) Separar el ADN mediante electroforesis (apartado 2.11), teñirlo y fotografiarlo.
- 2) Cortar un filtro de nailon 1 cm por cada lado mayor que el tamaño del gel y humedecerlo con agua destilada durante 1 minuto y después con SSC 20x <sup>(\*)</sup> durante 5 minutos. Depositarlo en la unidad de transferencia, ensamblada de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- 3) Encender la bomba de vacío (transferir a 50 mbares).
- 4) Cubrir toda la superficie del gel con solución depurinizante <sup>(\*)</sup> y dejar 15-20 minutos (en este tiempo el frente de migración del azul de bromofenol debe cambiar su color de azul a amarillo). Transcurrido este tiempo se retira la solución.
- 5) Cubrir la superficie del gel con solución desnaturalizante <sup>(E)</sup> durante 15-20 minutos (el azul de bromofenol recupera su color azul original).
- 6) Retirar la solución y cubrir la superficie del gel con la solución neutralizante <sup>(a)</sup> durante 20-25 minutos.
- 7) Retirar la solución neutralizante y cubrir la superficie del gel con SSC 20x durante 60-120 minutos.
- 8) Retirar todo el líquido y marcar la posición de los pocillos del gel sobre el filtro (con bolígrafo), antes de retirarlo. Apagar la bomba de vacío.
- 9) Retirar el gel transferido y verificar la eficiencia del proceso por medio de una tinción con bromuro de etidio.
- 10) Colocar el filtro sobre papel Whatman 3MM y fijar el ADN mediante la aplicación de luz ultravioleta al filtro (UV-Stratalinker 2400, Stratagene). Lavarlo con SSC 6x para eliminar el exceso de sales y dejarlo secar.
- 11) Estos filtros se pueden conservar a 4 °C protegidos con papel Whatman 3MM y papel de aluminio durante varios meses.

<sup>(\*)</sup> **SSC 20x.** 3 M NaCl; 0,3 M citrato sódico, pH 7,0.

<sup>(\*)</sup> **Solución depurinizante.** 0,25 M HCl.

<sup>(E)</sup> **Solución desnaturalizante.** 1,5 M NaCl; 0,5 N NaOH.

<sup>(a)</sup> **Solución neutralizante.** 1,5 M NaCl; 0,05 M Tris-HCl, pH 7,2; 1 mM EDTA.

### 2.14.2. Transferencia *in situ* de ADN de colonias

Esta técnica se emplea cuando el ADN que se pretende hibridar procede de una colonia, generalmente con el fin de rastrear una genoteca. Este proceso se realizó según el método descrito en el Manual específico de hibridaciones con digoxigenina (*DIG Application Manual for Filter Hybridization 2000*, Roche Diagnostics GmbH).

#### Protocolo:

- 1) Cultivar colonias aisladas en placas de medio LA suplementado con el antibiótico adecuado, sobre una membrana de nailon durante 16-20 horas.
- 2) Para realizar la lisis celular, saturar 2 hojas de papel *Whatman* 3MM (de tamaño ligeramente superior al de la membrana) en bandejas diferentes con: solución desnaturalizante, solución neutralizante y SSC 2X (2 hojas para cada solución).
- 3) Colocar la membrana (con las colonias hacia arriba) sobre el papel embebido en la solución desnaturalizante durante 15 minutos.
- 4) Secar brevemente la membrana dejándola sobre papel de filtro.
- 5) Colocar la membrana sobre el papel embebido en solución neutralizante durante 15 minutos. Volver a secar dejando la membrana sobre papel de filtro.
- 6) Colocar la membrana sobre el papel humedecido con SSC 2X durante 10 minutos.
- 7) Colocar la membrana sobre papel de filtro y fijar el ADN a la membrana mediante luz ultravioleta (UV-Stratalinker 2400, Stratagene).
- 8) Forrar una bandeja del tamaño de la membrana con papel de aluminio. Colocar la membrana en dicha bandeja y humedecerla con una solución de proteinasa K (2 mg/ml). Incubar una hora a 37 °C.
- 9) Colocar la membrana entre pliegos de papel de filtro humedecidos con agua destilada y aplicar presión con un rodillo. Al retirar el papel parte de los restos celulares se quedan adheridos al mismo y son a su vez eliminados. Limpiar con cuidado la membrana frotando la superficie suavemente con pañuelos de papel humedecidos en agua destilada.

**Soluciones.** Ver apartado anterior (2.14.1).

### 2.14.3. Marcaje de sondas de ADN

El fragmento de ácido nucleico utilizado como sonda en procesos de hibridación debe ser marcado de tal forma que sea posible su posterior detección. El sistema de marcaje no radiactivo comercializado por la compañía Roche (*DIGHigh Prime*) emplea un hapteno esteroide (digoxigenina) para marcar fragmentos de ADN. La digoxigenina está unida al nucleótido trifosfato dUTP por un enlace éster susceptible de ser eliminado en condiciones alcalinas, lo que facilita la posterior reutilización de los filtros ya utilizados. Las sondas marcadas con digoxigenina son generadas enzimáticamente por el método de cebado al azar (Feinberg y Vogelstein, 1983).

El método se basa en la incorporación al azar en el ADN de un análogo de nucleótidos (digoxigenina-1-dUTP), gracias a la extensión de hexanucleótidos iniciadores por el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*. El procedimiento está ajustado (proporción de DIG-11-dUTP frente a dTTP) para que cada 20 ó 25 nucleótidos incorporados se introduzca una molécula de digoxigenina. Esta densidad de haptenos en el ADN proporciona una gran sensibilidad en la inmunodetección posterior por anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con la enzima fosfatasa alcalina.

Para el marcaje de las sondas se siguieron las instrucciones del sistema *DIG-High Prime* (Roche).

#### Protocolo:

- 1) Obtener 1-3 µg de ADN en forma lineal del fragmento a marcar en un volumen máximo de 15 µl.
- 2) Desnaturalizar el ADN hirviéndolo durante 10 minutos y transferirlo rápidamente a hielo. Añadir 2 µl DIG DNA labeling mix 10X, 2 µl de hexanucleotides mix 10X y 1 µl de Klenow. Centrifugar para recoger la muestra en el fondo del microtubo.
- 3) Incubar la mezcla a 37 °C al menos durante 60 minutos. Preferiblemente incubar entre 16 y 24 horas.
- 4) Parar la reacción congelando directamente o añadiendo 2 µl de EDTA 0,25 mM, pH 8,0 y mantener a -20 °C hasta su utilización.

#### 2.14.4. Hibridación y detección de ADN

El proceso de hibridación se lleva a cabo una vez que se ha realizado la transferencia del ADN y se ha marcado la sonda. En el proceso completo de hibridación se pueden distinguir cuatro fases: prehibridación, hibridación, lavados y detección.

La **prehibridación** tiene como finalidad bloquear los sitios activos de la membrana donde no se han unido ácidos nucleicos durante la transferencia y equilibrar ésta con el tampón de prehibridación.

La **hibridación** en sentido estricto permite la unión de la sonda marcada al ADN fijado en la membrana. La especificidad de esta unión depende tanto de las condiciones utilizadas durante la incubación (temperatura a la que se desarrolla la hibridación y la concentración de sales y detergentes en el tampón de hibridación) como de las utilizadas en los lavados posteriores.

Los **lavados** permiten la eliminación selectiva de las uniones inespecíficas que hayan podido producirse entre la sonda y el ADN. La disminución de la unión inespecífica durante los lavados se consigue:

- Disminuyendo la concentración de sales del tampón de lavado.
- Aumentando la concentración de detergentes en el tampón de lavado.
- Y aumentando la temperatura y la duración del lavado.

La **detección** realizada en este trabajo permite visualizar la unión de la sonda con los fragmentos de ácidos nucleicos mediante reacción colorimétrica en las hibridaciones resueltas con NBT y BCIP.

Las hibridaciones tipo *Southern* siempre se realizaron con sondas de ADN bicatenario marcadas con digoxigenina. La temperatura óptima de hibridación para cada sonda se dedujo de forma experimental; en el caso de las sondas 100% homólogas, la temperatura utilizada fue de 80 °C, siendo reducida solo en casos de sondas con baja homología.

Protocolo:

- 1) Colocar la membrana en una bolsa de hibridación y añadir 20 ml de solución de prehibridación por cada 100 cm<sup>2</sup> de membrana. Sellar la bolsa herméticamente e incubar a la temperatura a la que se va a realizar la hibridación durante 1-2 horas.
- 2) Hervir la sonda previamente marcada 10 minutos para desnaturalizar el ADN. Enfriar rápidamente en hielo. Añadir la sonda así desnaturalizada a una nueva solución de prehibridación. Esta solución de hibridación puede ser reutilizada varias veces, en caso de ser así, desnaturalizar de igual manera.
- 3) Eliminar la solución de prehibridación y añadir la solución de hibridación, dejando el conjunto a la temperatura de hibridación un mínimo de 8-10 horas. Tras el tiempo de hibridación, recuperar la solución de hibridación en un tubo para su reutilización y conservarla a -20 °C.
- 4) Lavar dos veces la membrana con solución de lavado I durante 15 minutos a temperatura ambiente en agitación.
- 5) Lavar dos veces la membrana con solución de lavado II durante 25 minutos a 65 °C en agitación.
- 6) Equilibrar la membrana con tampón I durante 1 minuto en agitación.
- 7) Bloquear la membrana con tampón II durante 30 minutos, en agitación.
- 8) Sustituir el tampón II por la solución de anticuerpos y dejar al menos 30 minutos en agitación.
- 9) Eliminar la solución de anticuerpos, lavar la membrana 2 veces con tampón I durante 15 minutos en agitación.
- 10) Eliminar el tampón I y sustituirlo por tampón III durante 2 minutos, en agitación.
- 11) Mezclar 45 µl de solución NBT y 35 µl de solución X-fosfato por cada 10 ml de tampón III y añadir esta solución de color a la membrana y mantenerla en oscuridad hasta que aparezcan señales de hibridación (precipitado marrón en el filtro).
- 12) Retirar la solución de color y detener la reacción añadiendo agua destilada o TE.

**Soluciones:**

- **Solución de prehibridación.** 5X SSC; 1% agente bloqueante (Blocking Reagent de Roche); 0,1% N-lauril sarcosina; 0,02% SDS.
- **Solución de hibridación.** Solución de prehibridación suplementado con la sonda marcada.
- **Solución de lavado I.** 2X SSC y 0,1% SDS.

- **Solución de lavado II.** 0,1X SSC y 0,1% SDS.
- **Tampón I.** 100 mM ácido maleico; 150 mM NaCl, pH 7,5.
- **Tampón II.** Tampón I suplementado con 0,5-1% de agente bloqueante (Blocking Reagent de Roche).
- **Tampón III.** Se preparan de forma independiente las soluciones *stock* (10x): 1 M Tris-HCl, pH 9,5; y por otro lado 1 M NaCl; 500 mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O. En el momento de uso, ambas soluciones se mezclan para formar el Tampón III (1x).
- **Solución de anticuerpos.** Diluir en proporción 1:10.000 los anticuerpos antidigoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina (Roche) en tampón II.
- **Solución NBT (Azul de nitrotetrazolio).** NBT 75 mg/ml en dimetilformamida 70% en agua destilada.
- **Solución X-fosfato (BCIP).** 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato 50 mg/ml en dimetilformamida.

## 2.15. Introducción de ADN en *E. coli*

A lo largo de este trabajo, la transformación mediante choque térmico fue el método empleado para la introducción en *E. coli* de las diferentes construcciones plasmídicas. Para ello, primero fue necesario obtener células competentes de la cepa receptora del plásmido.

### 2.15.1. Obtención de células competentes

Para introducir ADN en *E. coli* por medio del método de transformación, se requiere una disponibilidad de las bacterias que facilite el paso de las moléculas de ADN a través de las barreras externas de la célula. A este estado se le denomina competencia y a las células que lo presentan, células competentes. Se siguieron dos métodos de inducción del estado de competencia dependiendo de la eficiencia deseada en cada caso: un método basado en el uso de cationes divalentes que utiliza cloruro de rubidio (Hanahan, 1985) y el método SEM (del inglés *simple and efficient method*) descrito por Inoue *et al.* 1990 (Inoue *et al.*, 1990). Este segundo método está basado en el procedimiento del cloruro de rubidio y, aunque no se consigue la alta eficiencia que presenta el primero, requiere de soluciones más baratas (el cloruro de rubidio es un compuesto caro) y es ms reproducible en cuanto a la eficiencia conseguida. El método SEM se empleó de manera rutinaria para inducir el estado de

competencia de diferentes cepas de *E. coli*, especialmente de las DH5 $\alpha$  que se utilizaron como células hospedadoras de mezclas de ligación (nuevas construcciones de plásmidos). Mientras que, el método de cloruro de rubidio fue el procedimiento seguido para obtener la competencia de las cepas de *E. coli* ET12567/pUZ8002, ya que para ciertos experimentos de transformación con cósmidos se requería una alta eficiencia.

- **Método del cloruro de rubidio** (Hanahan, 1985). La utilización de este método permite la obtención de células competentes de *E. coli* con una eficiencia de transformación de hasta 10<sup>8</sup> transformantes por  $\mu\text{g}$  de ADN.

#### Protocolo:

- 1) Cultivar *E. coli* en medio LB sólido para obtener un cultivo fresco.
- 2) Inocular 5 ml de medio SOB suplementado con la solución de magnesio (2ml por cada 100 ml de SOB) con una colonia de *E. coli*. Incubar toda la noche (12-14 horas) a 37 °C y 250 rpm.
- 3) Inocular 100 ml de SOB suplementado con magnesio con 200-400  $\mu\text{l}$  del preinóculo. Incubar a 37 °C y 250 rpm hasta alcanzar la DO<sub>600</sub> de 0,48.
- 4) Enfriar el matraz en hielo y, a partir de este paso, trabajar en frío. Recoger las células por centrifugación en tubos de centrífuga tipo GSA a 5.000 rpm y 4 °C durante 5 minutos y retirar el sobrenadante.
- 5) Resuspender suavemente el precipitado celular en 30 ml de solución fría (4 °C) RF1. Mantener en hielo durante 30 minutos.
- 6) Centrifugar 5 minutos a 5.000 rpm y 4 °C y retirar el sobrenadante.
- 7) Resuspender el precipitado en 8 ml de la solución fría (4 °C) RF2.
- 8) Repartir en alícuotas de 120  $\mu\text{l}$  en microtubos de 1,5 ml y congelar en nitrógeno líquido. Conservar a -80 °C.
- 9) Con 10-20 pg de un plásmido previamente cuantificado, comprobar la eficiencia de transformación expresándola en transformantes/ $\mu\text{g}$  de ADN.

**Soluciones:** esterilizar las soluciones por filtración.

- **RF1.** 100 mM RbCl; 50 mM MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O; 30 mM acetato potásico; 10 mM CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O; 15% glicerol. Ajustar el pH a 5,8 con ácido acético 0,2 M.
- **RF2:** 10 mM MOPS; 10 mM RbCl, 75 mM CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O; 15% glicerol. Ajustar el pH a 6,8 con NaOH 1N.
- **Solución madre de magnesio:** 1M MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O; 1M MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O.

- **Método SEM** (Inoue *et al.*, 1990). En este protocolo son importantes: la temperatura de crecimiento del cultivo (18 °C), trabajar durante todo el proceso de lavados e inducción de la competencia a 4 °C, mantener la relación de 1/10 entre el medio y la capacidad del matraz para que exista una buena aireación y agitar las células de forma suave, no utilizando el vórtex.

Protocolo:

- 1) Cultivar *E. coli* en medio LB sólido (LA) para obtener un cultivo fresco.
- 2) Cultivar durante la noche a 37 °C un preinóculo en medio SOC (5 ml) con 20-30 colonias de *E. coli*.
- 3) Inocular 50 ml de medio SOC con un 1% de preinóculo. Cultivar en agitación (250 rpm) a 18 °C.
- 4) Cuando el cultivo alcance una DO<sub>600</sub> de 0,6, colocar el matraz en hielo 10 minutos. A partir de este paso trabajar en frío.
- 5) Centrifugar a 3.000 rpm en tubos tipo GSA durante 10 minutos.
- 6) Retirar los restos de medio y resuspender en 80 ml de tampón TB frío (4 °C). No usar agitador. Dejar en hielo 10 minutos.
- 7) Centrifugar a 3.000 rpm durante 10 minutos.
- 8) Retirar los restos de medio y resuspender en 20 ml de tampón TB frío agitando manualmente. Añadir 1,4 ml de DMSO (concentración final 7%). Agitar suavemente y dejar en hielo 10 minutos.
- 9) Repartir en alícuotas de 100 µl de células en microtubos de 1,5 ml. Inmediatamente congelar en nitrógeno líquido. Conservar a -80 °C.
- 10) Con 10-20 pg de un plásmido previamente cuantificado, se comprueba la eficiencia de transformación expresándola en transformantes/µg de ADN.

**Soluciones:**

- **Tampón TB** (Para 1 litro). 10 mM PIPES (3,025 g), 15 mM CaCl<sub>2</sub> (1,65 g), 250 mM KCl (18,65 g). Ir añadiendo KOH 1 M para que se disuelvan los componentes y a la par ajustar el pH a 6,7. A continuación añadir 10,9 g de MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O. Esterilizar por filtración y conservar a 4 °C.

### 2.15.2. Procedimiento de transformación

El método de transformación empleado se fundamenta en someter las células competentes anteriormente obtenidas a un choque térmico (Hanahan, 1983) y es prácticamente universal para las diversas cepas de *E. coli*, pudiendo ser usado para transformar células competentes preparadas por cualquier método.

#### Protocolo:

- 1) Descongelar las células competentes manteniendo el tubo en hielo.
- 2) A 100 µl de células, añadir el ADN (hasta un volumen máximo de 10 µl) y mantener la mezcla en hielo durante 20 minutos.
- 3) Aplicar al conjunto un choque térmico a 42 °C durante 45 segundos.
- 4) Enfriar en hielo 2 minutos.
- 5) Añadir 600 µl de LB e incubar las células durante 1 hora en agitación (250 rpm) a 37 °C.
- 6) Sembrar alícuotas de las células en placas de Petri de medio LB sólido suplementado con los aditivos adecuados en cada caso.

### 2.16. Introducción de ADN en *Streptomyces*

La introducción de material genético en las diferentes cepas de *Streptomyces* se llevó a cabo en todos los casos mediante conjugación intergenérica. La conjugación se define como la transferencia de información genética desde una célula donadora a otra receptora, por un mecanismo que incluye un contacto directo célula a célula, un plásmido conjugativo en la célula donadora y la intervención de estructuras superficiales especializadas y de funciones específicas. Este proceso se puede dar entre células de un mismo género, o entre células de géneros diferentes (conjugación intergenérica).

El procedimiento de conjugación que se ha seguido es el descrito por Kieser *et al.* (Kieser *et al.*, 2000), empleándose como células receptoras esporas o micelio de *Streptomyces* y como célula donadora *E. coli* ET12567/pUZ8002. Esta cepa es deficiente en los sistemas de metilación *dam*, *dcm* y *hsd*, y porta el plásmido pUZ8002, no movilizable pero que contiene los genes necesarios para la movilización de vectores que contengan en su secuencia un *oriT*.

### Protocolo:

- 1) Inocular de 1 a 3 colonias de *E. coli* ET12567/pUZ8002 transformada con el plásmido que se desea transferir en 50 ml de medio LB suplementado con el antibiótico de selección del plásmido conjugativo, con cloranfenicol (25 µg/ml) y kanamicina (25 µg/ml) para mantener el pUZ8002 y la mutación *dam*, respectivamente. Incubar durante 12-16 horas a 37 °C y 250 rpm.
- 2) A partir del cultivo anterior, inocular al 0,1-0,2% 50 ml de medio LB suplementado con el antibiótico de selección, cloranfenicol (25 µg/ml) y kanamicina (25 µg/ml). Incubar a 37 °C y 250 rpm hasta que el cultivo alcance una DO<sub>600</sub> entre 0,4 y 0,6.
- 3) Centrifugar 10 minutos a 4.500 rpm y 4 °C. Descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 50 ml de medio LB sin antibióticos.
- 4) Resuspender las células en 5 ml de LB.
- 5) Resuspender el micelio (1/10 de la placa) de *S. clavuligerus*, cultivado durante 24 horas en TSA a 28 °C, en 0.5 ml de glicerol al 20%. Si se utilizan esporas, mezclar 10<sup>8</sup> esporas con 0,5 ml de medio 2xTY y someterlas a un choque térmico de 50 °C durante 10 minutos.
- 6) Mezclar 0,5 ml de la suspensión de células de *E. coli* con 0,5 ml de la suspensión de micelio o esporas de *Streptomyces*. Centrifugar 2 minutos a 14.000 rpm, eliminar 350 µl de sobrenadante y resuspender el precipitado en el volumen restante.
- 7) Sembrar en placas de MS suplementadas con MgCl<sub>2</sub> 10mM. Incubar a 30 °C.
- 8) Transcurridas 16-20 horas, añadir una cobertera con 0,5 mg/ml de ácido nalidíxico y 1 mg/ml del antibiótico de selección. Incubar a 30 °C durante 2-3 días hasta observar colonias exconjugantes.

## **2.17. Construcción y amplificación de una genoteca de *S. clavuligerus* ATCC 27064 en el vector SuperCos 1**

Una genoteca o librería genómica es una colección de clones, cada uno de los cuales contiene un vector al que se le ha insertado un fragmento del ADN total de un microorganismo. El total de la genoteca debe contener, teóricamente, todas las secuencias existentes en el ADN total de partida. Los fragmentos de ADN se generan por digestiones parciales con una enzima de restricción que presenta una alta frecuencia de corte en el genoma, generándose así una colección de fragmentos de una longitud idónea para la clonación en un vector determinado, en este caso un comido. Los cósmidos son plásmidos con

los extremos cohesivos *cos* del bacteriófago  $\lambda$ . Estos plásmidos incorporan fragmentos de ADN comprendidos entre 30-42 kb, tamaño adecuado para el empaquetamiento en partículas fágicas y su posterior transferencia a las células hospedadoras mediante infección.

### **2.17.1. Preparación del vector SuperCos 1**

#### Protocolo:

- 1) Digerir 200  $\mu\text{g}$  del vector de clonación SuperCos 1 con 2 U/g de XbaI en un volumen total de 400  $\mu\text{l}$  a 37  $^{\circ}\text{C}$  durante 3 horas.
- 2) Comprobar la digestión en un gel de agarosa al 0,8%. Se debe obtener una única banda de 7,9 kb.
- 3) Limpiar el ADN con un paso de fenol-CIA y CIA. Precipitar el ADN durante un mínimo de 2 horas a -20  $^{\circ}\text{C}$  o media hora a -80  $^{\circ}\text{C}$ . Centrifugar a 13.200 rpm y 4  $^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. Retirar el etanol y dejar secar el precipitado. Resuspender en 150  $\mu\text{l}$  de agua destilada y cuantificar la concentración de ADN (ver apartado 2.8.5).
- 4) Desfosforilar con 0,5  $\mu\text{l}$  de fosfatasa antártica (5 U/ml) por cada  $\mu\text{g}$  de ADN del vector. Incubar durante 30 minutos a 37  $^{\circ}\text{C}$  y posteriormente inactivar la enzima incubando la mezcla durante 10 minutos a 65  $^{\circ}\text{C}$ . Repetir la reacción de desfosforilación.
- 5) Extraer el ADN por fenolización con un paso de fenol-CIA y CIA. Precipitar el ADN durante un mínimo de 2 horas a -20  $^{\circ}\text{C}$  o media hora a -80  $^{\circ}\text{C}$ . Centrifugar a 13.200 rpm y 4  $^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. Retirar el etanol y dejar secar el precipitado. Resuspender en 70  $\mu\text{l}$  agua destilada.
- 6) Digerir el vector tratado con 2 U de BamHI por  $\mu\text{g}$  de ADN (BamHI genera extremos cohesivos con Sau3AI) en un volumen final de 100  $\mu\text{l}$  a 37  $^{\circ}\text{C}$  durante 3 horas. Extraer el ADN por fenolización como en los pasos anteriores. Resuspender en un volumen final de 20  $\mu\text{l}$  y cuantificar la concentración de dicha solución. Finalmente, dejar la solución a una concentración de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .
- 7) Comprobar la digestión en un gel de agarosa al 0,8%. Se deben obtener dos bandas de 1,1 y 6,5 kb, respectivamente.

### 2.17.2. Preparación del ADN genómico

Las digestiones parciales del ADN genómico se llevan a cabo con una enzima de restricción de corte frecuente, evitando así la exclusión sistemática de algunas de las secuencias del genoma. En este trabajo se utilizó Sau3AI que reconoce la secuencia GATC y genera extremos 5' protuberantes. En primer lugar se realizó una digestión a pequeña escala para determinar la concentración de enzima adecuada para obtener los fragmentos de ADN de tamaño comprendido entre 30-42 kb. Una vez determinada la concentración de enzima óptima se llevó a cabo una digestión a gran escala con el objetivo de obtener suficiente ADN digerido para la construcción de la genoteca.

#### ➤ Digestión a pequeña escala

##### Protocolo:

- 1) Extraer ADN genómico de *S. clavuligerus* ATCC 27064. con el método especificado en el apartado 2.8.4, (realizar todos los pasos de mezcla de manera suave, evitar los pipeteos agresivos y agitación para obtener fragmentos de alto peso molecular intactos).
- 2) Digerir con la enzima Sau3AI pequeñas cantidades de ADN, aproximadamente 10 µg, con diferentes concentraciones de enzima a 37 °C durante 30 minutos. Para ello mezclar 5 µl de cada dilución de enzima (D1-D8, especificadas en la tabla 2.4) con 45 µl de la mezcla de ADN (MA) y dejar 5 minutos en hielo para permitir la difusión de la enzima. Incubar durante 10 minutos a 37 °C en baño de agua y parar cada reacción de digestión añadiendo 2 µl de EDTA.
- 3) Comprobar la digestión parcial en un gel de agarosa al 0,4%, dejar migrar durante 16-18 horas. Seleccionar las concentraciones de enzima con las que se obtengan fragmentos de ADN de un tamaño comprendido entre 30-42 kb.

##### **Soluciones:**

- **Mezcla de ADN (MA).** 10 µg aproximadamente de ADN total, 45 µl tampón de digestión 10X, 5 µl BSA (10 mg/ml), agua destilada hasta 450 µl.
- **Tampón de dilución (TD).** 150 µl tampón de dilución, 15 µl BSA (10 mg/ml), agua destilada hasta 1,5 ml.

Dilución	Solución de Sau3AI (4 U/μl)	Tampón de dilución (TD)	[Sau3AI]F (U/μg de ADN)
D1	2 μl	38 μl	1,00
D2	10 μl D1	10 μl	0,50
D3	10 μl D2	90 μl	0,05
D4	20 μl D3	20 μl	$2,50 \cdot 10^{-2}$
D5	20 μl D4	20 μl	$1,25 \cdot 10^{-2}$
D6	20 μl D5	20 μl	$6,25 \cdot 10^{-3}$
D7	20 μl D6	20 μl	$3,12 \cdot 10^{-3}$
D8	20 μl D7	20 μl	$1,56 \cdot 10^{-3}$

**Tabla 2.4:** Mezclas de dilución de la enzima Sau3AI para la digestión parcial.

### ➤ Digestión a gran escala

#### Protocolo:

- 1) Digerir una mayor cantidad de ADN (100 μg aproximadamente) con la concentración de enzima óptima, la mitad y una concentración intermedia, ya que al cambiar de escala las condiciones de digestión pueden cambiar. Si se tiene suficiente cantidad de ADN realizar varias digestiones por cada concentración, ya que en el próximo paso de ultracentrifugación se reduce la cantidad de ADN. Comprobar la digestión en un gel de agarosa para visualizar el ADN digerido.
- 2) Extraer el ADN por fenolización con fenol-CIA y CIA (ver apartado 2.8.1). Precipitar el ADN con etanol (-20 °C) durante 2 horas, centrifugar a 4 °C 45 minutos y eliminar el sobrenadante. Dejar secar unos minutos y resuspender en agua destilada durante toda la noche para asegurar una solución homogénea (no agitar con agitación mecánica ni con pipeta). Mezclar todas las digestiones de la misma concentración en un volumen final de 150 μl.
- 3) Analizar mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,4% una pequeña alícuota de cada digestión con el objetivo de seleccionar las dos digestiones que presenten una mayor cantidad de fragmentos comprendidos entre 30-42 kb.

### ➤ Ultracentrifugación en gradiente de sacarosa

Una vez digerido el ADN, se enriquece la solución en fragmentos de tamaño adecuado mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa.

Protocolo:

- 1) Colocar en dos tubos de 5 ml Beckman de ultracentrífuga 2,4 ml de la solución de sacarosa al 40% y sobre esta añadir lentamente, con la punta de la pipeta apoyada en la pared del tubo, 2,4 ml de la solución de sacarosa al 10%.
- 2) Tapar los tubos con parafilm y colocar en posición horizontal con un movimiento rápido y seco para evitar la mezcla de las soluciones. Dejar 8 horas en oscuridad para que se cree el gradiente por difusión.
- 3) Volver a colocar los tubos en posición horizontal muy lentamente para no alterar el gradiente de sacarosa.
- 4) Verter, apoyando la punta de la pipeta en la pared del tubo, 150  $\mu$ l de ADN total digerido con Sau3AI. Pesar los tubos en balanza de precisión. Igualar el peso de los dos tubos añadiendo solución de sacarosa al 10%.
- 5) Colocar cada tubo en un soporte de la ultracentrífuga y colgarlos enfrentados en el rotor basculante. Ultracentrifugación a 4 °C durante 18 horas a 30.000 rpm.
- 6) Separar el gradiente de fragmentos de ADN en fracciones mediante una bomba peristáltica (Miniplus 2, Gilson). Previamente a su uso estimar la velocidad de la bomba y el número de gotas necesarias para recoger fracciones de 250  $\mu$ l. Introducir lentamente un extremo del capilar conectado a la bomba hasta el fondo de cada tubo y por el otro extremo recoger fracciones de 250  $\mu$ l en microtubos de 1,5 ml.
- 7) Analizar mediante electroforesis (30 voltios durante 12-16 horas) en agarosa al 0,4% 10  $\mu$ l de cada fracción con el objetivo de seleccionar las fracciones que presenten fragmentos de ADN entre 30-42 kb.
- 8) Precipitar el ADN de las fracciones seleccionadas teniendo en cuenta las mezclas especificadas en la tabla 2.5. Dejar durante 16-18 horas a -20 °C y a continuación, centrifugar a 4 °C a 13.200 rpm durante 45 minutos.
- 9) Eliminar el sobrenadante, añadir 500  $\mu$ l de etanol 70%, mezclar y volver a centrifugar a 4 °C a 13.200 rpm durante 30 minutos. Eliminar el sobrenadante y dejar secar unos minutos.
- 10) Resuspender lentamente todas las fracciones seleccionadas en un volumen final de 15  $\mu$ l de agua destilada. Conservar la solución de ADN total (ADNt) a 4 °C para evitar la rotura por ciclos de congelación/descongelación.
- 11) Medir la concentración de la solución de ADNt/Sau3A. Se necesitan al menos 2,5  $\mu$ g para el siguiente paso de ligación.

**Nota:** Durante todo el procedimiento usar puntas de pipeta cortadas para evitar el cizallamiento del ADN.

**Soluciones:**

- **Solución de sacarosa 10%.** 500 µl Tris HCl 1M, pH 8,0; 100 µl EDTA 0,5 M; 10 ml NaCl 5 M; 10 ml sacarosa 50%; agua destilada hasta 50 ml.
- **Solución de sacarosa 40%.** 500 µl Tris HCl 1M, pH 8,0; 100 µl EDTA 0,5 M; 10 ml NaCl 5 M; 40 ml sacarosa 50%.

Fracción	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
% Sacarosa	40	38,4	36,8	35,2	33,6	32,1	30,5	28,9	27,3	25,7
Fracción µl	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
TE µl	750	710,5	671	631,5	592	552,5	513	473,5	434	394,5
Total µl	1000	960,5	921	881,5	842	802,5	763	723,5	684	644,5
AcNa 3M µl	100	96,05	92,1	88,15	84,2	80,25	76,3	72,35	68,4	64,45
EtOH µl	2200	2113,1	2026,2	1939,3	1852,4	1765,5	1678,6	1591,7	1504,8	1417,9

Fracción	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
% Sacarosa	24,2	22,6	21	19,4	17,8	16,3	14,7	13,1	11,57	10
Fracción µl	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
TE µl	355	315,5	276	236,5	197	157,5	118	78,5	39	0
Total µl	605	565,5	526	486,5	447	407,5	368	328,5	289	250
AcNa 3M µl	60,5	56,55	52,6	48,65	44,7	40,75	36,8	32,85	28,9	25
EtOH µl	1331	1244,1	1157,2	1070,3	983,4	896,5	809,6	722,7	635,8	550

**Tabla 2.5. Precipitación del ADN de las fracciones obtenidas por ultracentrifugación.** Volúmenes de TE, AcNa (3M) y EtOH necesarios para precipitar el ADN correspondiente a cada fracción obtenida por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa.

### 2.17.3. Ligación y empaquetamiento

Protocolo de la ligación:

- 1) Ligar los fragmentos de ADNt/Sau3AI de *S. clavuligerus* ATCC 27064. con el cósmido tratado a 4 °C durante toda la noche. Mezcla de ligación:

ADN (Sau3AI)	2,5 g
SuperCos 1 (BamHI/XbaI)	1 µl
Tampón de ligación	2 µl
Agua destilada	hasta 20 µl
(*) Ligasa	1 µl

(\*) (Antes de añadir la ligasa guardar 1 µl de la mezcla como control de ligación).

- 2) Analizar en un gel al 0,8% 1 µl de la mezcla de ligación antes de añadir la ligasa y 1 µl después de la ligación para comprobar que la ligación se ha producido eficientemente.

Protocolo de empaquetamiento. Empaquetar el cósmido recombinante utilizando el extracto de empaquetamiento comercial Gigapack® III XL.

- 1) Colocar un tubo con los extracto de empaquetamiento (-80 °C) en hielo.
- 2) Descongelar rápidamente los extractos de empaquetamiento calentando el tubo con las manos, justo hasta que empiece a descongelarse.
- 3) Mezclar 4 µl del producto de ligación con los extractos de empaquetamiento. Agitar la mezcla suavemente con la punta de una pipeta evitando la formación de burbujas. Centrifugar brevemente.
- 4) Incubar la mezcla a temperatura ambiente durante 2 horas.
- 5) Añadir 500 µl del tampón SM.
- 6) Añadir 20 µl de cloroformo y mezclar suavemente. Centrifugar brevemente para sedimentar los restos.
- 7) Recoger el sobrenadante que contiene los fagos a otro tubo. Guardar el producto de empaquetamiento a 4 °C (puede ser almacenado hasta un mes).

#### **Soluciones:**

- **Tampón SM.** 0,58 g de NaCl; 0,2 g de MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O; 5 ml Tris HCl 1M, pH 7,5; 0,5 ml gelatina 2%; disolver en un volumen de 100 ml con agua destilada. Esterilizar en autoclave.

#### **2.17.4. Titulación de la reacción de empaquetamiento**

##### Protocolo:

- 1) Sembrar *E. coli* XL1-Blue en medio LA. Incubar toda la noche a 37 °C.

- 2) Inocular con una colonia 50 ml de LB suplementado con 10 mM MgSO<sub>4</sub> y 0,2% de maltosa. Incubar a 37 °C con agitación orbital 250 rpm durante 4-6 horas, sin dejar que el cultivo sobrepase la DO<sub>600</sub> 1.
- 3) Centrifugar a 2.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C y eliminar el sobrenadante.
- 4) Resuspender el precipitado de células en la mitad del volumen inicial con 10 mM de MgSO<sub>4</sub> estéril.
- 5) Diluir la solución en 10 mM de MgSO<sub>4</sub> estéril hasta una DO<sub>600</sub> 0,5.
- 6) Preparar diluciones 1:10 y 1:50 de la reacción de empaquetamiento en tampón SM.
- 7) Mezclar 25 µl de cada dilución con 25 µl de la solución de células de *E. coli* en un tubo de 1,5 ml e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- 8) Añadir 200 µl de medio LB a cada muestra e incubar 1 hora a 37 °C en agitación. Este tiempo de incubación permite la expresión de los genes de resistencia a antibióticos.
- 9) Centrifugar a 13.200 rpm durante 1 minuto y eliminar el sobrenadante. Resuspender el precipitado de células en 250 µl de medio LB. Sembrar 50 y 100 µl en placas de LA con ampicilina (100 g/ml). Incubar a 37 °C hasta que crezcan las colonias.
- 10) Contar el número de colonias y expresar el título del empaquetamiento en unidades formadoras de colonias (UFC)/µl de producto de empaquetamiento. De esta manera se puede calcular el número de colonias que se esperan obtener del total (500 µl) de la reacción de empaquetamiento.

La fórmula diseñada por Clarke y Carbon (Clarke y Carbon, 1976) permite el cálculo del número de colonias necesarias para que la genoteca sea representativa (ver resultados 3.2.2). Dicha fórmula relaciona la probabilidad (P) de incluir cualquier secuencia de ADN en una genoteca al azar de N recombinantes independientes:

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-F)}$$

Una vez comprobado que la reacción de empaquetamiento permite obtener una colección de clones representativa de todo el genoma con una probabilidad del 99,99% se lleva a cabo la amplificación de la genoteca.

### 2.17.5. Amplificación de la genoteca

#### Protocolo:

- 1) En microtubos de 1,5 ml mezclar 75  $\mu$ l de la reacción de empaquetamiento con el mismo volumen de solución de *E. coli* XL1-Blue (DO<sub>600</sub> 0,5). Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- 2) Añadir 4 volúmenes de medio LB en cada tubo e incubar a 37 °C a 250 rpm en agitación orbital durante 1 hora.
- 3) Sembrar alícuotas de 100  $\mu$ l en placas de LB con ampicilina (100  $\mu$ g/ml) e incubar a 37 °C durante toda la noche.
- 4) Añadir 2 ml de LB sobre cada placa y raspar la superficie con un bastoncillo para desprender las colonias. Recoger la solución de colonias y añadir el mismo volumen de glicerol al 40%. Conservar a -80 °C.
- 5) Hacer diluciones entre  $1 \times 10^{-5}$  y  $1 \times 10^{-9}$  y sembrar en placas de LB con ampicilina (100  $\mu$ g/ml). Contar las colonias y expresar el título de la genoteca en UFC/ml.

### 2.18. Obtención de mutantes mediante ReDirect<sup>®</sup>

La tecnología ReDirect<sup>®</sup> permite la obtención de mutantes mediante el reemplazamiento del gen de interés por un casete de resistencia a un antibiótico obtenido por PCR. Esta técnica consta de tres pasos fundamentales además de un cuarto opcional (Gust *et al.*, 2004).

En un primer paso, el gen de interés se ha de encontrar clonado en un vector replicativo de *E. coli*, generalmente en un cósmido. Dicha construcción es transformada en la cepa de *E. coli* BW25113 que contiene el plásmido pIJ790 con genes del sistema de recombinación del bacteriófago  $\lambda$  (los genes *red*). Estas proteínas aumentan considerablemente la eficiencia de recombinación homóloga en *E. coli* y permiten que se produzca el reemplazamiento del gen de interés contenido en el cósmido por un producto de PCR. Dicho producto de PCR contiene secuencias homólogas (36-50 pb) a las secuencias que flanquean el gen que se va a reemplazar, así como un gen de resistencia a antibióticos y el origen de transferencia *oriT*.

Una vez obtenido el cósmido recombinante, dicha construcción se transforma en una cepa de *E. coli* ET12567. Dicha cepa es deficiente en metilación para que la construcción no se vea posteriormente afectada por el potente sistema específico de restricción por metilación presente en muchas especies del género *Streptomyces*. Además, esta cepa de *E. coli* posee el plásmido pUZ8002 capaz de movilizar en *trans* vectores que contengan el origen de transferencia *oriT*.

Por último, se lleva a cabo la transferencia del cósmido recombinante desde *E. coli* hasta *Streptomyces* mediante el proceso de conjugación. Una vez que la célula de *Streptomyces* ha incorporado el cósmido se debe producir una doble recombinación para conseguir la sustitución del gen de interés en el genoma de *Streptomyces* por el casete de resistencia.

Además, esta técnica permite eliminar el casete de resistencia del mutante delecionado mediante el uso de recombinasas. La secuencia del casete de resistencia se encuentra flanqueada por sitios de reconocimiento de diferentes recombinasas que catalizan recombinación entre dichos puntos eliminando el casete de resistencia. Existen dos tipos de sistemas de recombinasas: la recombinasa que reconoce los sitios *frt* presentes en el plásmido pIJ773 y la recombinasa Cre que reconoce los sitios *loxP* presentes en el plásmido pIJ774.

El protocolo seguido es el descrito en el manual del ReDirect<sup>®</sup> con algunas modificaciones (Gust *et al.*, 2002). Esta técnica ha sido desarrollada en el centro John Innes (The John Innes Centre, Norwich, UK) para *S. coelicolor* por lo que precisa de las pertinentes modificaciones y optimizaciones para su aplicación con éxito a otras especies del género *Streptomyces*.

### **2.18.1. Purificación del molde para la obtención del producto de PCR**

El centro John Innes ha desarrollado diferentes plásmidos (<http://Streptomyces.org.uk/redirect/index.html>) que contienen el casete de resistencia. En este trabajo se han utilizado varios de ellos (ver apartado 2.5).

Se ha observado que el uso de los plásmidos completos como molde para la obtención del producto de PCR (casete de resistencia) resulta en un gran número de falsos positivos por

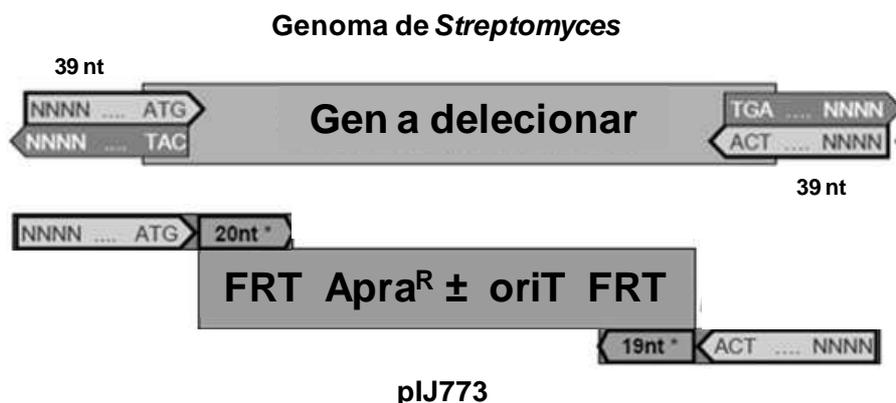
lo que es importante extraer del plásmido la secuencia molde por digestión con enzimas de restricción.

Protocolo:

- 1) Digerir aproximadamente 10 µg del plásmido molde con las enzimas de restricción EcoRI y HindIII en 1x del tampón adecuado en un volumen final de 100 µl e incubar a 37 °C durante al menos 1 hora.
- 2) Analizar la mezcla de digestión en un gel de agarosa al 0,8% y cortar el fragmento de gel que contiene la banda correspondiente al casete de resistencia. Purificar mediante el uso del kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification*, resuspender en agua destilada y determinar su concentración.
- 3) La ausencia de contaminación con plásmidos completos se comprueba utilizando 1 µl de la suspensión purificada para la transformación de células de *E. coli* competentes. Si no se obtiene ningún transformante se puede seguir con el protocolo.

**2.18.2. Diseño de los cebadores para la obtención del producto de PCR**

La delección de un determinado gen requiere del diseño de cebadores específicos. Cada cebador contiene los 39 nucleótidos (nt) en 5´ similares a la secuencia que flanquea el gen de interés en *Streptomyces* y el resto de nucleótidos en su extremo 3´ anillan con las secuencias flanqueantes del casete de resistencia (Figura 2.2).



**Figura 2.2. Diseño de los cebadores para la obtención del casete de resistencia.** El extremo 5´ de los cebadores contiene una secuencia homóloga a la secuencia flanqueante del gen a deleccionar, incluido el codón de inicio y de fin. Mientras que el extremo 3´ está constituido por las secuencias marcadas con asterisco (\*), flanqueantes del casete de resistencia. Modificado de <http://Streptomyces.org.uk/redirect/index.html>.

### 2.18.3. Amplificación por PCR del casete de resistencia

Es recomendable realizar la PCR con una ADN polimerasa de alta fidelidad para evitar la generación de errores en la amplificación del casete de resistencia, los cuales pueden interferir en posteriores pasos del protocolo. En este trabajo se ha usado la polimerasa GoTaq®, para la cual se detalla la mezcla de PCR y el programa seguido:

Mezcla de PCR:

DMSO	2,5 µl
Buffer HF 5X	10 µl
dNTPs (2 mM)	5 µl
Cebadores (10 µM)	2,5 µl/cebador
ADN molde	50 ng
GoTaq	0,5 µl
Agua destilada	hasta 50 µl

Programa de PCR:

Desnaturalización inicial	98 °C	30 s		
Desnaturalización	98 °C	8 s	}	10 ciclos
Anillamiento	50 °C	20 s		
Extensión	72 °C	45 s		
Desnaturalización	98 °C	8 s	}	15 ciclos
Anillamiento	55 °C	20 s		
Extensión	72 °C	45 s		
Extensión final	72 °C	10 min		

Analizar 5 µl de la mezcla de PCR mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%. Si la amplificación ha sido correcta limpiar los 45 µl restantes con el kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* y determinar su concentración.

#### **2.18.4. Transformación de *E. coli* BW25113/pIJ790 con el cósmido de *Streptomyces* que contiene el gen a sustituir**

El plásmido pIJ790 contiene un gen de resistencia a cloranfenicol y un origen de replicación sensible a la temperatura que precisa de 30 °C para su replicación pero se pierde a 37 °C.

##### Protocolo:

- 1) Preparar células competentes BW25113/pIJ790 mediante el método SEM (ver apartado 2.15.1).
- 2) Transformar las células competentes con el cósmido que contiene los genes de interés de *Streptomyces*. Importante: Realizar los pasos de crecimiento a 30 °C.
- 3) Comprobar mediante digestiones la introducción del cósmido en *E. coli* sin reorganizaciones y la presencia del plásmido pIJ790.

#### **2.18.5. Sustitución del gen de interés por el casete de resistencia**

Las colonias de *E. coli* BW25113/pIJ790 portadoras del cósmido de interés son electrotransformadas con el casete de resistencia obtenido mediante PCR.

##### Protocolo:

- 1) Inocular las colonias de *E. coli* BW25113/pIJ790/cósmido en 5 ml de LB suplementado con cloranfenicol (25 µg/ml) para mantener el plásmido pIJ790 y con los antibióticos de selección del cósmido. Incubar a 30 °C (para no perder el plásmido pIJ790) durante 14-16 horas.
- 2) Inocular 100 ml de SOB suplementado con 2 ml de MgSO<sub>4</sub> 1 M + MgCl<sub>2</sub> 1 M (concentración final 40 mM), cloranfenicol (25 µg/ml), los antibióticos de selección del cósmido y 1 ml de L-arabinosa 1 M (concentración final 10 mM, necesaria para inducir los genes *red*) con 1% del preinóculo. Incubar a 30 °C y 200 rpm hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> próxima a 0,4 (3-4 horas).
- 3) Centrifugar en tubos de GSA a 4 °C durante 5 minutos a 4000 rpm. Resuspender el precipitado en 20 ml de glicerol 10% frío (4 °C).
- 4) Centrifugar como en el paso anterior y resuspender el precipitado en 10 ml de glicerol 10% frío. Volver a centrifugar y finalmente resuspender en 400 µl de glicerol 10% frío.

- 5) Mezclar 50  $\mu$ l de la suspensión de células con 100-200 ng del producto de PCR. Poner la mezcla en una cubeta de electroporación de 0,2 cm fría (4 °C).
- 6) Aplicar un pulso eléctrico con el electroporador (BioRad GenePulser II) en las siguientes condiciones: 2,5 kV, 500  $\Omega$  y 10  $\mu$ F, debiendo transcurrir un tiempo de paso de corriente de entre 4,5 y 4,9 milisegundos.
- 7) Añadir 1 ml de medio LB frío (4 °C) a la cubeta y transferir todo el contenido a un microtubo de 1,5 ml. Incubar durante al menos 3 horas a 30 °C.
- 8) Sembrar en placas de medio LB suplementado con los antibióticos de selección del cósmido y apramicina (50  $\mu$ g/ml). Incubar durante toda la noche a 37 °C por lo que se perderá el plásmido pIJ790. Si se van a realizar otras deleciones en el mismo cósmido, con diferentes resistencias a antibióticos, incubar a 30 °C y añadir cloranfenicol (25  $\mu$ g/ml) a las placas para evitar la pérdida del plásmido pIJ790.
- 9) Analizar las construcciones obtenidas mediante PCR o patrón de digestión.
- 10) Una vez comprobado que la recombinación se ha producido eficientemente, extraer los cósmidos recombinantes mediante minilisis (ver 2.8.3). Realizar la extracción tan pronto como sea posible porque se pueden producir reorganizaciones debido a que las células BW25113 son altamente recombinogénicas.

**Nota:** En la misma colonia pueden co-existir cósmidos recombinantes y cósmidos silvestres. Estos últimos se perderán durante la transformación a la siguiente cepa de *E. coli* y además no contienen *oriT* por lo que no podrán ser transferidos a *Streptomyces*.

#### **2.18.6. Transferencia del cósmido recombinante a *Streptomyces***

La transferencia se produce mediante conjugación intergenérica entre *E. coli* y *Streptomyces*.

##### Protocolo:

- 1) Preparar células competentes *E. coli* ET12567/pUZ8002 mediante el método del cloruro de rubidio (ver apartado 2.15.1). Cultivar en medio suplementado con kanamicina (25  $\mu$ g/ml) y con cloranfenicol (25  $\mu$ g/ml), para mantener el plásmido pUZ8002 y la mutación *dam* (metilación deficiente), respectivamente.

- 2) Transformar las células competentes *E. coli* ET12567/pUZ8002 con el cósmido recombinante.
- 3) Incubar durante la noche a 37 °C un preinoculo en 5 ml de medio LB suplementado con cloranfenicol (25 µg/ml), kanamicina (25 µg/ml) y apramicina (50 µg/ml).
- 4) Llevar a cabo el proceso de conjugación para transferir el cósmido recombinante a *Streptomyces* (ver apartado 2.16).
- 5) Una vez añadida la cobertera con los antibióticos adecuados incubar a 28 °C durante 5-6 días.
- 6) Comprobar si se ha producido la doble recombinación mediante la siembra en placas de TSA suplementado con ácido nalidixico (25 µg/ml) y los antibióticos de selección.

## 2.19. Métodos relacionados con la extracción de ARN

En general, y dada la facilidad con la que el ARN es objeto de procesos degradativos, se siguieron las precauciones clásicas en cuanto al manejo de muestras de ARN durante la manipulación de las mismas. Las micropipetas empleadas se sometieron a tratamiento con el sistema inhibidor de RNasas *RNaseZap* (Ambion inc.), del mismo modo que todo el material no esterilizable en autoclave. EL agua Mili-Q y todo el material de plástico desechable (como tubos microtubo y puntas para las micropipetas) fueron esterilizados dos veces consecutivas en autoclave.

### 2.19.1. Aislamiento de ARN total de *Streptomyces clavuligerus*

La extracción de RNA de *S. clavuligerus* se llevó a cabo a partir de cultivos líquidos mediante las columnas *RNeasy<sup>®</sup> mini* (Qiagen). Debido a que gran parte de este trabajo consistió en el análisis de la expresión de diferentes genes, fue muy importante la estabilización del patrón de transcripción de las células en el momento de la toma de muestras, ya que éste puede verse alterado durante los procesos de centrifugación y de congelación necesarios para recoger el micelio. Por esta razón, las muestras de partida se trataron en el momento de su recogida con *RNAprotect™ Bacteria Reagent* (Qiagen), solución que actúa inhibiendo tanto la degradación del ARN como la síntesis de nuevos transcritos, lo que permite la estabilización inmediata del patrón de expresión de RNA de las muestras.

Para evitar la presencia de ADN contaminante, durante el proceso de extracción de RNA se llevaron a cabo digestiones con dos tipos de ADNasas:

- ***DNase I (RNase-Free DNase Set, Qiagen)***. El tratamiento con esta enzima realizó en columna durante la extracción de RNA.
- ***TURBO DNase (TURBO DNA-free™, Ambion)***. Una vez terminada la extracción, el ARN en solución se trató con esta enzima para eliminar las trazas remanentes de ADN. Junto a la ADNasa, el fabricante proporciona el tampón requerido y una resina que permite inactivar y eliminar rápidamente la enzima.

El protocolo de extracción de ARN se optimizó progresivamente a lo largo de este trabajo para conseguir aislar la mayor cantidad de ARN, de alta integridad y libre de contaminaciones de ADN. Para ello se ha modificado el protocolo proporcionado por el fabricante de las columnas, siguiendo algunas de las recomendaciones indicadas para la extracción de ARN de *Streptomyces* por V. Mersinias (protocolo disponible en <http://www.surrey.ac.uk/SBMS/Fgenomics/Microarrays>)

Los cultivos líquidos para obtener las muestras de ARN se llevaron a cabo en 100 ml de medio TSB o SA, iniciados a partir de preinóculos como se indica en el apartado 2.7.1.

#### Protocolo:

- 1) Recoger 0,6 ml de cultivo en un tubo de 2,2 ml y añadir 1,2 ml (2 volúmenes) de *RNA Protect*. Mezclar con vórtex y dejar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Centrifugar a 8.000 rpm durante 5 minutos, decantar el sobrenadante y secar el tubo sobre papel. Guardar el micelio a -80 °C si no se va a usar en el momento.
- 2) Resuspender el micelio en 200 µl de lisozima 30 mg/ml e incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos agitando en vórtex cada 2 minutos. (Si se parte de una pequeña cantidad de micelio, se puede utilizar el micelio procedente de 2-3 tubos recogidos de un mismo cultivo, resuspendiendo cada uno de ellos en 100 µl de lisozima para después reunirlos en un único tubo).
- 3) Añadir 600 µl de tampón RLT-β-Mercaptoenanol y mezclar en el vórtex. La ruptura de la células se llevó a cabo en un aparato *FastPrep™FP120* (BIO 101), utilizando la matriz de ruptura B (dos ciclos de ruptura de 30 segundos de duración a velocidad 6,5 y separados por un minuto de refrigeración en hielo). La matriz de ruptura B

viene contenida en unos tubos especialmente concebidos para el aparato y para la purificación de ARN (por lo que se encuentran libres de ARNasas de manera comercial). Es muy recomendable sellar los tubos con una fina capa de parafilm tras cerrarlos, con el fin de evitar fugas de la matriz de lisis a causa de la violenta agitación a la que se someten las muestras en el *FastPrep™*.

- 4) Transferir el lisado a un tubo PLG (*Phase Lock Gel*, Eppendorf) de 2 ml, previamente centrifugado vacío a 13.000 rpm durante 30 segundos para compactar la resina. Añadir 0,5 volúmenes de *AquaPhenol™* (Q-Biogen) y 0,5 volúmenes de CIA. Agitar por inmersión y centrifugar 5 minutos a 13.000 rpm. Trasferir la fase acuosa que queda por encima de la resina a un tubo nuevo de 2 ml.
- 5) Añadir 150 µl de tampón RTL-β-Mercaptoenanol y 450 µl de etanol 100% y mezclar por inversión.
- 6) Colocar una columna de purificación (*RNeasy Mini Spin Columns*, Qiagen) sobre un tubo colector y añadir un máximo de 700 µl de muestra. Centrifugar 15 segundos a 10.000 rpm y descartar la elución. Repetir tantas veces como sea necesario hasta procesar todo el volumen de muestra.
- 7) Añadir 350 µl de tampón RW1 a la columna y centrifugar durante 15 segundos a 10.000 rpm. Descartar la elución.
- 8) Mezclar 10 µl de *DNasa I Qiagen* en 70 µl de tampón RDD. Añadir los 80 µl de la mezcla directamente sobre la membrana de la columna e incubar a 30 °C durante 30 minutos. Trascorrido este tiempo, dar un pulso de centrifugación para decantar la enzima y repetir la digestión.
- 9) Añadir 350 µl de tampón RW1 y centrifugar durante 15 segundos a 10.000 rpm. Descartar la elución y el tubo colector.
- 10) Colocar la columna en un nuevo tubo colector y añadir 500 µl de tampón RPE. Centrifugar durante 15 segundos a 10.000 rpm. Descartar la elución y volver a añadir a la columna 500 µl de tampón RPE. Centrifugar durante 2 minutos a 10.000 rpm. Descartar la elución y el tubo colector y depositar la columna sobre un tubo de 1,5 ml.
- 11) Añadir directamente a la membrana de la columna de 30 a 50 µl de agua libre de ARNasas. Centrifugar durante 1 minuto a 10.000 rpm.
- 12) Transferir la elución a un tubo de 500 µl. Añadir 0,1 volúmenes del tampón de la enzima *TURBO-Dnase* y de 1 a 2µl de *TURBO-Dnase*. Mezclar suavemente con la

pipeta e incubar durante 30 minutos a 37 °C. Trascurrido este tiempo volver a añadir 1 µl de la ADNasa e incubar durante 30 minutos a 37 °C.

- 13) Añadir 0,2 volúmenes de *DNase Inactivation Reagent* y mezclar bien con la pipeta. Este reactivo es una resina que inactiva y elimina la ADNasa, junto con los cationes divalentes que inducen la rotura de ARN mediada por altas temperaturas. Incubar 2-3 minutos a temperatura ambiente y durante este tiempo mezclar 2 ó 3 veces con la pipeta.
- 14) Centrifugar durante 2 minutos a 13.000 rpm. El ARN permanece en el sobrenadante y el agente inactivador, junto con la ADNasa y los cationes divalentes, forman el precipitado. La concentración de ARN se cuantificó espectrofotométricamente usando un *NanoDrop ND-1000* (Thermo Scientific) y su integridad se comprobó en un *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies), aplicando 1-2 µl de muestra de ARN. Conservar el ARN a -80 °C.

#### **Soluciones:**

- **Tampones RLT, RW1 y RPE.** Incluidos en *RNeasy® mini kit*.
- **Tampón RLT-β-Mercaptoenanol.** Añadir 10 µl de β-Mercaptoenanol por cada ml de tampón RLT.
- **Tampón RDD.** Suministrado junto a la ADNasa I en el *RNase-Free DNase Set*.
- **Inactivation reagent y TURBO-DNase 10x Buffer.** Suministrados junto a la *TURBO-DNasa* en el kit *TURBO DNA-free™*.

### **2.19.2. Valoración de la concentración y pureza del ARN**

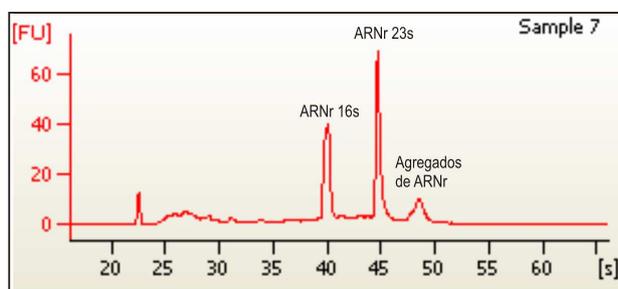
Al igual que en el caso del ADN (ver apartado 2.8.5), la concentración y pureza de las muestras de ARN fueron evaluadas con la ayuda de un espectrofotómetro *NanoDrop ND-1000* (Thermo Scientific), teniendo en cuenta en esta ocasión que la absortividad específica para el ARN tiene un valor de 40 µg/ml, y que en el caso de la pureza, esta se considera óptima cuando el valor del cociente A260/280 se encuentra entre 1,9 y 2,1 (Sambrook *et al.*, 2001).

### **2.19.3. Valoración de la integridad del ARN**

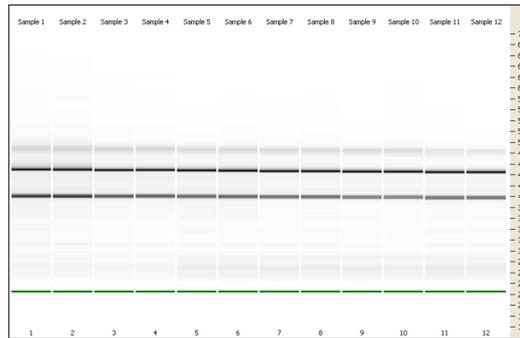
Se midió la integridad del ARN en un equipo *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies) utilizando los chips incluidos en *RNA 6000 Nano LabChip® kits* (Agilent). Este sistema permite

la separación del ARN según su peso molecular mediante una electroforesis que tiene lugar en microcanales, detectando los fragmentos a través de fluorescencia inducida por láser (Mueller *et al.*, 2000). El resultado se expresa en forma de un electroforetograma, donde cada pico se corresponde con un fragmento de ARN, siendo el área de cada pico proporcional a la cantidad de ARN de ese tamaño. El aparato es capaz de transformar este electroforetograma en una imagen similar a la que se obtendría en un gel, pudiendo observarse bandas que se corresponderían con cada pico del electroforetograma y, por tanto, con cada fragmento de ARN presente en la muestra.

El bioanalizador expresa la integridad del ARN a través del número RIN (*RNA Integrity Number*), calculado mediante la aplicación informática suministrada con el equipo a través de un algoritmo, que no sólo tiene en cuenta la relación entre las bandas ribosomales 23S y 16S, en el caso de las bacterias, sino que también considera otros parámetros, como la intensidad y cantidad de otros picos presentes en la muestra (Schroeder *et al.*, 2006). El RIN varía entre un valor de 10 (muestras sin ninguna degradación) y 1 (muestras totalmente degradadas). Para medir la integridad de las muestras en el bioanalizador se siguieron las indicaciones del fabricante, analizando entre 50-500 ng de ARN, previamente cuantificado mediante el *NanoDrop*.



**Figura 2.3.** Electroferograma de muestras de ARN de *S. clavuligerus* obtenido mediante el equipo *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies). Se observan dos picos correspondientes a ARNr 16s y 23s y un pico correspondiente a agregados de ARNr.



**Figura 2.4.** Gel de muestras de ARN de *S. clavuligerus* obtenido mediante el equipo *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies). Se observan dos bandas intensas correspondientes a ARNr 16s y 23s y el resto de bandas más tenues correspondientes a los agregados de ARNr.

## 2.20. Análisis de la transcripción mediante RT-PCR a tiempo final

Con el fin de comprobar la existencia de determinados transcritos policistrónicos y determinar la organización transcripcional de la agrupación génica de la holomicina en *S. clavuligerus*, se llevaron a cabo experimentos de RT-PCR (*r*everse *t*ranscription *p*olymerase *c*hain *r*eaction) a tiempo final.

Esta técnica consiste en la amplificación mediante PCR de un fragmento monocatenario de ADN, llamado ADN complementario (ADNc), que es generado previamente mediante la acción de una enzima, la transcriptasa reversa, sobre una molécula de ARNm a la que emplea como molde. El sistema utilizado para el análisis fue el kit *Superscript<sup>TM</sup> One-Step RT-PCR with Platinum<sup>®</sup> Taq System* (Invitrogen), siguiéndose en todo caso las instrucciones del fabricante.

Esta técnica también permitió comparar la expresión de un gen en distintas cepas, pudiendo establecer, en algunos casos, diferencias de expresión. También sirvió para analizar la existencia de transcripción acoplada entre dos genes contiguos.

Es necesario utilizar como cebadores de la retrotranscriptasa y de la ADN polimerasa oligonucleótidos complementarios a la secuencia de ADN que se quiere analizar. Los oligonucleótidos se diseñaron para amplificar productos específicos entre 300 y 600 pb,

intentando que el amplicón se localizase cerca del extremo 5' del transcrito, para minimizar el efecto negativo sobre la amplificación ocasionado por una posible degradación de la muestra. En el caso de la detección de transcritos intergénicos, el tamaño del fragmento amplificado fue en ocasiones menor, y el diseño de los cebadores se realizó de tal manera que el amplicón incluyese la región situada entre los dos genes analizados.

Los experimentos de RT-PCR se llevaron a cabo mediante el sistema en un sólo paso comercializado por Invitrogen, *Superscript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq*, donde la síntesis de ADNc y su amplificación por PCR tienen lugar en un mismo tubo.

La temperatura de hibridación, así como el número de ciclos necesarios para detectar transcritos o diferencias de expresión, se determinaron experimentalmente para cada pareja de cebadores. Las condiciones generales de las reacciones de RT-PCR fueron las siguientes:

- **Síntesis de ADNc y pre-desnaturalización.** Consiste básicamente en la transcripción reversa del ARN molde. La síntesis de ADNc se consigue en unos 15-30 minutos, a una temperatura de 50 °C. Inmediatamente después, la transcriptasa reversa es inactivada y la ADN polimerasa es reactivada. El híbrido ARN/ADNc se desnaturaliza durante dos minutos de incubación a 94 °C, como paso previo a la reacción de PCR.
- **Amplificación por PCR.** Se llevaron a cabo entre 30 y 40 ciclos típicos de la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar el ADNc obtenido en función del nivel de expresión. Hay que tener en cuenta que la temperatura de hibridación debe estar entre 5 y 7 °C por debajo de la temperatura de fusión más baja de los dos oligonucleótidos, aunque como en cualquier PCR, esta temperatura ha de ser optimizada de manera empírica.
- **Extensión final.** 10 minutos a 72 °C.

En todos los casos las reacciones se llevaron a cabo en 20 µl de volumen final, empleándose como molde 200 ng de ARN total. Como tampón de la reacción se utilizó la mezcla de reacción aportada por el kit, en la que también se incluyen los desoxinucleótidos trifosfato. En todos los casos, se necesitó suplementar la reacción con DMSO a una

concentración final del 0,05% (v/v). La composición de las reacciones fue la que se detalla a continuación:

Mezcla de Reacción 2x	10 µl
RNA molde (100 µg/µl)	2 µl
Oligonucleótido 1 (10 µg/µl)	0,4 µl
Oligonucleótido 2 (10 µg/µl)	0,4 µl
Mezcla SuperScript II™/Platinum® Taq	0,3 µl
DMSO	1 µl
Agua libre de RNasa	5,9 µl

Junto con cada RT-PCR, se realizaron controles negativos donde se sustituyó la mezcla de retrotranscriptasa y polimerasa por 0,18 µl de *Platinum® Taq*. De esta manera se comprobó que las muestras estaban libres de ADN que pudiera interferir con el resultado de la prueba, dando falsos positivos o produciendo una amplificación mayor de la que se tendría únicamente debida al ARN.

El tamaño de los productos amplificados se comprobó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, las bandas de amplificación generadas fueron secuenciadas con uno de los dos cebadores empleados para cada una de ellas, con el fin de constatar su identidad.

## 2.21. Determinación del inicio de transcripción mediante la técnica RACE

Cuando se hizo necesaria, la determinación del punto de inicio de transcripción de los genes presentes en la agrupación génica de la holomicina se llevó a cabo mediante la técnica RACE (*Rapid amplification of cDNA ends*), empleándose el kit comercial *5' RACE system for rapid amplification of cDNA ends* (Invitrogen). En todo momento se siguieron las instrucciones del fabricante.

El RACE consiste en la obtención de un producto de PCR que incluya en su secuencia el extremo 5' de un determinado transcrito. El procedimiento seguido con el sistema diseñado por Invitrogen consta de varias fases:

- **Obtención de un ADNc que contenga el inicio de transcripción del gen.** En primer lugar, una muestra de ARN total se hibrida con un cebador diseñado específicamente frente a la región codificante del ARNm estudiado, pero razonablemente cerca de su codón de inicio de traducción. La acción de una transcriptasa reversa a 50 °C y durante 40 minutos, como en el caso de la RT-PCR, dará lugar a un ADNc (aunque realmente es una población de ellos, a causa de las posibles hibridaciones inespecíficas a las que pueda dar lugar nuestro cebador sobre el ARN total).
- **Adición de una cola de poli-C al extremo 3' del ADNc.** Tras la eliminación del ARN total mediante la digestión con un cóctel de ARNasas y purificación de los ADNc mediante una columna diseñada a tal efecto, se añade al extremo 3' de los mismos una cola reiterativa de poli (dC) gracias a la actividad de una enzima denominada transferasa terminal (15 minutos, 37 °C). Tras este proceso, estaremos en posesión de un fragmento monocatenario de ADN complementario al ARNm original, con la salvedad de que el primer nucleótido de éste (que se refleja en el extremo 3' del ADNc) lleva unidos varios desoxinucleótidos de citosina.
- **Realización de una PCR anidada sobre el ADNc.** A continuación, se procede a la realización de una reacción de PCR empleando ese ADNc prolongado en su extremo 3' con una cola de poli (dC). Para ello, se emplean dos cebadores: uno de ellos lo proporciona la casa comercial Invitrogen como parte del kit (*abridged universal amplification primer*), que contiene en su extremo 3' una secuencia poli (dG) que le permite hibridar con el cola poli (dC) del ADNc. El otro cebador depende del ARNm estudiado y se diseña de modo que hibride con la región codificante del gen, pero dentro de la zona incluida en el ADNc original, y por lo tanto un poco más cerca del punto de inicio de transcripción del gen. Con este paso se amplifica el fragmento de interés a la vez que se descartan los ADNc inespecíficos que hubiesen podido surgir durante la primera fase del proceso. Los productos de esta PCR pueden ser ya visionados tras su electroforesis en un gel de agarosa para valorar su tamaño. Evidentemente, en caso de que el gen tenga más de un posible inicio de la transcripción, más de una banda de amplificación aparecerá en la PCR.

- **Segunda PCR anidada y secuenciación.** Una segunda ronda de PCR anidada puede realizarse empleando como molde una dilución de la PCR anterior. En este caso, se emplea de nuevo el cebador universal proporcionado por el kit, por un lado, y por el otro un tercer cebador específicamente diseñado frente al ARNm estudiado, y que en este caso se encuentra aún más cerca del inicio de traducción del gen, y por lo tanto del inicio de su transcripción. Los productos de amplificación así obtenidos se someten a electroforesis en un gel de agarosa, las bandas son cortadas y el ADN que contienen secuenciado. El desoxinucleótido que aparezca justo antes de la cola de poli (dC) se identifica con el primer desoxinucleótido transcrito para dar lugar al ARNm del gen.

En los casos en los que no es posible saber cuál es el primer nucleótido (por la presencia de uno o más nucleótidos de citosina en el extremo 5' del transcrito, lo que impide saber si la secuencia que observamos se corresponde al ARNm o a la adición posterior de nucleótidos por la transferasa terminal), se deberá proceder a un nuevo marcaje del ADNc original con la transferasa terminal, pero empleándose en este caso desoxinucleótidos de adenina. Dado que la cola así generada en el extremo 3' del ADNc es de poli-A, se deberá emplear un cebador diferente en las reacciones de PCR anidada subsiguientes, también proporcionado por Invitrogen (*3' RACE adapter primer*).

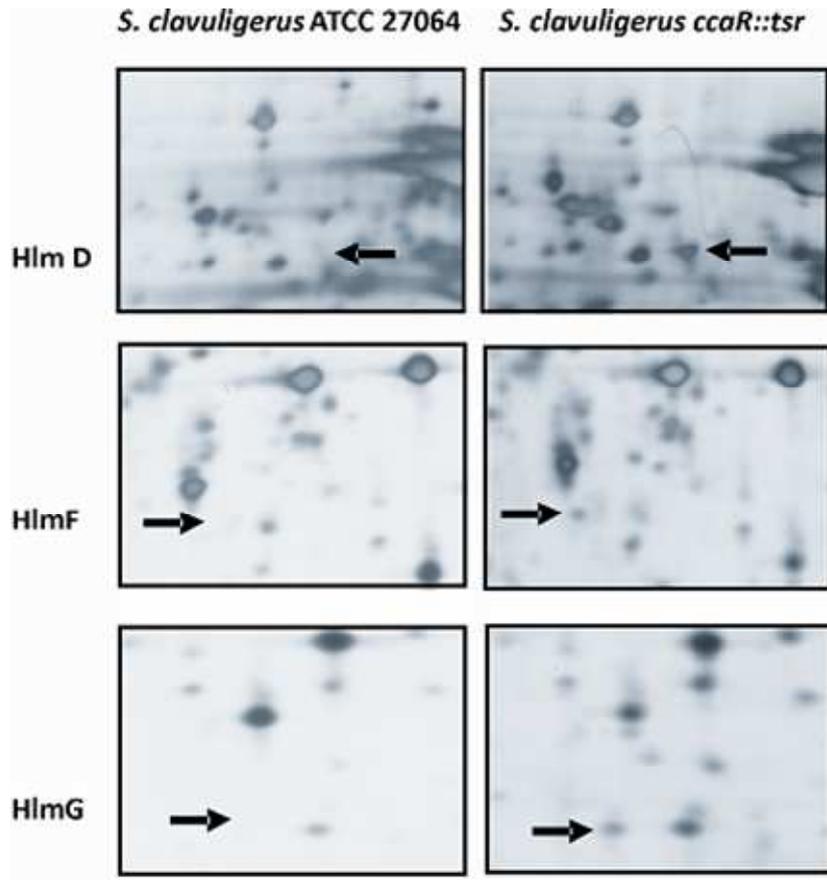
### **3. RESULTADOS Y ANÁLISIS I (Biosíntesis de holomicina)**



### 3.1. Búsqueda y localización de la agrupación génica para la biosíntesis de holomicina en *Streptomyces clavuligerus*

Estudios proteómicos comparativos entre la cepa silvestre *S. clavuligerus* ATCC 27064, *S. clavuligerus*  $\Delta ccaR::tsr$ , cepa productora moderada de holomicina (Alexander y Jensen, 1998) y *S. clavuligerus*  $ccaR::aph$ , cepa superproductora de holomicina (de la Fuente *et al.*, 2002), permitieron detectar la sobre representación de tres proteínas en el proteoma de las últimas. Su análisis mediante espectrometría de masas en tándem permitió identificarlas como una glucosa-metanol-colina oxidorreductasa, una cisteína descarboxilasa y una globina (Irene Santamarta, comunicación personal).

El análisis de las secuencias génicas que codifican estas proteínas estableció su correspondencia con tres marcos de lectura de *S. clavuligerus* anotados en la base *Broad Institute* como SSCG\_03487, SSCG\_03489 y SSCG\_03490. Dichos marcos fueron denominados en un principio como ORF87 (codifica para una glucosa-metanol-colina oxidorreductasa, posteriormente denominado como *hlmD*), ORF89 (codifica una cisteína descarboxilasa, posteriormente denominado como *hlmF*) y ORF90 (codifica una globina, posteriormente denominado como *hlmG*), adyacentes en el genoma (figura 3.1). Al analizar el entorno génico se identificaron marcos de lectura u ORFs (tabla 3.1) adicionales y que, en su conjunto, parecían formar una agrupación para la producción de un metabolito secundario, finalmente denominado como agrupación *hlm* (Li y Walsh, 2010; Robles-Reglero *et al.*, 2013).



**Figura 3.1. Comparación de los proteomas de *S. clavuligerus* ATCC 27064 y *S. clavuligerus*  $\Delta$ ccaR::tsr.** En los paneles de la izquierda se muestran zonas del proteoma de *S. clavuligerus* ATCC 27064 y en los paneles de la derecha zonas del proteoma de *S. clavuligerus*  $\Delta$ ccaR::tsr, cepa que produce cantidades moderadas de holomicina. Las proteínas diferencialmente expresadas se encuentran marcadas por las flechas negras y corresponden a *hlmD* (SSCG\_03487) (paneles superiores), *hlmF* (SSCG\_03489) (paneles centrales) y *hlmG* (SSCG\_03490) (paneles inferiores). Se encontraron resultados similares para *S. clavuligerus* *oppA2::aph* (no se muestran). Modificado de Robles-Reglero *et al.* 2013.

Nº base de datos	Genes	Función
SSCG_3483	<i>hlmA</i>	acetiltransferasa
SSCG_3485	<i>hlmB</i>	deshidrogenasa
SSCG_3486	<i>hlmC</i>	tioesterasa
SSCG_3487	<i>hlmD</i>	oxidoreductasa
SSCG_3488	<i>hlmE</i>	péptido sintetasa no ribosomal
SSCG_3489	<i>hlmF</i>	proteína biosíntesis lantibióticos
SSCG_3490	<i>hlmG</i>	globina
SSCG_3491	<i>hlmH</i>	permeasa
SSCG_3492	<i>hlmI</i>	reductasa
SSCG_3493	<i>hlmJ</i>	proteína reguladora
SSCG_3494	<i>hlmK</i>	tioesterasa
SSCG_3495	<i>hlmL</i>	péptido sintetasa
SSCG_3496	<i>hlmM</i>	regulador transcripcional

**Tabla 3.1. Análisis del entorno génico de la hipotética agrupación de biosíntesis de holomicina.**

A la izquierda de la tabla se encuentra la anotación correspondiente a la base de datos *Broad Institute*, en el centro se encuentran los nombres dados en este trabajo a los distintos marcos de lectura y a la derecha las funciones de las proteínas para las que codifican dichos marcos de lectura. Modificado de Robles-Reglero *et al.* 2013.

Analizando la estructura de la molécula de holomicina se llevó a cabo una predicción de las actividades enzimáticas posiblemente requeridas en su biosíntesis:

- Péptido sintetasa no ribosomal (NRPS) que seleccionaría la cisteína activándola como amino acil adenilato y, en su dominio de condensación, catalizaría la formación de la unión peptídica. Esta proteína podría estar codificada por *hlmE*.
- Tioesterasa que rompería el ácido tiocarboxílico (-COSH) dejando una amida; podría estar codificada por *hlmC*.
- Descarboxilasa que haría perder el grupo carboxilo de la cisteína, que podría estar codificada por *hlmF*.
- Oxidasa (o ciclasa) que formaría un enlace disulfuro llegando así a la formación de la holotina, codificada por *hlmI*.
- Acetiltransferasa que transferiría un grupo acetilo a la molécula de holotina para convertirla en holomicina; podría estar codificada por *hlmA*.

Para comprobar la posible implicación de estos marcos de lectura en la ruta de biosíntesis de holomicina en *S. clavuligerus*, se diseñó la realización de una serie de experimentos:

- Construcción de una librería génica o genoteca.
- Deleción de marcos de lectura.
- Análisis de la expresión de todo el clúster en distintas cepas productoras y no productoras de holomicina.
- Expresión heteróloga de toda la agrupación génica de biosíntesis en una cepa hospedadora no productora de holomicina.
- Análisis de las regiones promotoras de dicha agrupación de biosíntesis.

Sin embargo, durante el desarrollo de este proyecto de investigación, Li y Walsh describen este mismo grupo de genes para la biosíntesis de holomicina en el genoma de *S. clavuligerus* (Li y Walsh, 2010) y proponen una ruta biosintética para la holomicina (Figura 3.2).

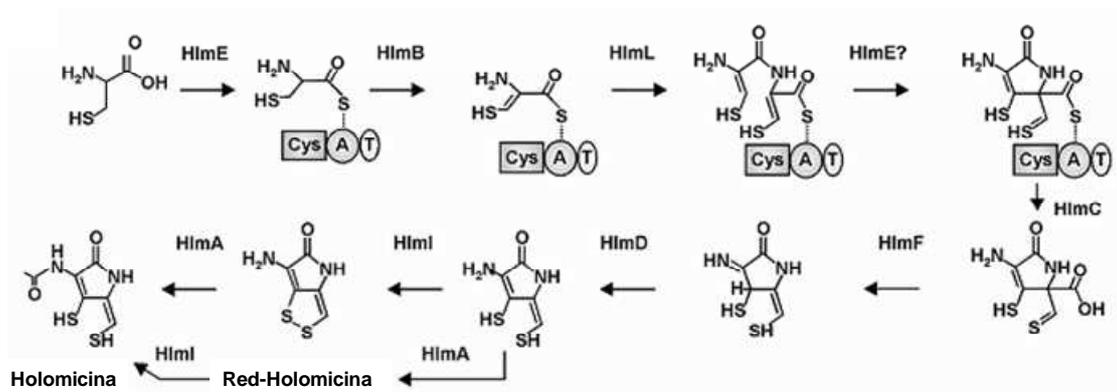


Figura 3.2. Ruta de biosíntesis de Holomicina propuesta por Li y Walsh (2010). Modificado de Li y Walsh 2010.

### 3.2. Aislamiento de la agrupación génica responsable de la biosíntesis de holomicina en *S. clavuligerus*

Para el aislamiento de fragmentos de ADN de interés, y en muchos casos, como primer paso para la secuenciación completa de un genoma, se utilizan librerías génicas también llamadas genotecas. En *S. coelicolor* se ha optimizado un procedimiento para la deleción de

genes basado en el uso de cósmidos, ReDirect<sup>®</sup> aplicado con éxito en otras especies del género *Streptomyces* (Gust *et al.*, 2002). Estas consideraciones nos llevaron a la construcción de una librería génica en cósmidos de *S. clavuligerus*.

### **3.2.1. Construcción de una genoteca de ADN genómico**

Con el fin de identificar los genes implicados en la biosíntesis de holomicina se llevó a cabo la construcción de una genoteca a partir del ADN de *S. clavuligerus* ATCC 27064. Su construcción se realizó en cósmidos ya que funcionan como vehículos de clonación con capacidad para aceptar grandes fragmentos de ADN y contienen los extremos cohesivos (*cos*) del bacteriófago  $\lambda$ . Dicha región *cos* es esencial para el empaquetamiento del ADN del fago  $\lambda$  en la cápsida. Así, siempre que las regiones *cos* disten de 37 a 50 kb (límites de la capacidad de empaquetamiento del fago  $\lambda$ ), el ADN externo puede ser incorporado y propagado como partículas de ADN fágico (Hohn, 1975). La formación de moléculas de cósmidos recombinantes se realiza ligando fragmentos de ADN genómico (30-42 kb) con el vector, en condiciones que favorezcan la formación de concatémeros vector-ADN genómico-vector. Después de la infección de *E. coli*, el ADN recombinante se recirculariza y replica como un plásmido de gran tamaño. Dado el tamaño del ADN clonado, los cósmidos son vectores ideales para el estudio de regiones genómicas extensas. No obstante, presentan algunos inconvenientes ya que ciertas secuencias son inestables y aparecen deleciones resultantes de procesos de recombinación independientes de *recA*. La principal exigencia para la construcción de una genoteca representativa es la obtención de ADN total de alto peso molecular en gran concentración y elevado grado de pureza.

### **3.2.2. Aislamiento y purificación del ADN genómico**

La genoteca de la cepa de *S. clavuligerus* ATCC 27064 se construyó, según se describe en materiales y métodos (ver apartado 2.17), utilizando el cósmido SuperCos 1.

El vector de clonación SuperCos 1 fue digerido con las enzimas XbaI y BamHI. La digestión con estas dos enzimas genera dos fragmentos del cósmido (1,1 y 6,5 kb) con una región *cos* en cada uno.

La extracción de ADN genómico mínimamente fragmentado es fundamental en este proceso. Se aplicó para ello el método de *Salting out* (Pospiech y Neumann, 1995; Kieser *et al.*, 2000) (descrito en el apartado 2.8.4) a partir de micelio recogido tras el cultivo de la cepa *S. clavuligerus* ATCC 27064 en medio complejo TSB durante 30h a 220 rpm y 28 °C. La integridad del ADN obtenido se comprobó por electroforesis en gel de agarosa, mediante comparación con el patrón de migración de ADN del fago  $\lambda$  digerido con la enzima de restricción KpnI. Así se pudo verificar la buena calidad de dicha preparación, observando fragmentos de gran tamaño sin rastros de degradación o rotura.

A continuación, se purificó el ADN eliminando trazas de ARN contaminante mediante tratamiento con ARNsA y posterior precipitación y comprobación de la integridad mediante electroforesis en gel de agarosa.

La cuantificación y determinación de la pureza final se llevó a cabo mediante el análisis de una pequeña alícuota (2  $\mu$ l de la preparación) con el sistema NanoDrop ND-1000 (*NanoDrop Technologies*) obteniéndose los siguientes valores:

- Concentración de ADN genómico: 1,452  $\mu$ g/ $\mu$ l
- Pureza (relación de absorbancia  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ ): 1.9 - 2.01

Dichos valores clasifican la preparación de ADN genómico o ADN total (ADNt) como de concentración y calidad óptimas para continuar con la elaboración de la genoteca.

### **3.2.3. Digestión enzimática y separación de fragmentos por gradiente de sacarosa**

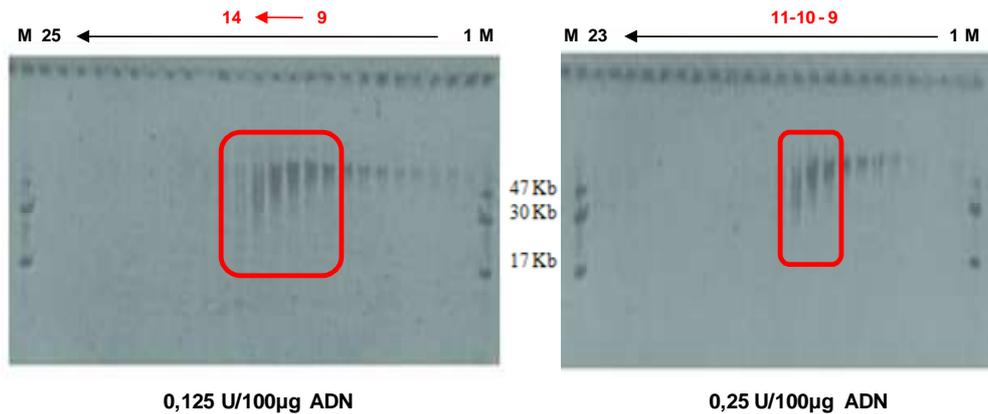
Tras la obtención del ADN genómico de calidad adecuada, se llevo a cabo una digestión parcial del mismo con la enzima Sau3AI, para obtener fragmentos de ADN de un tamaño adecuado para la construcción de la genoteca (30-42 kb). En primer lugar, se realizaron ensayos de digestión a pequeña escala (aproximadamente 10  $\mu$ g de ADN total (ADNt)), con el objetivo de determinar las condiciones de digestión adecuadas optimizando el tiempo de digestión y la concentración de enzima.

Las pruebas para la optimización del tiempo de digestión se realizaron a 37 °C con una concentración de enzima de 0,01 U/μg de ADNt. Estos ensayos se llevaron a cabo en repetidas ocasiones variando el rango de tiempo (0-60 min) y los intervalos de digestión (cada 5 ó 10 min) sin obtenerse resultados reproducibles y además, en muchos de los casos, no se consiguió una digestión gradual en función del tiempo de digestión. Debido a estos problemas de reproducibilidad, finalmente se optó por la digestión con diferentes concentraciones de enzima.

Las concentraciones de enzima Sau3AI que se ensayaron oscilaron entre  $1 \times 10^{-3}$  y 1 U/μg de ADNt, para un tiempo de digestión de 30 minutos a 37 °C. La concentración óptima de Sau3AI para la digestión parcial resultó ser entre  $1,25 \times 10^{-3}$  y  $2,5 \times 10^{-3}$  U/μg de ADNt.

El cambio de escala provoca que la digestión parcial con mayor cantidad de ADNt (aproximadamente 100 μg) no se produzca exactamente en las mismas condiciones que a pequeña escala, por lo que es probable que la concentración de enzima más adecuada no sea exactamente la misma. Por esto, se realizó la digestión parcial a gran escala con las concentraciones óptimas:  $1,25 \times 10^{-3}$  y  $2,5 \times 10^{-3}$  U/μg de ADNt y una concentración intermedia:  $1,7 \times 10^{-3}$  U/μg de ADNt.

Tras la digestión a gran escala, se realizó una segunda selección de fragmentos mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa (10% - 40%) (Figura 3.3), según se especifica en materiales y métodos (apartado 2.17.2). Aunque este paso no es esencial, su realización incrementa considerablemente la eficiencia del empaquetamiento al eliminar una gran parte de los fragmentos generados por digestión parcial que no presentan el tamaño adecuado (30-42 kb). Los fragmentos que no están comprendidos en este rango no pueden ser empaquetados aunque sí pueden ser ligados al vector, por lo que reducen el número de moléculas de vector disponibles para la ligación con fragmentos de ADN de tamaño óptimo.



**Figura 3.3. Ultracentrifugación en gradiente de sacarosa.** Electroforesis en gel de agarosa al 0,4% de las diferentes fracciones de la digestión parcial con Sau3AI del ADN total de *S. clavuligerus* obtenidas mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa. **M:** Marcador de peso molecular  $\lambda$  KpnI; **1-23** y **1-25:** Fracciones de la digestión parcial en las dos concentraciones usadas. Los cuadros rojos marcan el tamaño entre el cual tienen que estar comprendidos los fragmentos de ADN genómico. Las fracciones que se utilizaron para el empaquetamiento aparecen indicadas en rojo.

Finalizada la separación de todos los fragmentos obtenidos en la digestión, se recogieron los de tamaño deseado (oscilando entre 25 y 40 kb) y se precipitaron.

La cuantificación y determinación de la pureza de dicha solución de fragmentos se realizó empleando el sistema NanoDrop y los resultados fueron los siguientes:

- Concentración de la solución de fragmentos:  $0.514 \mu\text{g}/\mu\text{l}$
- Pureza ( $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ ): 1.92 – 1.96

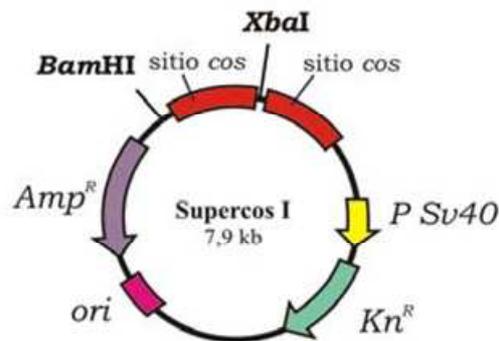
Dichos valores indican una solución de fragmentos ADN genómico de tamaño, concentración y pureza adecuados que permiten continuar con el proceso de elaboración de la genoteca.

### 3.2.4. Ligación de fragmentos, empaquetamiento y titulación de la genoteca

El siguiente paso consistió en la ligación del ADNt/Sau3AI con el cósmido digerido BamHI/XbaI (figura 3.4). Tras la ligación, se obtiene una construcción lineal en la que los fragmentos de ADNt se encuentran flanqueados por cada uno de los brazos del cósmido

SuperCos 1, quedando las regiones *cos* en las zonas terminales de la construcción a una distancia comprendida entre 38-50 kb.

Posteriormente, el producto de ligación fue empaquetado *in vitro* en fagos, mediante la adición de extractos crudos de células bacterianas que contienen todas las proteínas necesarias para ensamblar un fago completo (*Gigapack III XL Packaging extract, Stratagene*). El fago empaqueta el ADN digiriendo por los sitios *cos*, perdiéndose 1 kb del vector en este proceso. Estas partículas fágicas, que contienen los diferentes fragmentos del ADNt de *S. clavuligerus* clonados en el vector SuperCos 1, son las encargadas de transferir dichas construcciones a las células de *E. coli* XL1 Blue hospedadoras, mediante infección de las mismas. Tras la infección, la construcción se recirculariza formando un plásmido de gran tamaño.



**Figura 3.4.:Vector SuperCos 1.** El vector SuperCos 1 se digiere con XbaI y BamHI obteniéndose dos brazos con un sitio *cos* en cada uno.

El producto de empaquetamiento se tituló en la construcción de la genoteca con el objetivo de comprobar que dicho producto era lo suficientemente rico en fagos como para obtener una genoteca representativa del genoma total de *S. clavuligerus*. Esta titulación se realizó mediante una infección a pequeña escala (25  $\mu$ l de diluciones 1:25 y 1:50 del producto de empaquetamiento) y recuento de diluciones seriadas de las colonias infectadas. El valor de la titulación obtenido fue de 108 clones/ $\mu$ l de reacción de empaquetamiento, en un volumen final de 500  $\mu$ l, lo que da un total de  $5,4 \times 10^4$  clones utilizando toda la mezcla de empaquetamiento.

Obtenido este valor, se calculó el número de clones necesarios para conseguir una genoteca representativa del genoma de *S. clavuligerus*, empleando la fórmula de Clarke y Carbon (Clarke y Carbon, 1976):

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-F)}$$

Donde **N** es el número de clones necesarios para que la genoteca sea representativa, **P** es la probabilidad de que estén representadas todas las secuencias del genoma (para encontrar una secuencia al 99,9% de fiabilidad) y **F** es el cociente entre el tamaño medio de los insertos de ADN clonados (en este caso de 37,5 kb (Redenbach *et al.*, 1996) y el tamaño total del genoma (en este caso de 8,5 Mb).

De esta forma, para tener totalmente representado el genoma de *S. clavuligerus*, deberíamos conseguir una genoteca que generara al menos **1.583 clones**; habiendo obtenido unos valores de titulación de  $5,4 \times 10^4$  UFC totales, dicho número de clones queda ampliamente superado, por lo que la titulación es completamente satisfactoria y asegura la presencia de cada uno de los marcos de lectura presentes en dicho genoma. Por lo tanto, la mezcla de empaquetamiento nos permite conseguir una genoteca representativa para el genoma de *Streptomyces clavuligerus*.

El último paso del proceso fue la amplificación de la genoteca, obteniéndose un título final de  **$4,54 \times 10^9$  UFC/ml** para la genoteca de *S. clavuligerus*.

### 3.2.5. Organización de la librería génica

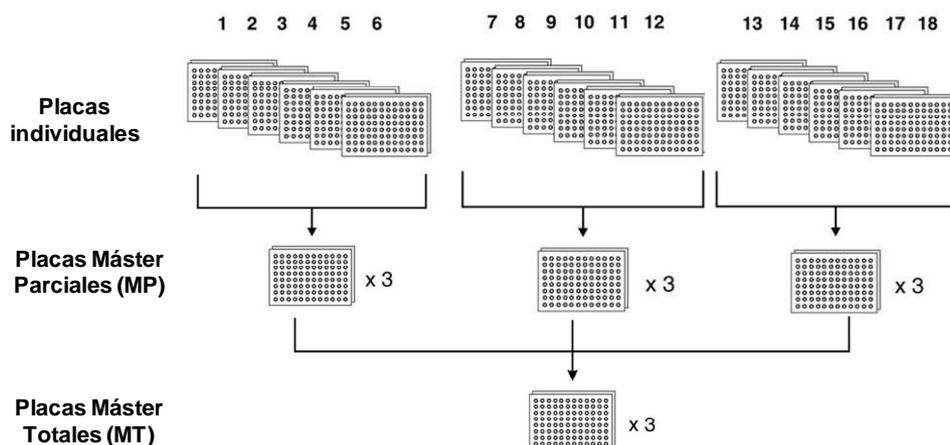
Los métodos clásicos de rastreo de genotecas son, en su mayoría, muy laboriosos. El desarrollo de sistemas que faciliten el rastreo rápido y eficaz de la totalidad de una librería génica supone una importante ganancia de tiempo en el manejo de genomas completos. Por lo cual, una vez obtenida la genoteca de *S. clavuligerus* ATCC 27064 se procedió a la organización de la misma en placas de microtitulación de 96 pocillos mediante el procedimiento de Martínez-Castro *et al.* (Martínez-Castro *et al.*, 2009):

- Se cultivaron 1700 clones individualmente en 1 ml de medio TB suplementado con ampicilina (100 µg/ml) en microtubos de 1,5 ml a 37 °C en agitación durante 20-24 horas.
- Posteriormente, se añadieron 350 µl de glicerol al 80% a cada cultivo (concentración final 20%) y fue etiquetado con la posición en una de la placas de microtitulación (12

columnas numeradas: 1-12 y 8 filas designadas: A-H). De cada cultivo se colocaron 350  $\mu$ l en la posición correspondiente de la placa, dejando las cuatro esquinas libres para los correspondientes controles. De esta forma, para tener representado completamente el genoma de *S. clavuligerus* ATCC 27064 se colocaron **1656** clones individualmente en 18 placas de microtitulación.

- Los clones pertenecientes a grupos de 6 placas, se mezclaron en una única placa, Máster Parcial (MP), colocando en cada posición de esta placa 50  $\mu$ l de los cultivos que ocupan la misma posición en las placas individuales. Finalmente, en cada posición se obtiene una mezcla de 6 clones en un volumen final de 300  $\mu$ l.
- Por último, las placas Máster Parcial se agruparon en una única placa Máster Total (MT), con el objeto de tener la totalidad de los clones de la genoteca en una sola placa pero colocados en posiciones concretas de la misma (figura 3.5). La placa Máster Total se obtuvo mezclando 100  $\mu$ l de cada pocillo de las placas Máster Parcial, resultando una mezcla de 18 clones por posición. Se realizaron réplicas, tanto de las placas Máster Parcial como de la placa Máster Total, a modo de reserva.
- En las cuatro esquinas de las placas Máster se colocaron diferentes controles:
  - A1 → ADNt de *S.clavuligerus* ATCC 27064 (50 ng/ $\mu$ l)
  - A12 → ADN del cósmido SuperCos 1 (5 ng/ $\mu$ l)
  - H1 → Cultivo en medio LB de *E. coli* XL1-Blue
  - H12 → Cultivo en medio LB de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformada con SuperCos 1

El resultado final de la organización comprende 1656 clones colocados de manera individual en 18 placas de microtitulación y en los correspondientes microtubos de 1,5 ml donde se realizó el cultivo (reserva de cada clon), 3 placas Máster Parcial con una mezcla de 6 clones por posición y 1 placa Máster Total con una mezcla de 18 clones por posición. Todo este material se conserva a -80 °C.



**Figura 3.5. Esquema de organización piramidal de una librería génica en placas de microtitulación.** Los 1656 clones necesarios se crecieron de manera individual y se colocaron en diferentes posiciones de las 18 placas de microtitulación. Los clones pertenecientes a grupos de 6 placas se mezclaron de manera ordenada (manteniendo cada clon la misma posición que tiene en las placas individuales) en una sola placa, Máster Parcial (MP). Las tres placas Máster Parcial se mezclaron en una sola placa, Máster Total (MT). Modificado de Martínez-Castro *et al.* 2009.

### 3.2.6. Rastreo de la librería génica para la localización de la agrupación *hlm*

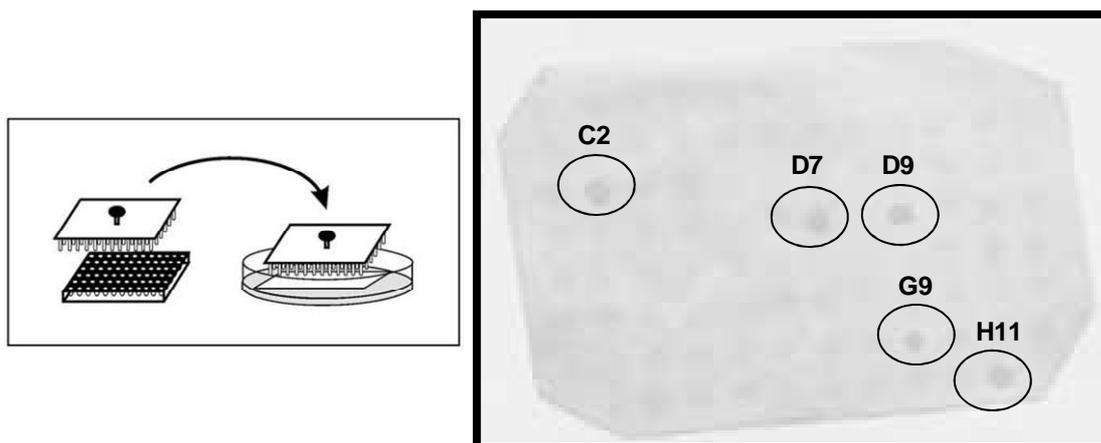
La organización de la genoteca en la disposición piramidal anteriormente descrita, facilita el rastreo de la misma que consta de dos partes. En primer lugar, se lleva a cabo la búsqueda por hibridación de colonias *in situ* en la placa Máster Total, la cual contiene una mezcla de 18 clones en cada posición. Con el objeto de agilizar este rastreo y procesos de muerte celular por congelación - descongelación de las placas Máster, se prepararon varias membranas de la placa Máster Total listas para hibridar (ver apartado 2.14.2). Estas membranas contienen inmovilizado el ADN correspondiente a cada posición de la placa Máster Total y se pueden conservar a 4 °C durante largos periodos de tiempo (años). Esta técnica es más laboriosa y requiere de más tiempo que el rastreo mediante PCR pero presenta una mayor sensibilidad y reproducibilidad, permitiendo localizar los genes de interés cuando no es recomendable la detección mediante PCR.

Para la localización de la agrupación génica de biosíntesis de holomicina (agrupación *hlm*) se llevó a cabo la búsqueda del gen *hlmA* que codifica una acetiltransferasa. La disponibilidad de la secuencia completa del genoma de *S. clavuligerus* permitió diseñar una pareja de cebadores específicos para crear la sonda de rastreo de la genoteca, amplificando

mediante PCR un fragmento algo mayor al gen que codifica para la acetiltransferasa, con 80 pb corriente arriba y otras 63 pb corriente abajo del gen que medía un total de 998 pb, utilizando para ello dos oligonucleótidos llamados *sense* PRM y *antisense* PRM diseñados mediante el programa *Vector NTI Advance™ (Invitrogene™)*. Dicho fragmento se clonó en el vector *pGEM®-T easy (Promega)* y se secuenció utilizando los cebadores universales SP6 y T7 y los propios cebadores utilizados para su amplificación. Con esto nos aseguramos de que la secuencia amplificada era la correcta para poder usar la sonda en el rastreo de la genoteca.

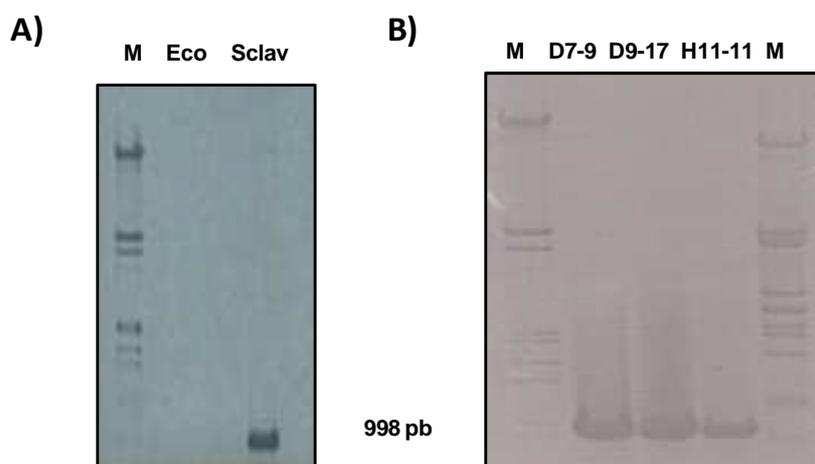
Previamente al protocolo de rastreo de la genoteca, se comprobó la especificidad de los cebadores *sense* PRM y *antisense* PRM con los que se obtuvo una sola banda del tamaño esperado (998 pb) para *S. clavuligerus* ATCC 27064, ausente en el control negativo empleando ADNt de *E. coli* como molde. (figura 3.7.A).

El rastreo de la placa Máster Total (MT) se realizó mediante hibridación de colonias *in situ* (ver apartado 2.14.2). La sonda de hibridación *hlmA* (fragmento de 998 pb que contiene el gen *hlmA* de *S. clavuligerus*) utilizada en el rastreo mediante hibridación de colonias *in situ* se obtuvo por amplificación directa de ADNt de *S. clavuligerus* y posterior purificación y marcaje con digoxigenina. El rastreo de la placa Máster Total mediante hibridación con la sonda *hlmA* permitió detectar cinco señales que correspondían con las posiciones en la membrana: C2, D7, D9, G9 y H11 (figura 3.6).



**Figura 3.6. Rastreo de la placa Máster Total mediante hibridación de colonias *in situ*.** A la izquierda se muestra un esquema de la técnica. A la derecha se muestra la membrana, ya hibridada y revelada, donde las posiciones positivas aparecen resaltadas con un círculo y marcadas con la localización correspondiente a la placa de microtitulación.

Una vez detectadas las posiciones positivas de la placa Máster Total (MT), con 18 clones cada una, el segundo paso del rastreo consiste en la detección del cósmido positivo. Los clones se mantienen almacenados de manera individual en microtubos de 1,5 ml a -80 °C. Los 18 clones correspondientes a cada posición positiva detectada se refrescan mediante siembra en placas de medio LA suplementado con ampicilina (100 µg/ml). Los clones positivos se detectaron en una segunda fase mediante PCR de colonias (extracción del ADN mediante hervido de las colonias; ver apartado 2.10) utilizando la sonda *hlmA*. Finalmente se localizaron tres cósmidos en las posiciones **D7-8**, **D9-17** y **H11-11** que acomodan al menos esa región del genoma de *S. clavuligerus* ATCC 27064 (figura 3.7.B). En este caso, las dos señales adicionales obtenidas mediante hibridación *in situ* de la membrana (posiciones C2 y G9) resultaron ser falsos positivos.

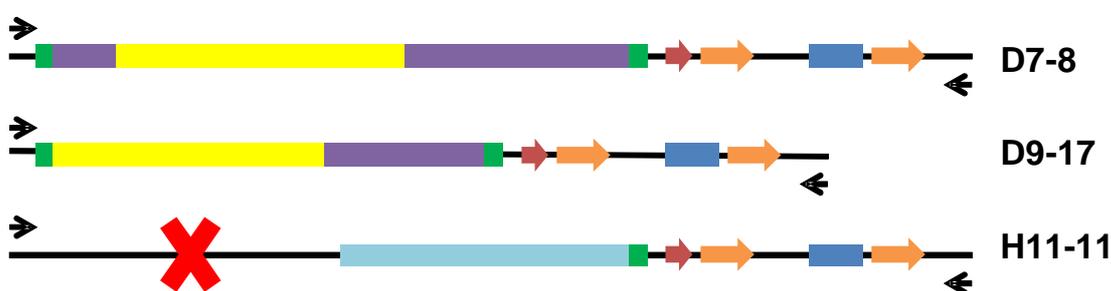


**Figura 3.7. Resultados del rastreo del gen *hlmA* en la librería génica de *S. clavuligerus* ATCC 27064. A)** Comprobación de la especificidad de los cebadores *sense* PRM y *antisense* PRM con los que se obtuvo una sola banda del tamaño esperado (998 pb) para *S. clavuligerus* (**Sclav**) mientras que utilizando ADNt de *E. coli* (**Eco**) como molde el resultado era negativo. **B)** Comprobación mediante PCR de los tres clones que dieron positivo. En la parte superior se indican las muestras correspondientes a cada carril. Las bandas amplificadas presentan el tamaño esperado de 998 pb. **M:** marcador de peso molecular  $\lambda$  *pstI*.

### 3.2.7. Análisis de los cósmidos positivos para el agrupamiento génico *hlm*

La comprobación de los cósmidos que resultaron ser positivos para la región *hlm* se llevó a cabo mediante la secuenciación de los extremos universales, T3 y T7, que posee el cósmido utilizado para la realización de la genoteca (SuperCos1).

En este punto del trabajo, ya se disponía de la secuencia completa del genoma de *S. clavuligerus* y se había optimizado en nuestro laboratorio la secuenciación a partir de ADN cosmídico. Por lo tanto, se llevó a cabo la secuenciación de los extremos de los fragmentos de ADN incorporados en los cósmidos positivos para *hlmA* con el fin de determinar exactamente el fragmento acomodado en cada cósmido y la posición de la agrupación génica en dicho fragmento. La secuenciación se realizó con los cebadores T3 y T7 (figura 3.8) que hibridan en los extremos del cósmido permitiendo secuenciar los extremos del fragmento incorporado. Como molde se utilizó ADN cosmídico aislado mediante lisis alcalina y purificado con el kit comercial QIAEX® II Gel Extraction Kit.



**Figura 3.8.** Fragmentos del genoma de *S. clavuligerus* incorporados en los cósmidos positivos para *hlmA*. Los genes de la agrupación génica de holomicina se indican en amarillo; el resto de genes pertenecientes al genoma de *S. clavuligerus* y cercanos a la agrupación *hlm* se representan en morado y los genes alejados de la agrupación, en color azul claro. Las flechas indican las zonas de secuenciación (T3 a la izquierda de la imagen y T7 a la derecha). En la parte superior se muestra el cósmido D7-8 que posee un inserto de 35,2 Kb, en el medio se muestra el cósmido H11-11 con un inserto de 28,9 Kb y en la parte inferior el cósmido D9-17 en el que no fue posible la secuenciación por el extremo T3 y por el extremo T7 se localizan genes muy alejados de la agrupación *hlm* y con un inserto de unas 30-35 Kb aproximadamente.

La localización de las secuencias de los extremos se realizó mediante alineamiento frente al genoma de *S. clavuligerus* (figura 3.8). Se localizó el cósmido D7-8 con la agrupación génica *hlm* completa en el fragmento incorporado. El cósmido H11-11 contiene los genes de la agrupación cercanos al extremo T3, tanto que la secuenciación por dicho extremo comienza en el gen *hlmL* y la agrupación génica no se encuentra completa (falta parte del gen *hlmL* y el gen completo *hlmM*). En el caso del cósmido D9-17, la secuenciación del extremo T3 no produjo ningún resultado, debido a que en el proceso de ligación de los fragmentos ese extremo haya podido sufrir una alteración dejando de ser funcional, y la secuenciación del extremo T7 conduce a una zona del genoma de *S. clavuligerus* muy alejada de la agrupación *hlm*. El análisis de D9-17 indica por tanto posibles reorganizaciones génicas en el proceso de construcción de la genoteca.

Debido a la localización centrada de los genes de interés en el fragmento de ADNt incorporado, el cósmido **D7-8** fue el seleccionado para llevar a cabo tanto las deleciones de los genes de interés mediante ReDirect<sup>®</sup> como la expresión heteróloga de la agrupación *hlm*.

### **3.3. Análisis transcripcional de la agrupación *hlm***

Con el fin de determinar la organización transcripcional de la agrupación génica de holomicina en *S. clavuligerus* ATCC 27064, se llevaron a cabo experimentos de RT-PCR a tiempo final (ver apartado 2.20). Esta técnica consiste en la amplificación mediante PCR de un fragmento monocatenario de ADN, llamado ADN complementario (ADNc), generado a partir del ARNm. Permite comparar la expresión de un gen entre distintas cepas, pudiéndose establecer diferencias de expresión, y analizar la existencia de transcripción acoplada entre dos genes contiguos.

Para la determinación del punto de inicio de transcripción de los genes presentes en la agrupación génica de la holomicina se llevó a cabo la técnica RACE (ver apartado 2.21). Esta técnica consiste en la obtención de un producto de PCR que incluya en su secuencia el extremo 5' de un determinado transcrito y la determinación de la zona promotora completa del mismo.

#### **3.3.1. Análisis de la expresión génica mediante RT-PCR a tiempo final**

Se extrajeron muestras de ARN a partir de micelios de las cepas *S. clavuligerus* ATCC 27064 y *S. clavuligerus oppA2::aph* cultivadas paralelamente durante 48 horas (fase estacionaria de crecimiento) (figura 3.9).

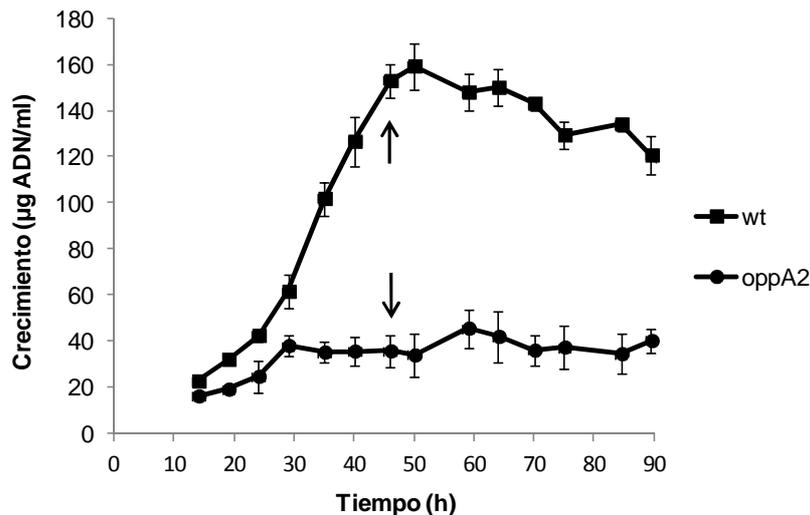


Figura 3.9. Gráfica que representa el crecimiento de la cepa silvestre *S. clavuligerus* ATCC 27064 y la cepa mutante *S. clavuligerus oppA2::aph*. Las flechas indican el punto elegido para la obtención del ARN que corresponde a las 48 horas de cultivo.

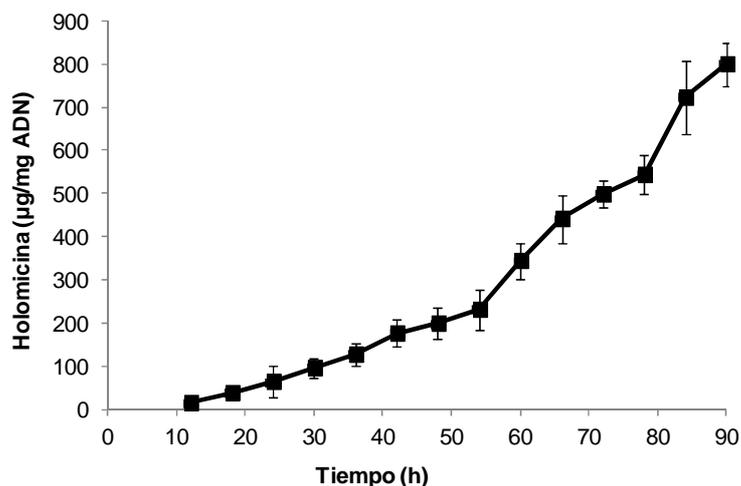


Figura 3.10. Producción específica de holomicina de la cepa mutante *S. clavuligerus oppA2::aph* a lo largo del tiempo.

Según se observa en la figura 3.10, la producción específica de holomicina aumenta a lo largo del tiempo. Dado que la holomicina es estable a temperatura ambiente (Li y Walsh, 2010), este aumento progresivo puede deberse a un efecto acumulativo de la molécula de holomicina en el cultivo. Por ello, no tomamos como referencia para la extracción de ARN el punto máximo de producción de holomicina, sino el punto más cercano a la entrada de la fase estacionaria (fase habitual de producción de metabolitos secundarios) de ambas cepas. Como la cepa mutante *S. clavuligerus oppA2::aph* entra en fase estacionaria alrededor de las 30 horas y la cepa silvestre sobre las 50 horas (figura 3.9), se eligieron las 48 horas como punto de extracción del ARN para la realización de los análisis de RT-PCR. En este punto de crecimiento:

- sigue habiendo ARN disponible en las células, ya que la producción de holomicina continúa aumentando en la cepa mutante *oppA2::aph* hasta las 90 horas.
- el ARN extraído de ambas cepas presenta una integridad elevada.

Las muestras de ARN (200 ng de ARN) fueron normalizadas usando el gen de expresión constitutiva *hrdB*, codificante de un factor sigma en *Streptomyces* y usado como control interno en los experimentos de RT-PCR.

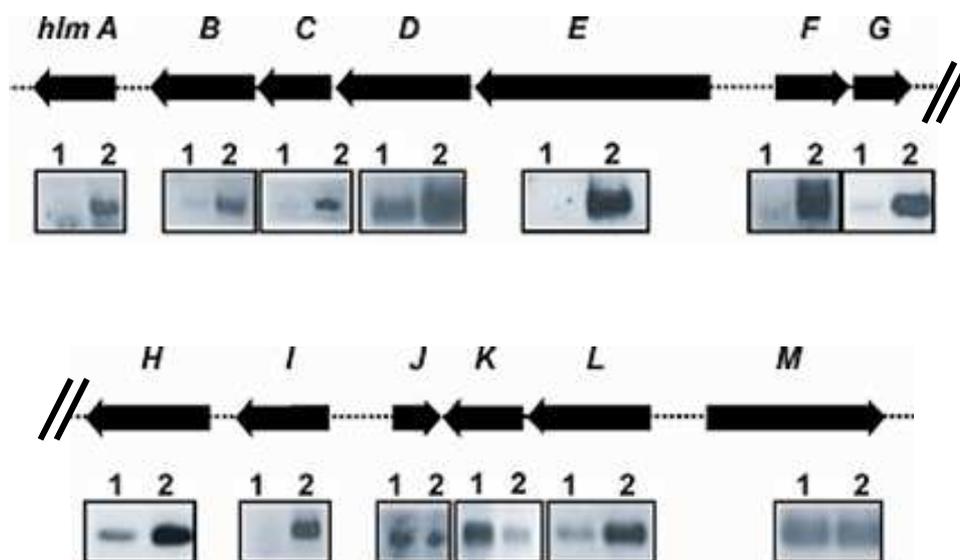
El empleo de la técnica de RT-PCR para el análisis transcripcional requirió parejas de oligonucleótidos que amplificaran las regiones del gen de interés o que amplificaran las regiones intergénicas en el caso de que se analizaran estas (Anexo I). Nuestro objetivo era visualizar la diferencia de expresión de los genes entre la cepa silvestre *S. clavuligerus* ATCC 27064 y la cepa superproductora de holomicina *S. clavuligerus oppA2::aph*, usando como molde ARN de cultivos crecidos en las mismas condiciones.

El análisis de transcripción acoplada mediante RT-PCR a tiempo final consiste en la detección de transcritos de la región intergénica entre dos genes adyacentes con la misma orientación, y que sólo estarán presentes cuando la pareja de genes analizada se exprese en un mismo ARNm. Esta técnica no establece exactamente la organización transcripcional, sino que determina si dos genes adyacentes se co-transcriben, o bien se expresan en transcritos diferentes. No obstante, su aplicación está extendida en el análisis transcripcional (Carl *et al.*, 2004; Benders *et al.*, 2005; Alduina *et al.*, 2007; Yoon y Cho, 2007; Redondo-Nieto *et al.*, 2008; Darbon *et al.*, 2012) ya que permite una aproximación al patrón de transcripción real de un conjunto de genes, de forma rápida y sin altos requerimiento de ARN.

Con el fin de determinar la ausencia de ADN contaminante en las muestras que pudiera interferir con los resultados generando falsos positivos como resultado de una amplificación a partir de ADN, todos los experimentos realizados incluyeron controles negativos consistentes en la preparación de una mezcla idéntica a cada una de los experimentos de RT-PCR, con la salvedad de que a esta no se le añadía la enzima transcriptasa reversa. Dado que la ADN polimerasa no puede emplear ARN como molde, estas reacciones no pueden en ningún caso dar lugar a bandas de amplificación si las muestras no se encuentran contaminadas con ADN. En los controles positivos para comprobar la eficiencia de los oligonucleótidos empleados como cebadores, se añadió ADN genómico como molde. Ambos

controles se realizaron con todas las parejas de oligonucleótidos, ya que cada oligonucleótido tiene una eficiencia de amplificación diferente.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3.11. El patrón de expresión indica que los dos genes reguladores putativos *hlmJ* y *hlmM* se expresaron de manera similar en ambas cepas. Una expresión menor se observó en la cepa silvestre para el gen *hlmD* (oxidorreductasa), y para *hlmH* (transportador del tipo MFS). La expresión de los genes *hlmA*, *hlmB*, *hlmC*, *hlmE*, *hlmF*, *hlmG* y *hlmI* fue detectada en la cepa superproductora de holomicina de *S. clavuligerus oppA2::aph* pero no en la cepa de tipo silvestre. La expresión de *hlmK*, que codifica una tioesterasa independiente, fue mayor en la cepa de tipo silvestre que en la cepa superproductora de holomicina; este gen se encuentra por debajo de *hlmL*, que codifica una péptido sintetasa, y ambos genes se solapan 3 nt, lo que nos sugiere la presencia de un promotor para *hlmK* interno a *hlmL* que se analizará en un apartado posterior (ver apartado 3.3.2).

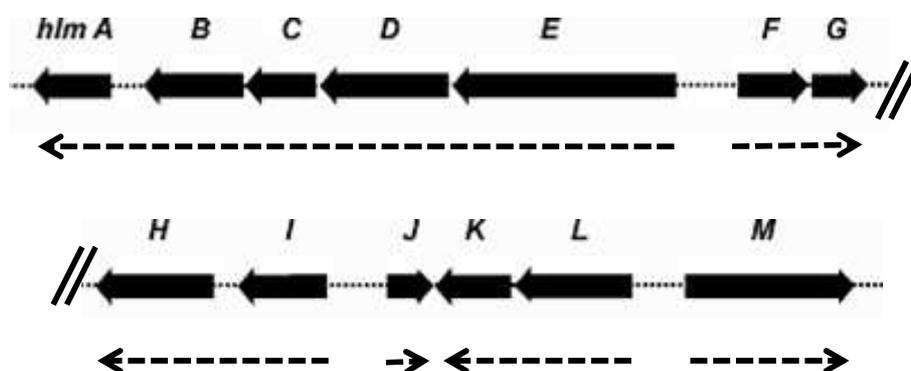


**Figura 3.11. Análisis de la expresión génica de la agrupación *hlm*.** En la imagen se muestran los genes de la agrupación *hlm* separados en dos partes mediante la imagen //. En los recuadros se muestran los análisis de RT-PCR de cultivos de 48 h crecidos en medio definido SA, tanto de la cepa *S. clavuligerus* ATCC 27064 (1) como de la cepa *S. clavuligerus oppA2::aph* (2). Modificado de Robles-Reglero *et al.* 2013.

De esta manera, podemos hacer una aproximación relativa y concluir que en los casos donde se observa la misma intensidad de banda en la cepa mutante y en la cepa silvestre, los niveles de expresión son similares; si la intensidad de la banda amplificada es menor en la cepa silvestre, entonces la expresión es menor que en la cepa mutante. Esta aproximación requiere

cautela, porque la RT-PCR aplicada es una PCR a tiempo final no cuantitativa, donde la intensidad de la banda del producto amplificado no depende sólo de la cantidad de molde inicial, sino de factores adicionales como la eficiencia de los oligonucleótidos y de la reacción de amplificación. Puesto que el objetivo de este protocolo era la determinación de la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de holomicina, dicha limitación de la técnica no afecta al resultado, siendo perfectamente válida y resolutive.

Para completar el análisis de la transcripción de la agrupación *hlm*, se analizaron las regiones intergénicas sobre el ARN de la cepa súper productora *S. clavuligerus oppA2::aph*, en las mismas condiciones descritas anteriormente. El resultado, tal como se muestra en la figura 3.12, concluye la existencia de seis transcritos, cuatro de ellos policistrónicos, como resultado preliminar que será posteriormente analizado de forma más exhaustiva (apartado 3.3.2).



**Figura 3.12.** Análisis de la expresión de las regiones intergénicas de la agrupación *hlm*. En la imagen se muestran los genes de la agrupación *hlm* separados en dos partes mediante la imagen //. Las flechas discontinuas indican los posibles transcritos de la agrupación.

En nuestro grupo de investigación se está realizando el análisis de los perfiles de transcripción mediante micromatrices en diversas cepas de *S. clavuligerus* (Álvarez-Álvarez R., comunicación personal), incluida la cepa silvestre, la cepa súper productora *oppA2::aph* y las cepas de producción moderada de holomicina  $\Delta ccaR::tsr$  y  $\Delta claR::aph$ . En estos experimentos en curso no están representados todos los genes que forman parte de la agrupación génica *hlm* ya que dichas micromatrices no se realizaron con el genoma completamente secuenciado de *S. clavuligerus*, existiendo únicamente datos referentes a los genes *hlmA*, *B*, *C*, *D*, *F*, *G*, *I* y *M*. A pesar de ello, los resultados de estos análisis con micromatrices se correlacionan perfectamente con los datos obtenidos mediante los análisis de RT-PCR realizados en este estudio. Como se observa en la Tabla 3.2 la mayor parte de estos genes *hlm* se sobre expresan en las tres cepas productoras de holomicina en relación con la cepa silvestre, tanto en la fase

de crecimiento exponencial como en la fase estacionaria. Los genes *hlm* se expresaron entre 7 y 172 veces más en la cepa mutante *oppA2::aph* que en la cepa silvestre, entre 1 y 51 veces más en el mutante  $\Delta$ *clara::aph* que en la cepa silvestre, y entre 2 y 69 veces más en la cepa  $\Delta$ *ccaR::tsr* que en la cepa silvestre, dependiendo del gen analizado en cada caso. Por otro lado, la expresión de estos genes es menor en las cepas de producción moderada de holomicina  $\Delta$ *ccaR::tsr* y  $\Delta$ *clara::aph* que en la cepa súper productora *oppA2::aph*, lo que se correlaciona con el nivel de producción de holomicina observado en las tres cepas (de la Fuente *et al.*, 2002).

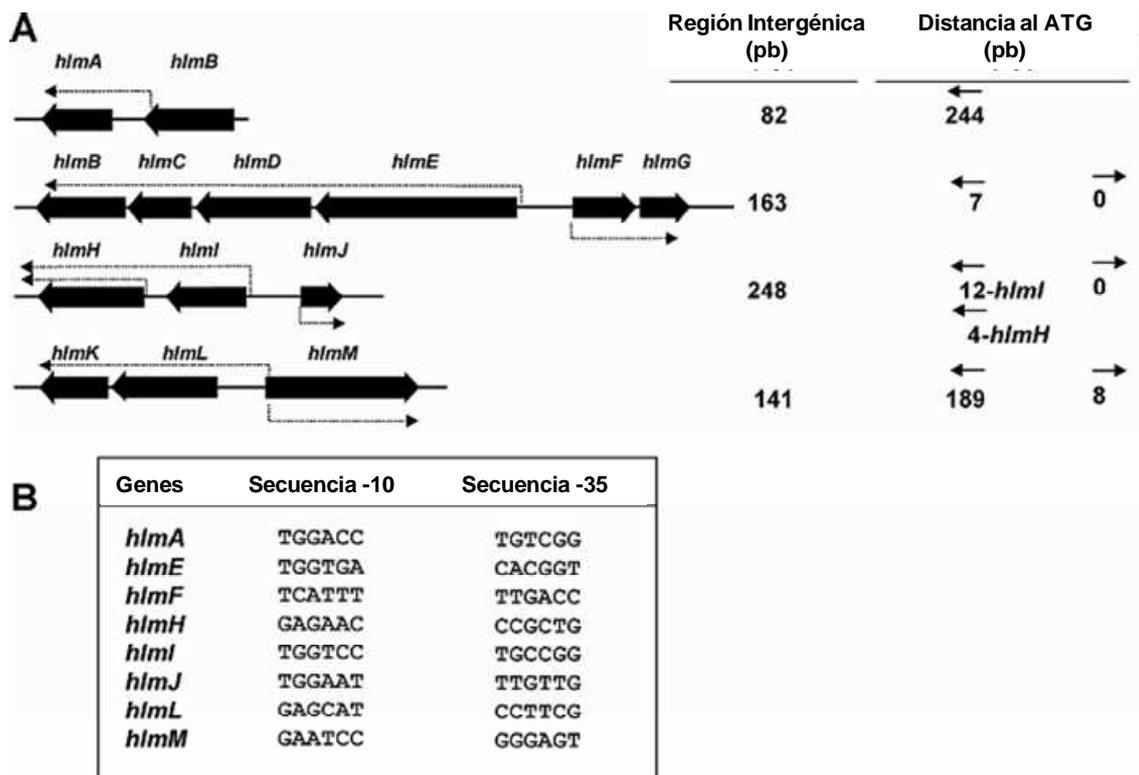
Genes	<i>S. clavuligerus oppA2::aph</i>						<i>S. clavuligerus Δclara::aph</i>						<i>S. clavuligerus ΔccaR::tsr</i>					
	Fase exponencial			Fase estacionaria			Fase exponencial			Fase estacionaria			Fase exponencial			Fase estacionaria		
	Mc	Δ	Fdr	Mc	Δ	Fdr	Mc	Δ	Fdr	Mc	Δ	Fdr	Mc	Δ	Fdr	Mc	Δ	Fdr
<i>hlmA</i>	6.90	119	1.81E <sup>-36</sup>	7.43	172	1.81E <sup>-36</sup>	5.69	51	1.17E <sup>-24</sup>	2.34	5	8.86E <sup>-08</sup>	5.95	62	1.14E <sup>-28</sup>	4.41	21	1.81E <sup>-19</sup>
<i>hlmB</i>	6.84	114	1.29E <sup>-36</sup>	7.35	163	1.29E <sup>-36</sup>	5.63	49	9.55E <sup>-25</sup>	2.17	4	3.98E <sup>-07</sup>	6.03	65	1.19E <sup>-29</sup>	4.60	24	5.13E <sup>-21</sup>
<i>hlmC</i>	6.90	119	5.72E <sup>-31</sup>	7.28	155	5.72E <sup>-31</sup>	5.62	49	2.17E <sup>-20</sup>	2.24	5	6.02E <sup>-06</sup>	6.11	69	4.10E <sup>-25</sup>	4.39	21	3.71E <sup>-16</sup>
<i>hlmD</i>	6.91	120	9.96E <sup>-40</sup>	7.16	143	9.96E <sup>-40</sup>	5.52	46	1.43E <sup>-27</sup>	2.21	4	1.34E <sup>-08</sup>	6.11	69	5.48E <sup>-34</sup>	4.07	17	1.39E <sup>-20</sup>
<i>hlmF</i>	6.22	74	1.17E <sup>-31</sup>	6.80	111	1.17E <sup>-31</sup>	5.22	37	9.02E <sup>-21</sup>	3.05	8	8.25E <sup>-11</sup>	5.47	44	1.93E <sup>-24</sup>	3.83	14	4.35E <sup>-15</sup>
<i>hlmG</i>	6.10	68	2.38E <sup>-41</sup>	6.48	89	2.38E <sup>-41</sup>	5.11	34	1.28E <sup>-29</sup>	3.24	9	2.07E <sup>-18</sup>	5.41	42	9.57E <sup>-35</sup>	3.69	13	8.96E <sup>-22</sup>
<i>hlmI</i>	4.41	21	7.00E <sup>-22</sup>	5.08	33	7.00E <sup>-22</sup>	3.86	14	2.29E <sup>-13</sup>	4.87	29	1.13E <sup>-20</sup>	3.96	15	2.12E <sup>-15</sup>	4.23	19	5.11E <sup>-17</sup>
<i>hlmM</i>	2.85	7	1.51E <sup>-09</sup>	3.23	9	1.51E <sup>-09</sup>	0.99	2	1.21E <sup>-03</sup>	-0.15	1	8.15E <sup>-02</sup>	2.01	4	2.58E <sup>-04</sup>	1.36	2	8.00E <sup>-03</sup>

**Tabla 3.2. Análisis de la expresión, mediante micromatrices, de la agrupación *hlm* en tres cepas de *S. clavuligerus* productoras de holomicina frente a la cepa silvestre.** El ARN fue extraído de células crecidas en medio SA, tanto en la fase exponencial como en la fase estacionaria de cada cultivo. **Mc** indica en valor numérico cuánta diferencia hay entre dos condiciones experimentales, en este caso entre cada cepa mutante y la cepa silvestre (dado por la ecuación  $[\log_2(\text{Cy3/Cy5})]_{\text{cepa mutante}} - [\log_2(\text{Cy3/Cy5})]_{\text{cepa silvestre}}$ ). **Δ** indica el número de veces que aumenta la transcripción del gen en cuestión en la cepa mutante en relación con la cepa silvestre. **Fdr** indica la tasa de error. Modificado de Robles-Reglero *et al.* 2013.

En el caso de los genes *hlmA*, B, C, F, G e I, los datos de las micromatrices concuerdan perfectamente con el análisis visual llevado a cabo mediante RT-PCR (la expresión es mucho mayor en la cepa mutante *oppA2::aph* que en la cepa silvestre). En el caso de *hlmD*, en el análisis mediante RT-PCR se observa una expresión a niveles parecidos, aunque ligeramente superior para la cepa *oppA2::aph*, (figura 3.11) y sin embargo en las micromatrices se obtuvo una sobreexpresión en la cepa *oppA2::aph* frente a la cepa silvestre de 120-143 veces. La expresión de la transcripción del regulador de tipo LuxR (*hlmM*), que en los análisis de RT-PCR se muestra a niveles parecidos en ambas cepas, aumentó entre 7 y 9 veces en la cepa mutante *oppA2::aph* frente a la cepa silvestre.

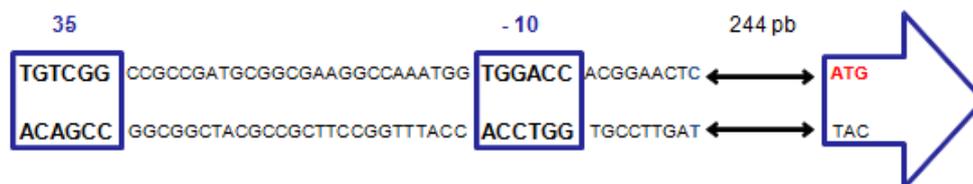
### **3.3.2. Análisis del inicio de transcripción de la agrupación *hlm* mediante RACE**

Una vez analizada la expresión génica de la agrupación *hlm*, se procedió a identificar mediante RACE el sitio de inicio de la transcripción en cada caso (sitio +1). La obtención de una única señal de amplificación descartó la existencia de sitios de inicio de la transcripción adicionales a los obtenidos en análisis preliminares mediante RT-PCR. Una vez establecidas las posiciones +1, se procedió a la identificación de las cajas -10 y -35 en cada uno de los promotores, empleando las matrices clásicas de búsqueda de secuencias promotoras en *Streptomyces* (Bourn y Babb, 1995), incorporadas en una hoja de cálculo (Antonio Rodríguez, comunicación personal). Estas *matrices de peso* se fundamentan en el alineamiento de promotores experimentalmente comprobados otorgando puntuaciones a las posibles cajas -10 y -35 presentes en las secuencias analizadas, puntuaciones cuyo valor se vuelve más positivo a medida que las cajas hipotéticas presentes en la secuencia analizada aumentan su parecido con las secuencias de las cajas consenso, o más negativas a medida que se alejan de ellas. El conjunto de los datos obtenidos para cada promotor se recogen en la figura 3.13.



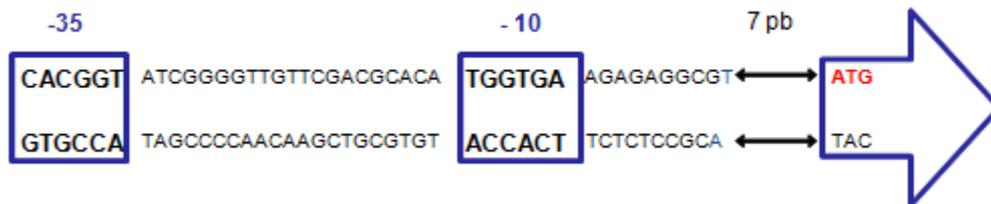
**Figura 3.13. Análisis del inicio de transcripción de la agrupación *hlm* mediante RACE. (A)** Regiones intergénicas estudiadas. En el lado izquierdo se muestran los genes y los transcritos detectados mediante RACE. En el lado derecho se indican las posibles regiones intergénicas putativas y las distancias (pb) al codón de inicio ATG del transcrito. La orientación de la transcripción se indica mediante flechas. **(B)** Secuencias -10 y -35 por delante del punto de inicio de transcripción detectado en los genes *hlm*. Modificado de Robles-Reglero *et al.* 2013.

El sitio de inicio de transcripción para *hlmA* se encuentra situado en un nucleótido de citosina 244 pares de bases corriente arriba del codón ATG. Exactamente 8 pares de bases por delante de este sitio +1 se encontró una caja -10 (TGGACC), con una puntuación de 3,2 y 40 pares de bases más arriba una caja -35 (TGTCGG) con una puntuación de 1,34 (figura 3.14).



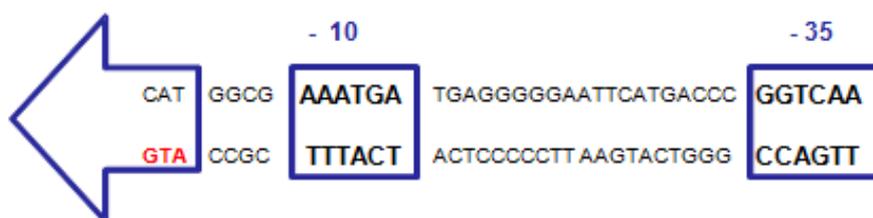
**Figura 3.14. Análisis del inicio de transcripción del gen *hlmA* mediante RACE.** La flecha indica la dirección 5'→ 3' del gen. En los recuadros azules se muestran las posibles cajas -10 y -35 encontradas. En rojo se encuentra marcado el codón de inicio y en azul el nucleótido situado en la posición +1.

En el caso del policistrón *hlmB-E* (formado por los genes *hlmB*, *hlmC*, *hlmD* y *hlmE*), el sitio de inicio de transcripción se encuentra situado en una timina a 16 pb hacia la derecha del codón de inicio ATG anotado para el gen *hlmE*. Esto nos lleva a una nueva anotación del gen 24 pb hacia la derecha del codón de inicio ATG anotado anteriormente. En esta nueva anotación el inicio de transcripción se encuentra a 7 pb de distancia. Exactamente 9 pares de bases por delante de este sitio +1 se encontró una caja -10 (TGGTGA), con una puntuación de 2,3 y 36 pares de bases más arriba una caja -35 (CACGGT) con una puntuación de 1,2 (figura 3.15).



**Figura 3.15. Análisis del inicio de transcripción del policistrón *hlmB-E* mediante RACE.** La flecha indica la dirección 5' → 3' del gen. En los recuadros azules se muestran las posibles cajas -10 y -35 encontradas. En rojo se encuentra marcado el codón de inicio y en azul el nucleótido situado en la posición +1.

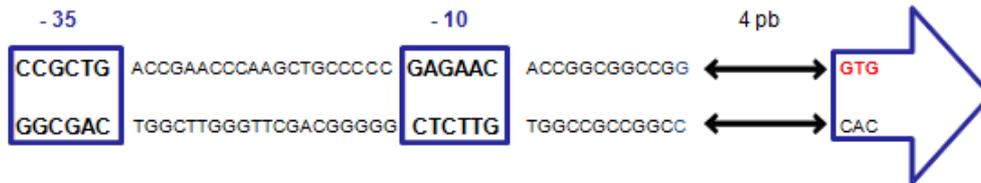
En el caso del policistrón *hlmFG* (formado por los genes *hlmF* y *hlmG*), el sitio de inicio de transcripción se encuentra situado en la misma adenina del codón de inicio ATG del gen *hlmF*. Estos transcritos corresponden a transcritos sin región líder (Moll *et al.*, 2002; Moll *et al.*, 2004). Exactamente 4 pb por delante de este sitio +1 se encontró una caja -10 (TCATTT), con una puntuación de 2,7 y 36 pares de bases más arriba una caja -35 (TTGACC) con una puntuación de 2,8 (figura 3.16).



**Figura 3.16. Análisis del inicio de transcripción del policistrón *hlmFG* mediante RACE.** La flecha indica la dirección 5' → 3' del gen. En los recuadros azules se muestran las posibles cajas -10 y -35 encontradas. En rojo se encuentra marcado el codón de inicio cuya adenina corresponde a la posición +1.

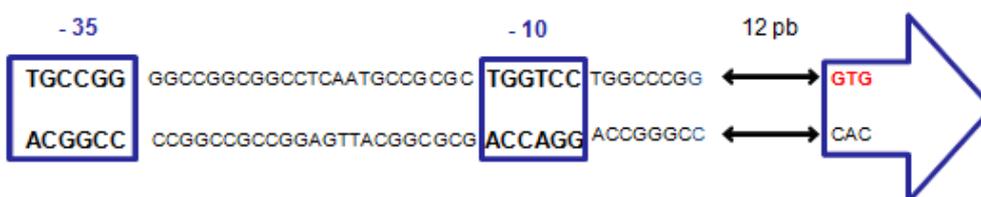
En el caso del gen *hlmH*, la presencia de señal de amplificación para la región intergénica mediante RT-PCR sugieren una co-transcripción con el gen *hlmI*; mediante RACE se observan dos señales de amplificación, por lo que el gen *hlmH* también podría expresarse de

forma individual. El sitio de inicio de transcripción individual se encuentra situado en una guanina a 58 pb hacia la derecha del codón de inicio ATG del gen *hlmH* anotado. Esto nos lleva a una nueva anotación del gen 63 pb hacia abajo del codón de inicio ATG anotado anteriormente. Por tanto, el inicio de transcripción se encuentra en dicha guanina 4 pb antes del nuevo codón de inicio GTG. Exactamente 11 pares de bases por delante de este sitio +1 se encontró una caja -10 (GAGAAC), con una puntuación de 1,1 y 37 pares de bases más arriba una caja -35 (CCGCTG) con una puntuación de 1,4 (figura 3.17).



**Figura 3.17. Análisis del inicio de transcripción individual de *hlmH* mediante RACE.** La flecha indica la dirección 5' → 3' del gen. En los recuadros azules se muestran las posibles cajas -10 y -35 encontradas. En rojo se encuentra marcado el codón de inicio y en azul el nucleótido situado en la posición +1.

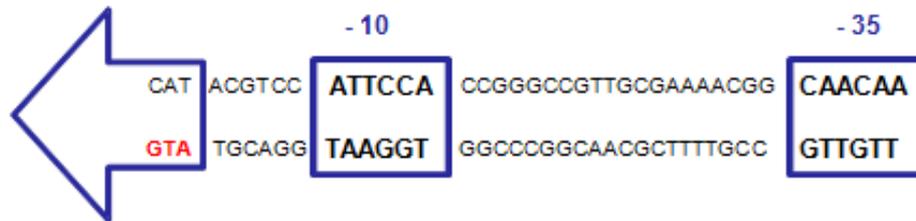
En el caso del policistrón *hlmHI* (formado por los genes *hlmH* y *hlmI*), el sitio de inicio de transcripción se encuentra situado en una guanina a 50 pb hacia la derecha del codón de inicio GTG anotado previamente. Esto conduce a una nueva anotación del gen 63 pb hacia la derecha del antiguo codón de inicio GTG. En esta nueva anotación el inicio de transcripción se encuentra a 12 pb de distancia del nuevo codón de inicio GTG del gen *hlmI*. Exactamente 7 pares de bases por delante de este sitio +1 se encontró una caja -10 (TGGTCC), con una puntuación de 1,5 y 36 pares de bases más arriba una caja -35 (TGCCGG) con una puntuación de 1,4 (figura 3.18).



**Figura 3.18. Análisis del inicio de transcripción del policistrón *hlmHI* mediante RACE.** La flecha indica la dirección 5' → 3' del gen. En los recuadros azules se muestran las posibles cajas -10 y -35 encontradas. En rojo se encuentra marcado el codón de inicio y en azul el nucleótido situado en la posición +1.

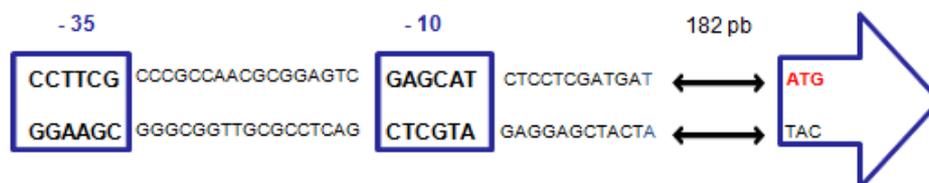
El sitio de inicio de transcripción para *hlmJ* se encuentra situado en la misma adenina del codón de inicio ATG. Estos transcritos se denominan como *transcritos sin región líder* (Moll

*et al.*, 2002; Moll *et al.*, 2004). Exactamente 6 pares de bases por delante de este sitio +1 se encontró una caja -10 (TGG AAT), con una puntuación de 4,0 y 32 pares de bases más arriba una caja -35 (TTGTTG) con una puntuación de 4,2 (figura 3.19).



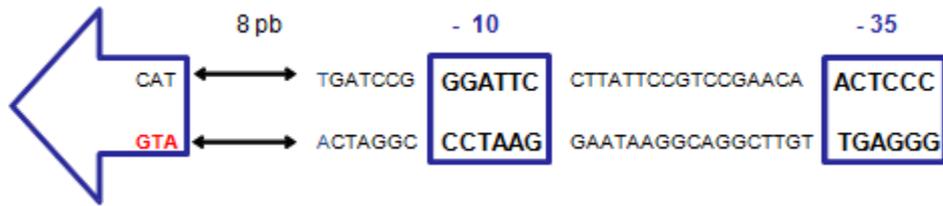
**Figura 3.19. Análisis del inicio de transcripción del gen *hlmJ* mediante RACE.** La flecha indica la dirección 5' → 3' del gen. En los recuadros azules se muestran las posibles cajas -10 y -35 encontradas. En rojo se encuentra marcado el codón de inicio cuya adenina corresponde a la posición +1.

En el caso del policistrón *hlmKL* (formado por los genes *hlmK* y *hlmL*), el sitio de inicio de transcripción se encuentra situado en una timina a 182 pb del codón de inicio ATG del gen *hlmL*. Exactamente 11 pares de bases por encima de este sitio +1 se encontró una caja -10 (GAGCAT), con una puntuación de 3,1 y 34 pares de bases más arriba una caja -35 (CCTTCG) con una puntuación de 1,2 (figura 3.20).



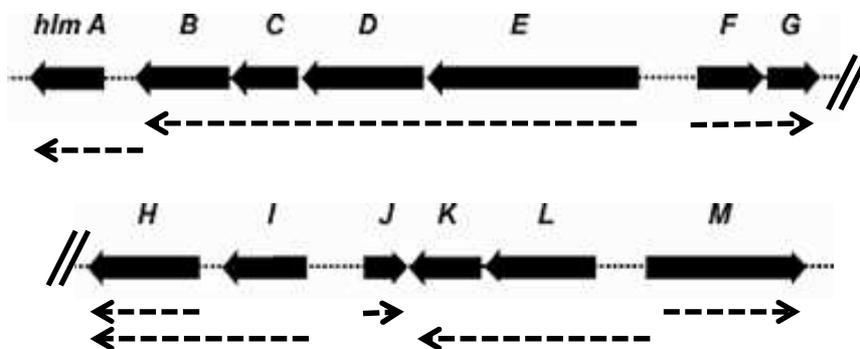
**Figura 3.20. Análisis del inicio de transcripción del policistrón *hlmKL* mediante RACE.** La flecha indica la dirección 5' → 3' del gen. En los recuadros azules se muestran las posibles cajas -10 y -35 encontradas. En rojo se encuentra marcado el codón de inicio y en azul el nucleótido situado en la posición +1.

El sitio de inicio de transcripción para *hlmM* se encuentra situado en una adenina 42 pb hacia la derecha del codón de inicio ATG anotado. Esto conduce a una nueva anotación del gen 51 pb hacia la derecha del codón de inicio ATG anotado previamente. En esta nueva anotación el inicio de transcripción se encuentra a 8 pb de distancia del nuevo codón de inicio ATG. Exactamente 6 pares de bases por delante de este sitio +1 se encontró una caja -10 (GAATCC), con una puntuación de 2,2 y 29 pares de bases más arriba una caja -35 (GGGAGT) con una puntuación de 1,2 (figura 3.21).



**Figura 3.21. Análisis del inicio de transcripción del gen *hlmM* mediante RACE.** La flecha indica la dirección 5' → 3' del gen. En los recuadros azules se muestran las posibles cajas -10 y -35 encontradas. En rojo se encuentra marcado el codón de inicio y en azul el nucleótido situado en la posición +1.

Gracias a este análisis RACE de la transcripción de la agrupación *hlm* se puede concluir que existen ocho transcritos, cuatro de ellos policistrónicos, y no seis como se había obtenido previamente mediante el análisis de las regiones intergénicas (figura 3.22).



**Figura 3.22. Transcritos de la agrupación *hlm*.** En la imagen se muestran los genes y las transcripciones detectadas por RACE de la agrupación *hlm* separados en dos partes mediante la imagen //. Las flechas discontinuas indican los transcritos de la agrupación. La orientación de la transcripción se indica con flechas

La técnica RACE ha permitido corregir el punto de inicio de la transcripción previamente definido de forma incorrecta en cuatro genes: (1) *hlmE*, en el que el codón de inicio ATG es 24 pb interno a la secuencia de codificación anotada en las bases de datos con lo que la proteína que codifica posee 8 aminoácidos menos; (2) *hlmI*, donde el codón de inicio GTG se encuentra 63 pb interno a la secuencia anotada en las bases de datos, así la proteína que codifica posee 21 aminoácidos menos; (3) *hlmH*, en la que el codón de inicio GTG se encuentra 63 pb interno a la secuencia de codificación anotada, con lo que la proteína que codifica posee 21 aminoácidos menos y; (4) *hlmM*, en la que el codón de inicio ATG se encuentra 51 pb interno a la secuencia de codificación anotada, lo que indica que la proteína que codifica es 17 aminoácidos más corta.

Resulta también llamativo el hecho de que el gen *hlmJ* y el policistrón *hlmFG* den lugar a transcritos sin secuencia líder. Los ARNm sin secuencia líder carecen de sitio de unión a los ribosomas, por lo que el inicio de su traducción responde a un mecanismo distinto al de los ARNm canónicos basado en el reconocimiento directo por parte del ribosoma del codón de inicio del gen, de manera dependiente del ARNt de iniciación (Moll *et al.*, 2002; Moll *et al.*, 2004; Laursen *et al.*, 2005). Se ha especulado con la posibilidad de que los genes que dan lugar a este tipo de transcritos, dada la particular regulación a la que está sujeta su traducción, estén relacionados con la respuesta de las células a condiciones fisiológicas particulares. En el caso concreto de *Streptomyces* se conocen muchos ARNm sin secuencia líder vinculados a mecanismos de resistencia a antibióticos y al metabolismo secundario (Moll *et al.*, 2002), siendo el gen *phoP* de *S. coelicolor* una de los más paradigmáticos, dada la importancia del regulador global que codifica (Sola-Landa *et al.*, 2005).

### **3.4. Caracterización funcional de genes implicados en la biosíntesis de holomicina**

Para determinar si la agrupación génica contenida en el cósmido D7-8 codifica las enzimas para la biosíntesis de holomicina se llevó a cabo la inactivación génica dirigida de tres de estos genes utilizando el sistema ReDirect<sup>®</sup> (Gust *et al.*, 2002) (ver apartado 2.18).

Debido a que la síntesis de holomicina se lleva a cabo mediante un sistema NRPS, y gracias a la comparación de la secuencia obtenida en las bases de datos, se hallaron dos genes cuyos productos presentaban similitudes con este tipo de enzimas (*hlmE* y *hlmL*) y por ello se convirtieron en dianas de los estudios de funcionalidad. También se convirtieron en dianas del estudio el gen *hlmF* que codifica una proteína que presenta homología con enzimas implicadas en biosíntesis de lantibióticos (familia de péptidos microbianos con una estructura molecular inusual con anillos de azufre y dehidroaminoácidos), el gen *hlmA* que codifica para una acetiltransferasa siendo uno de los posibles últimos pasos de la ruta (de la Fuente *et al.*, 2002) y los dos genes que presentan dominios de regulación en sus secuencias, *hlmJ* y *hlmM*.

El cósmido D7-8 fue seleccionado para llevar a cabo la delección de los genes mediante el sistema ReDirect<sup>®</sup> debido a la localización centrada de la agrupación génica en el fragmento de ADNt incorporado por el cósmido. La cepa indicada para la inactivación de esos genes en *S. clavuligerus* fue la cepa *oppA2::aph* ya que es la cepa súper productora de holomicina.

Cada delección génica precisa del diseño de cebadores específicos para la secuencia a deleccionar (ver apartado 2.18.2) de forma que el fragmento amplificado contenga el casete de resistencia ( $Apr^R$ -*oriT*) que se va a utilizar en la sustitución de los genes de interés en el cósmido D7-8, flanqueado por secuencias homólogas a las secuencias adyacente al gen que se va a deleccionar.

Debido a la difícil manipulación genética que presenta el mutante súper productor de holomicina *S. clavuligerus oppA2::aph*, del total de los objetivos planteados inicialmente, se obtuvieron resultados en la inactivación de los genes *hlmA*, *hlmE* y *hlmF*.

### 3.4.1. Caracterización funcional del gen *hlmA*

- **Inactivación del gen *hlmA***

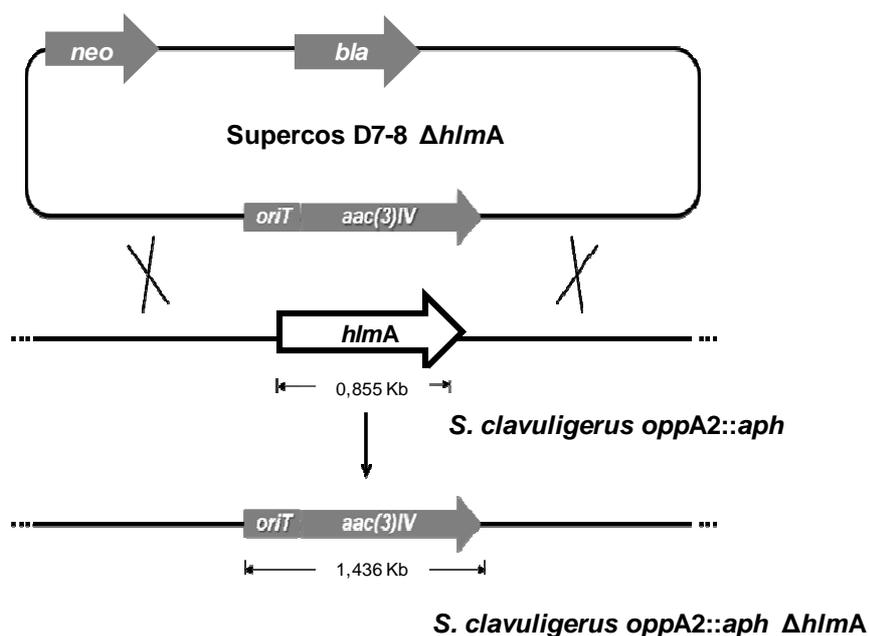
El gen *hlmA*, (855 pb), anotado inicialmente como SCLAV\_5267 (<http://strepdb.streptomyces.org.uk>) o SSCG\_03483 (<https://olive.broadinstitute.org>) codifica una acetiltransferasa formada por 284 aminoácidos.

Para la obtención del mutante  $\Delta hlmA$  se diseñaron los cebadores específicos UP $\Delta$ 03483 y DW $\Delta$ 03483. Esta pareja de cebadores se utilizaron en reacciones de PCR con una polimerasa de alta fidelidad de copia, GoTaq<sup>®</sup>, sobre una banda HindIII/EcoRI del plásmido pIJ773 de 1382 pb como ADN molde. Una vez comprobada mediante electroforesis en agarosa la ausencia de bandas inespecíficas, el producto de PCR, (tamaño final de 1436 pb) fue purificado directamente con el kit comercial *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*.

Posteriormente, el producto de PCR se utilizó para la sustitución del gen *hlmA* localizado en el cósmido D7-8 mediante recombinación doble en la cepa de *E. coli* BW25113/pIJ790 previamente transformada con el cósmido. Es importante analizar mediante electroforesis en agarosa que las colonias obtenidas han incorporado correctamente el cósmido (si el cósmido contiene zonas homólogas es posible que se produzcan eventos de recombinación en el mismo) y la presencia del plásmido pIJ790 (esencial para el proceso de recombinación).

Las colonias de *E. coli* BW25113/pIJ790/D7-8 fueron electroporadas con 100-200 ng del producto de PCR, siguiendo los parámetros descritos en materiales y métodos (ver

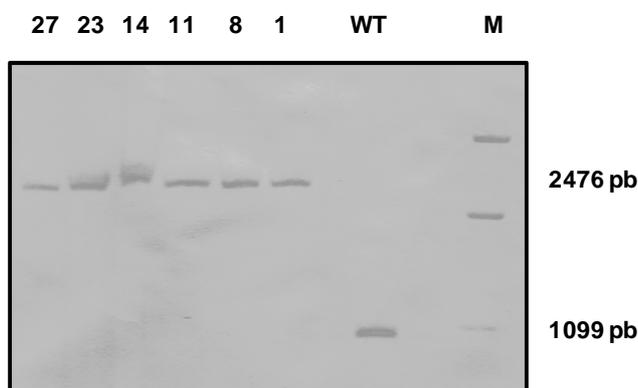
apartado 2.18.5). La sustitución del gen *hlmA* por el casete de resistencia se seleccionó mediante resistencia a apramicina de las colonias (figura 3.23). Las construcciones obtenidas se analizaron mediante PCR utilizando los cebadores exDir03483 y exRev03483 externos a los genes a deletar y una pareja de cebadores control formada por un cebador interno al gen de resistencia a la apramicina *Apratotal* y otro externo al gen *hlmA* (exRev03483). La PCR de comprobación realizada con los cebadores externos debe amplificar un fragmento de un tamaño mayor en los cósmidos recombinantes ( $\Delta hlmA$ ) respecto al cósmido parental, mientras que la amplificación a partir de los cebadores control, sólo se debe amplificar sobre los cósmidos recombinantes.



**Figura 3.23. Esquema de la recombinação en la formación del mutante  $\Delta hlmA$ .** En la imagen se presenta un esquema de la recombinação positiva entre el cósmido D7-8  $\Delta hlmA$  y el genoma de *S. clavuligerus*. Las aspas indican cada zona de recombinação. Se señalan en gris los genes de resistencia a antibióticos que van a permitir la selección de los exconjugantes: *acc(3)IV* (gen de resistencia a apramicina), *neo* (gen de resistencia a kanamicina) y *bla* (gen de resistencia a ampicilina). También se muestran los tamaños, tanto del gen a deletar como del inserto sustituyente del mismo.

Tras la conjugación de *E. coli* ET13567/pUZ8002/D7-8  $\Delta hlmA$  con la cepa *S. clavuligerus oppA2::aph*, se obtuvieron seis exconjugantes resistentes a apramicina, comprobando la recombinação mediante PCR con los cebadores anteriormente indicados. Adicionalmente, estos exconjugantes fueron analizados mediante hibridación de tipo Southern (ver apartado 2.14), empleando cebadores que hibridan en secuencias corriente arriba y corriente abajo al gen *hlmA* (L-Southern-03483 y R-Southern-03483). El patrón de hibridación observado en cada

digestión de ADN genómico de los exconjugantes fue el esperado para la doble recombinación y diferente al de la cepa silvestre (figura 3.24).



**Figura 3.24. Comprobación mediante hibridación tipo Southern de la delección de  $\Delta hlmA$  en *S. clavuligerus oppA2::aph*.** En la imagen se muestran los patrones de hibridación de ADN total digerido con *AplI* de los mutantes delecionados  $\Delta hlmA$  (**1, 8, 11, 14, 23 y 27**) en comparación con la cepa parental *S. clavuligerus* (**WT**) utilizando como sonda un fragmento amplificado mediante PCR usando como cebadores *exDir03483* y *exRev03483*. A la derecha de la imagen se indican los tamaños de las bandas de hibridación. El marcador de tamaño molecular (**M**) corresponde al *DNA Molecular Weight Marker II, Digoxigenin-labeled*.

- **Producción de holomicina en *S. clavuligerus oppA2::aph ΔhlmA***

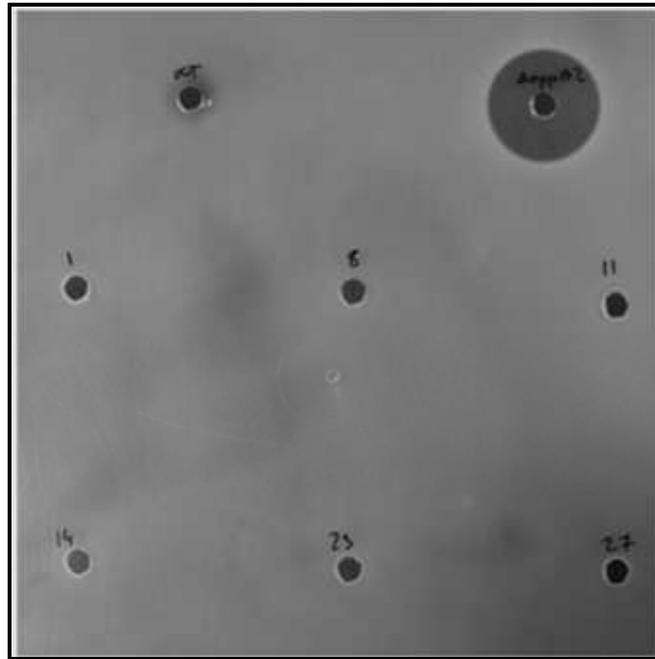
Con el fin de determinar si el gen *hlmA* ejerce alguna función en la biosíntesis de holomicina en *S. clavuligerus*, se llevó a cabo el análisis de la producción de holomicina en los seis exconjugantes *S. clavuligerus oppA2::aph ΔhlmA*.

El crecimiento de todas las cepas, tanto de los seis clones *oppA2::aph ΔhlmA*, la cepa *S. clavuligerus oppA2::aph* (súper productora de holomicina) y la cepa silvestre ATCC 27064 (no productora de holomicina), se desarrolló en medio definido SA. Se recogieron muestras a las 24, 36, 48, 60 y 72 horas para poder establecer diferencias temporales en el perfil de producción.

La figura 3.25 muestra el bioensayo realizado sobre las muestras recogidas a las 48 horas frente a *Micrococcus luteus* ATCC 9341 que permitió detectar la ausencia de holomicina en los seis clones mutantes  $\Delta hlmA$ .

El análisis mediante HPLC demostró una ligera producción de holomicina a partir de las 48 horas en dos de los seis mutantes  $\Delta hlmA$  (11 y 27), pero no se detectó en ninguno de los

casos la presencia de holotina (figura 3.26). Esta ligera producción de holomicina, tan sólo detectada mediante HPLC, puede deberse a la actividad inespecífica de otras acetiltransferasas ya que en el genoma de *S. clavuligerus* están descritas unas 49 en total y, puesto que todos los exconjugantes presentan la delección completa del gen *hlmA*, deberían de comportarse de la misma manera.



**Figura 3.25. Bioensayo frente a *Micrococcus luteus* ATCC 9341:** *S. clavuligerus oppA2::aph* (fila superior a la derecha); *S. clavuligerus* ATCC 27064 (fila superior a la izquierda) y cepas delecionadas  $\Delta hlmA$  (de izquierda a derecha 1, 8 y 11 en la fila del medio y 14, 23 y 27 en la fila inferior).

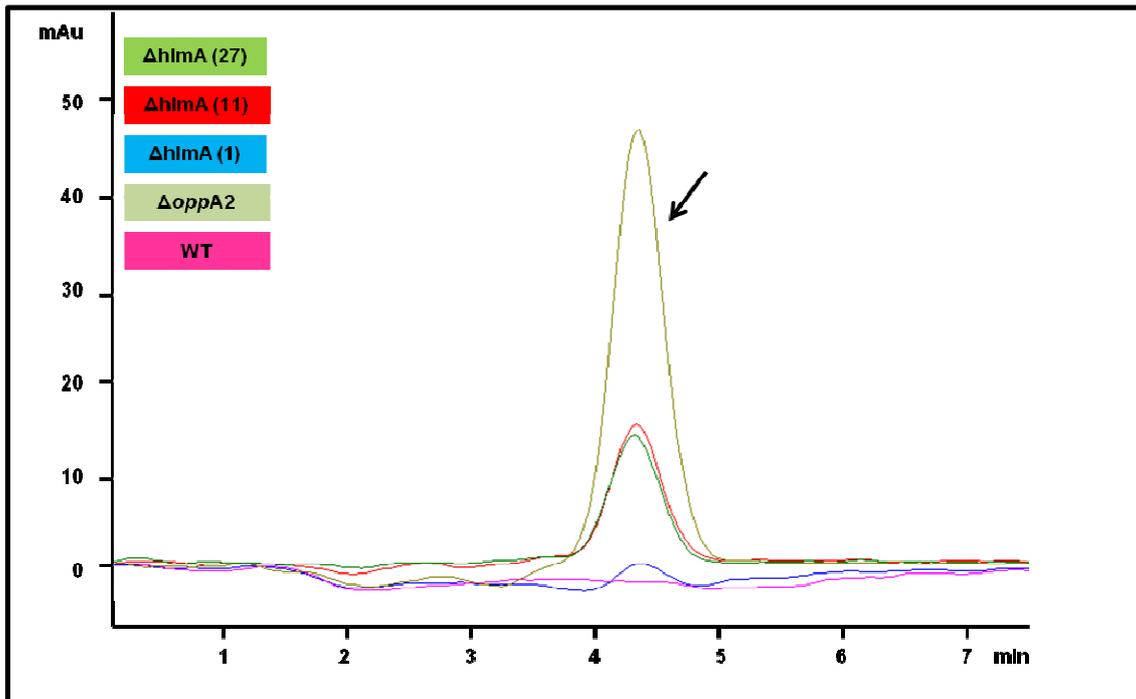
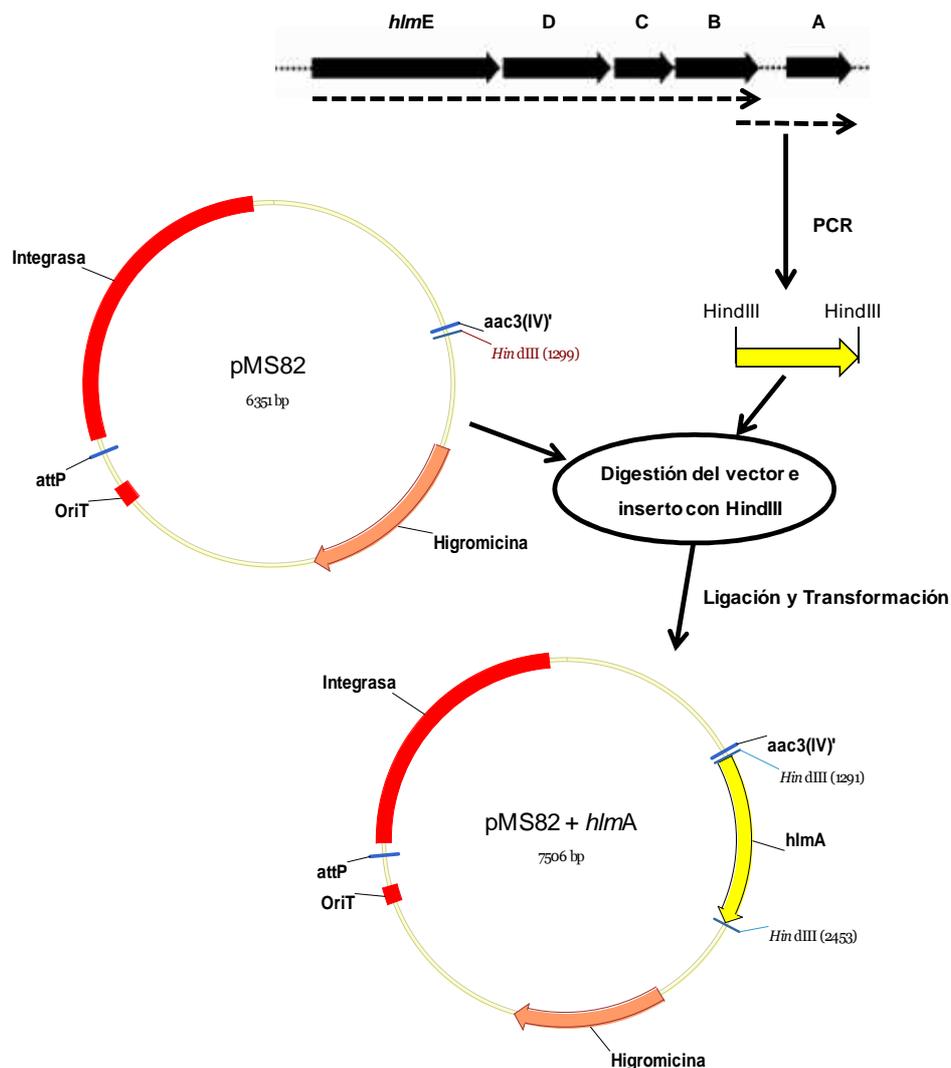


Figura 3.26. Cromatograma de los caldos de cultivo de las distintas cepas a las 48 horas. En la esquina superior izquierda, cuadros explicativos de la correspondencia entre cepas analizadas y líneas en el cromatograma. La flecha negra indica el pico correspondiente a la holomicina.

- **Complementación de la cepa *S. clavuligerus oppA2::aph ΔhlmA***

La construcción para complementar el mutante  $\Delta hlmA$  se realizó en el vector pMS82, plásmido integrativo conjugativo que contiene el gen de resistencia a higromicina (*hyg*) para selección de los mutantes. El gen *hlmA*, junto con su región promotora nativa (ver apartado 3.4.2), se amplificó en un fragmento de 1155 pb a partir de los cebadores Dir-comp83 y Rev-comp83. Estos cebadores presentan en sus extremos 5' sendos sitios de restricción HindIII, lo que permitió la inserción del producto de PCR en el sitio HindIII presente en el plásmido pMS82. Se obtuvo así la construcción pMS82+*hlmA* (figura 3.27), que finalmente se introdujo mediante conjugación en la cepa *S. clavuligerus oppA2::aph ΔhlmA*, obteniéndose la cepa *S. clavuligerus oppA2::aph ΔhlmA* pMS82+*hlmA*. Para corroborar la presencia de este fragmento de PCR en el genoma de los exconjugantes, se llevó a cabo una hibridación de Southern, en la que el ADN genómico digerido con HindIII se hibridó con una sonda correspondiente al fragmento *hlmA* de 1155 pb previamente marcado con digoxigenina.

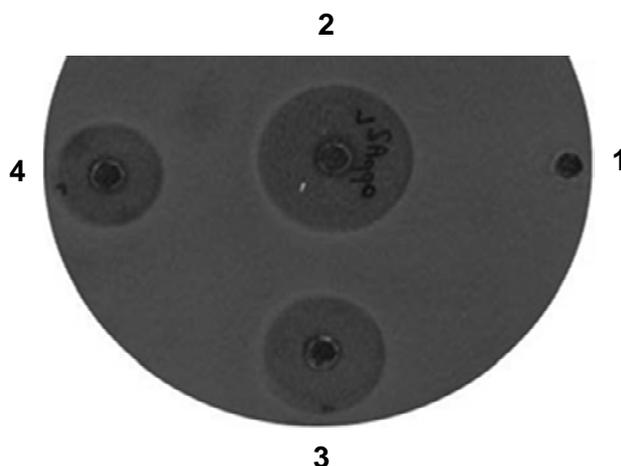


**Figura 3.27.** Esquema del proceso de construcción del plásmido pMS82+hlmA. Los sitios de restricción HindIII situados en los extremos del producto de PCR fueron introducidos en el diseño de los cebadores.

Se obtuvieron dos exconjugantes positivos con los que se llevó a cabo el análisis de la producción de holomicina. El crecimiento de las cepas *S. clavuligerus oppA2::aph ΔhlmA* pMS82+hlmA, *S. clavuligerus oppA2::aph* (súper productora de holomicina) y *S. clavuligerus* ATCC 27064 (no productora de holomicina), se desarrolló en medio definido SA. Se tomaron muestras a las 24, 36, 48, 60 y 72 horas para poder observar diferencias de producción en el tiempo.

Como se puede observar en la figura 3.28, los bioensayos realizados frente a *M. luteus* revelaron que, en la cepa *S. clavuligerus oppA2::aph ΔhlmA* pMS82+hlmA, la introducción de una copia de *hlmA* bajo el control de su promotor nativo provoca la restauración de la producción de holomicina. Este hecho demuestra que la mutación de *hlmA* en *S. clavuligerus*

*oppA2::aph ΔhlmA* es el único factor causante de la pérdida de la producción de holomicina observada, descartándose cualquier efecto polar de la mutación o algún otro tipo de defecto en la agrupación génica de biosíntesis del compuesto. Este resultado demuestra que el gen *hlmA* lleva a cabo una función esencial para la producción de holomicina.



**Figura 3.28. Bioensayo frente a *M. luteus* para el estudio de la complementación del mutante *S. clavuligerus oppA2::aph ΔhlmA*.** 1: cultivo de *S. clavuligerus* ATCC 27064. 2: cultivo de *S. clavuligerus oppA2::aph*. 3 y 4: cultivos de *S. clavuligerus oppA2::aph ΔhlmA* pMS82+*hlmA* (cepa complementada). Se aprecia con toda claridad la restauración del halo de inhibición provocado por la presencia de holomicina en las muestras de los cultivos de los tres clones pertenecientes a la cepa complementada.

### 3.4.2. Caracterización funcional del gen *hlmF*

- **Inactivación del gen *hlmF***

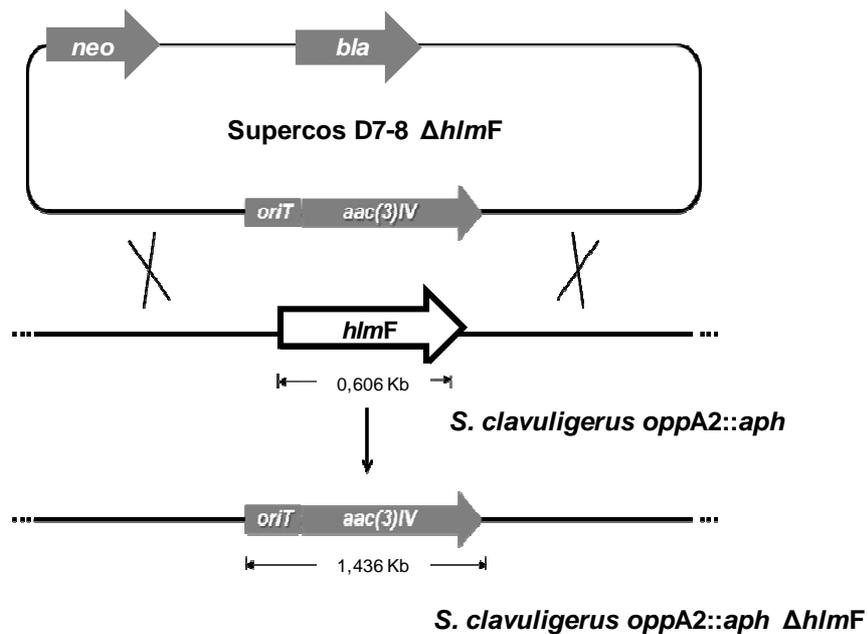
El gen *hlmF* (606 pb), codifica una proteína formada por 202 aminoácidos similar a las proteínas de biosíntesis de lantibióticos, familia de péptidos microbianos de estructura molecular inusual con anillos de azufre y dehidroaminoácidos. Concretamente, la proteína codificada por el gen *hlmF* posee un dominio perteneciente a la superfamilia de las flavoproteínas, región característica para la descarboxilación de cisteína. Este gen fue anotado inicialmente como SCLAV\_5272 (<http://strepdb.streptomyces.org.uk>) y SSCG\_03489 (<https://olive.broadinstitute.org>).

Para la obtención del mutante  $\Delta hlmF$  se diseñaron los cebadores específicos ReD-Di03489 y ReD-Re03489, empleados en reacciones de PCR junto a una polimerasa de alta fidelidad de copia, *GoTaq*<sup>®</sup>, sobre una banda HindIII/EcoRI del plásmido pIJ773 de 1382 pb

como ADN molde. Una vez verificada la ausencia de amplificaciones inespecíficas mediante electroforesis en agarosa, el producto de PCR (1436 pb), fue purificado directamente con el kit comercial *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*.

Posteriormente, este producto de PCR se utilizó para la sustitución del gen *hlmF* localizado en el cósmido D7-8 mediante recombinación doble en la cepa *E. coli* BW25113/pIJ790 previamente transformada con el cósmido D7-8 de la librería génica de *S. clavuligerus*.

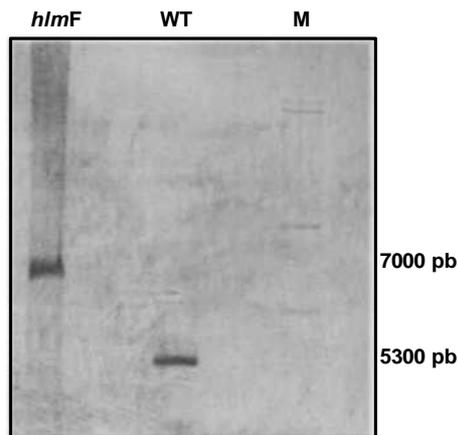
Las colonias de *E. coli* BW25113/pIJ790/D7-8 fueron electroporadas con 100-200 ng del producto de PCR, siguiendo los parámetros descritos en materiales y métodos (ver apartado 2.18.5). Las colonias en las que se produjo la sustitución del gen *hlmF* por el casete de resistencia se seleccionaron por resistencia a apramicina (figura 3.29). Las construcciones obtenidas se analizaron mediante PCR utilizando los cebadores *hlmF* Ext-Dir-89 y Ext-Rev-89 externos al gen y un cebador interno al gen de resistencia a la apramicina Apratotal y otro externo al gen *hlmF* (Ext-Dir-89) como pareja control. La amplificación de un fragmento de mayor tamaño mayor en los cósmidos recombinantes ( $\Delta hlmF$ ) respecto al cósmido parental a partir de los cebadores externos verifica un proceso de sustitución correcto, mientras que los cebadores de la reacción control únicamente producen amplificación en los cósmidos recombinantes.



**Figura 3.29. Esquema de la formación del mutante  $\Delta hlmF$  mediante doble recombinación.**

Esquema de la recombinación positiva entre el cósmido D7-8  $\Delta hlmF$  y el genoma de *S. clavuligerus*. Las aspas indican cada zona de recombinación. Se señalan en gris los genes de resistencia a antibióticos que van a permitir la selección de los exconjugantes: *acc(3)IV* (gen de resistencia a antibióticos que van a permitir la selección de los exconjugantes: *acc(3)IV* (gen de resistencia a apramicina), *neo* (gen de resistencia a kanamicina) y *bla* (gen de resistencia a ampicilina). También se muestran los tamaños, tanto del gen a deletionar como del inserto sustituyente del mismo.

Tras la conjugación de *E. coli* ET13567/pUZ8002/D7-8  $\Delta hlmF$  con la cepa *S. clavuligerus* *oppA2::aph*, se obtuvo un exconjugante resistente a apramicina que se analizó mediante PCR con los cebadores anteriormente indicados para la comprobación de los cósmidos recombinantes y también fue comprobado mediante hibridación de *Southern* (ver apartado 2.14 de materiales y métodos) usando cebadores que anillan en secuencias corriente arriba y corriente abajo al gen *hlmF* (Ext-Dir-89 y Ext-Rev-89). El patrón de hibridación observado en cada digestión de ADN genómico de los exconjugantes fue el esperado para la doble recombinación y diferente al de la cepa silvestre (figura 3.30).



**Figura 3.30. Comprobación mediante hibridación tipo Southern de la delección de  $\Delta hlmF$  en *S. clavuligerus oppA2::aph*.** En la imagen se muestran los patrones de hibridación de ADN total digerido con NcoI del mutante delecionado (*hlmF*) en comparación con la cepa parental *S. clavuligerus* (**WT**) utilizando como sonda un fragmento amplificado mediante PCR usando como cebadores Ext-Dir-89 y Ext-Rev-89. A la derecha de la imagen se indican los tamaños de las bandas de hibridación. El marcador de tamaño molecular (**M**) corresponde al *DNA Molecular Weight Marker II, Digoxigenin-labeled*.

- **Producción de holomicina en *S. clavuligerus oppA2::aph*  $\Delta hlmF$**

Con el fin de determinar si el gen *hlmF* ejerce alguna función sobre la biosíntesis de holomicina en *S. clavuligerus* se llevó a cabo el análisis de la producción de holomicina en la cepa *S. clavuligerus oppA2::aph*  $\Delta hlmF$ .

El crecimiento de las cepas *S. clavuligerus oppA2::aph*  $\Delta hlmF$ , *S. clavuligerus oppA2::aph* (súper productora de holomicina) y *S. clavuligerus* ATCC 27064 (no productora de holomicina), se desarrolló en medio definido SA. Se tomaron muestras a las 24, 36, 48, 60 y 72 horas para poder observar diferencias de producción en el tiempo.

La figura 3.31 muestra el bioensayo frente a *Micrococcus luteus* ATCC 9341 realizado con las muestras tomadas a las 48 horas de cultivo y la determinación de la ausencia de holomicina en el perfil de producción analizada mediante HPLC.

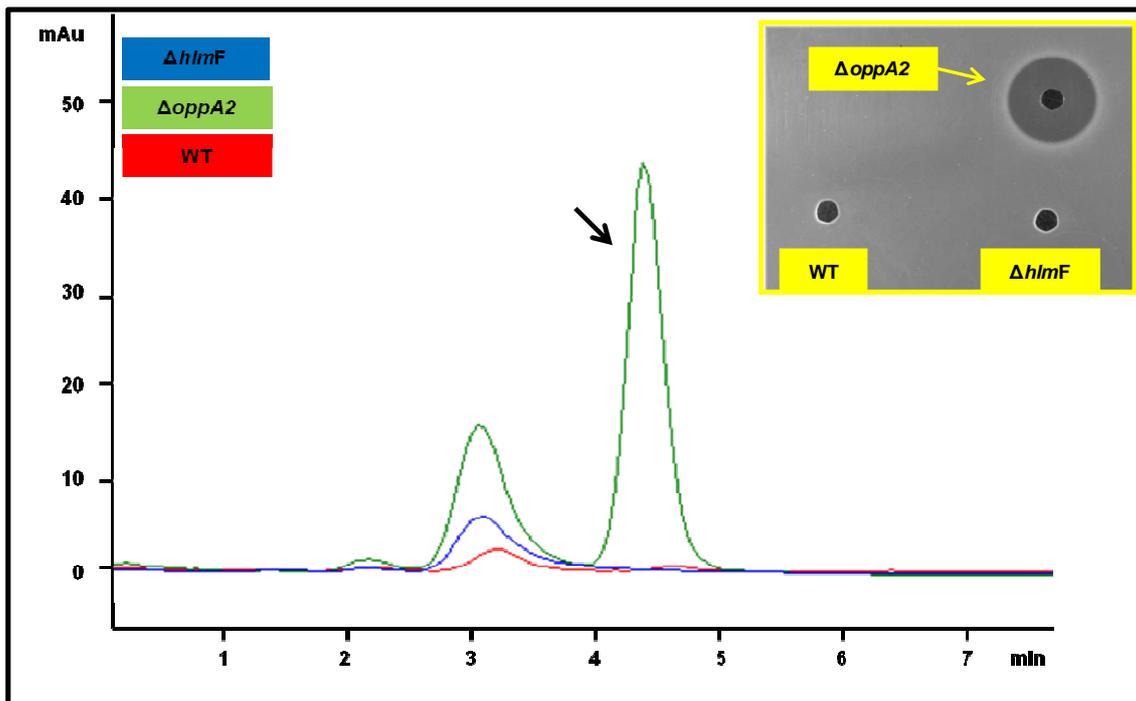
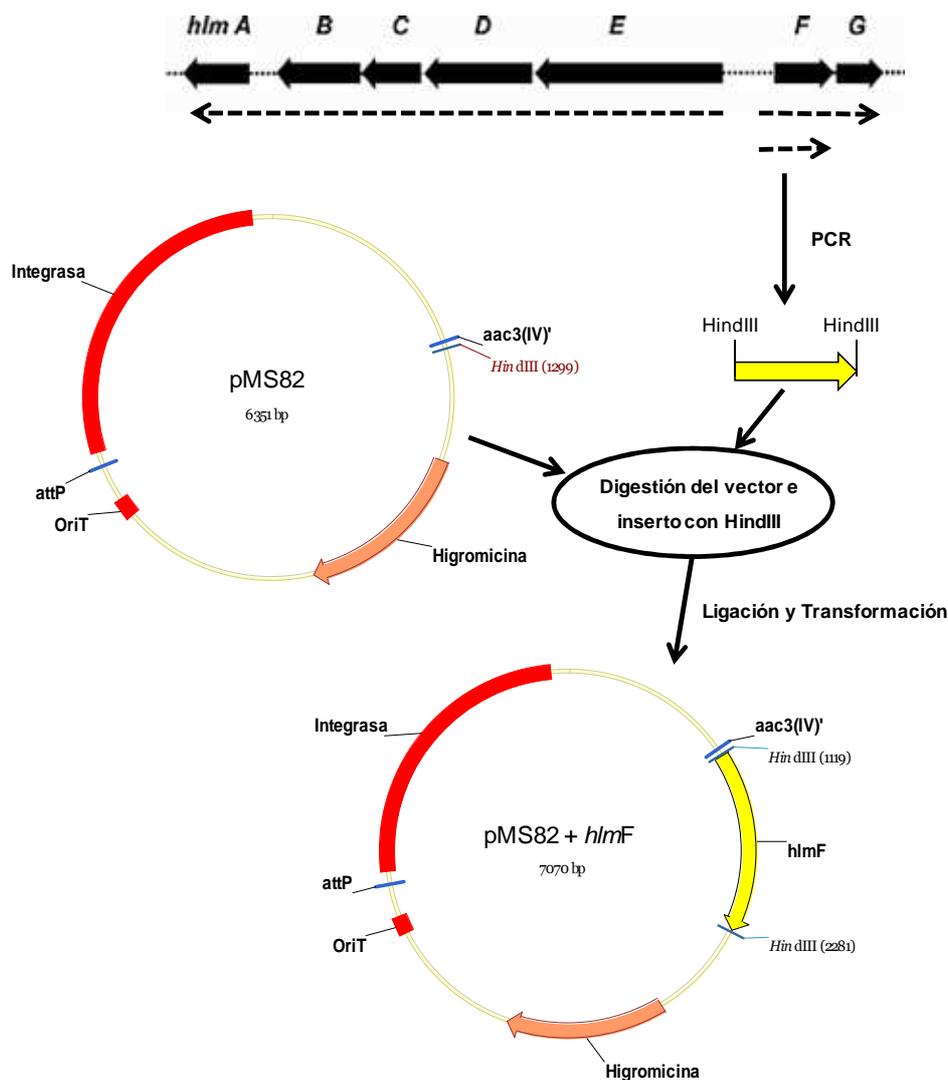


Figura 3.31. En la parte superior derecha se muestra el bioensayo frente a *Micrococcus luteus* ATCC 9341: *S. clavuligerus oppA2::aph* (arriba), la cepa silvestre *S. clavuligerus* ATCC 27064 (WT, abajo-izquierda) y la cepa delecionada  $\Delta hlmF$  (abajo-derecha). En el resto de la imagen se muestra el cromatograma de las tres cepas a las 48 horas: en verde la cepa *S. clavuligerus oppA2::aph*, en rojo la cepa silvestre *S. clavuligerus* ATCC 27064 y en azul la cepa delecionada  $\Delta hlmF$ ; se indica con una flecha negra el pico correspondiente a holomicina.

- **Complementación de la cepa *S. clavuligerus oppA2::aph*  $\Delta hlmF$**

La construcción de complementación se realizó en el vector pMS82, plásmido integrativo conjugativo que posee resistencia a higromicina (*hyg*) necesaria para la selección de los mutantes. El gen *hlmF*, junto con su región promotora nativa (ver apartado 3.4.2), se amplificó mediante PCR empleándose para ellos los cebadores Dir-comp89 y Rev-comp89, obteniéndose un fragmento de 667 pb. Estos cebadores presentan en sus colas 5' sendos sitios de restricción HindIII, lo que permitió la inserción del producto de PCR en el sitio HindIII presente en el plásmido pMS82. Se obtuvo así la construcción pMS82+*hlmF* (figura 3.32), que finalmente se introdujo mediante conjugación en la cepa *S. clavuligerus oppA2::aph*  $\Delta hlmF$ , obteniéndose la cepa *S. clavuligerus oppA2::aph*  $\Delta hlmF$  pMS82+*hlmF*. Para corroborar la presencia de este fragmento de PCR en el genoma de los exconjugantes, se llevó a cabo una hibridación de Southern, en la que el ADN genómico digerido con HindIII se hibridó con una sonda (marcada con digoxigenina).



**Figura 3.32.** Esquema del proceso de construcción del plásmido pMS82+hlmF. Los sitios de restricción HindIII situados en los extremos del producto de PCR fueron introducidos en el diseño de los cebadores.

Se obtuvieron tres exconjugantes positivos con los que se llevó a cabo el análisis de la producción de holomicina. El crecimiento de las cepas *S. clavuligerus oppA2::aph ΔhlmF* pMS82+hlmF, *S. clavuligerus oppA2::aph* (súper productora de holomicina) y *S. clavuligerus* ATCC 27064 (no productora de holomicina), se desarrolló en medio definido SA. Se tomaron muestras a las 24, 36, 48, 60 y 72 horas para poder observar diferencias de producción en el tiempo.

Los bioensayos realizados frente a *M. luteus*, y el análisis mediante HPLC, revelaron que en la cepa *S. clavuligerus oppA2::aph ΔhlmF* pMS82+hlmF, la introducción de una copia de hlmF bajo el control de su promotor nativo no provoca la restauración de la producción de holomicina. Esto puede ser debido a que en el diseño del ReDirect, al seleccionar los

nucleótidos anteriores al codón de inicio, se incluyó parte de la región promotora del gen *hlmF*, más concretamente la posible caja -10. Por este motivo, al complementar el gen en otra región del genoma de la cepa *S. clavuligerus oppA2::aph ΔhlmF*, sigue sin transcribirse el gen *hlmG*, que se co-transcribe junto a *hlmF* según se ha comprobado mediante la técnica RACE (ver apartado 3.3.2).

### 3.4.3. Caracterización funcional del gen *hlmE*

- **Inactivación del gen *hlmE***

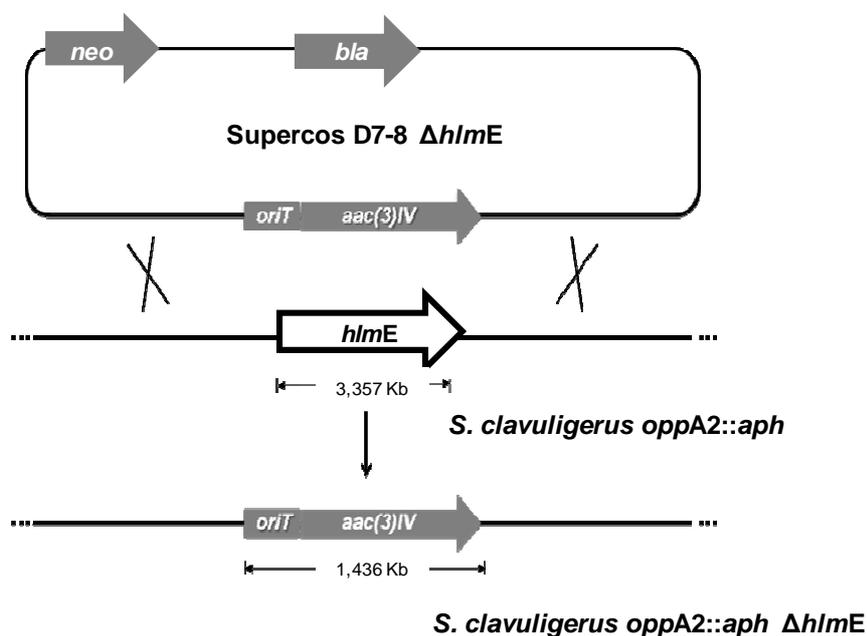
El gen *hlmE* (3357 pb) codifica una proteína del tipo péptido sintetasa no ribosomal formada por 1119 aminoácidos y fue anotado inicialmente como SCLAV\_5271 (<http://strepdb.streptomyces.org.uk>) y SSCG\_03488 (<https://olive.broadinstitute.org>).

Para la obtención del mutante  $\Delta hlmE$  se diseñaron los cebadores específicos ReD-Di03488 y ReD-Re03488. Esta pareja de cebadores se utilizó en reacciones de PCR junto a una polimerasa de alta fidelidad de copia, *GoTaq*<sup>®</sup>, sobre una banda HindIII/EcoRI del plásmido pIJ773 de 1382 pb como ADN molde. Una vez comprobada la ausencia de amplificaciones inespecíficas mediante visualización del producto de la reacción en electroforesis en agarosa, el fragmento amplificado (1436 pb) fue purificado directamente desde la reacción con el kit comercial *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*.

Posteriormente, este producto de PCR se utilizó para la sustitución del gen *hlmE* localizado en el cósmido D7-8 recombinación doble entre el cósmido y el producto de PCR en la cepa *E. coli* BW25113/pIJ790 previamente transformada con el cósmido D7-8 de la librería génica de *S. clavuligerus*.

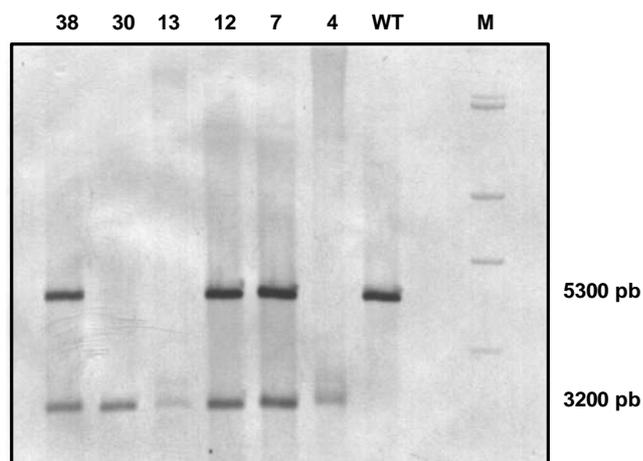
Las colonias de *E. coli* BW25113/pIJ790/D7-8 fueron electroporadas con 100-200 ng del producto de PCR, siguiendo los parámetros descritos en materiales y métodos (ver apartado 2.18.5). Las colonias en las que se produjo la sustitución del gen *hlmE* por el casete de resistencia se seleccionaron por resistencia a apramicina (figura 3.33). Las construcciones obtenidas se analizaron mediante PCR utilizando dos cebadores externos a los genes a delecionar Ext-Dir-88 y Ext-Rev-88 y otra pareja, como control formada por un cebador interno al gen de resistencia a la apramicina Apratotal y otro externo al gen *hlmE* (Ext-Dir-88). Así, si se ha producido la sustitución de forma correcta, la PCR de comprobación realizada con los cebadores externos debe resultar en una banda de un tamaño menor en los cósmidos

recombinantes ( $\Delta hlmE$ ) respecto al cósmido silvestre y usando la segunda combinación de cebadores, como control, sólo se debe obtener banda en los cósmidos recombinantes.



**Figura 3.33. Esquema de la formación del mutante  $\Delta hlmE$  mediante doble recombinación.** En la imagen se presenta un esquema de la recombinación positiva entre el cósmido D7-8  $\Delta hlmE$  y el genoma de *S. clavuligerus*. Las aspas indican cada evento de recombinación. Se señalan en gris los genes de resistencia a antibióticos que van a permitir la selección de los exconjugantes: *acc(3)IV* (gen de resistencia a apramicina), *neo* (gen de resistencia a kanamicina) y *bla* (gen de resistencia a ampicilina). También se muestran los tamaños, tanto del gen a deletar como del inserto sustituyente del mismo.

Tras la conjugación de *E. coli* ET13567/pUZ8002/D7-8  $\Delta hlmE$  con la cepa *S. clavuligerus oppA2::aph*, se obtuvieron seis exconjugantes que se analizaron mediante PCR con los cebadores anteriormente indicados para la comprobación de los cósmidos recombinantes y también fueron comprobados mediante hibridación de tipo Southern (ver apartado 2.14), la cual fue llevada a cabo usando cebadores que anillan en secuencias corriente arriba y corriente abajo al gen *hlmE* (Ext-Dir-88 y Ext-Rev-88). El patrón de hibridación observado en cada digestión de ADN genómico de tres de los exconjugantes fue el esperado para la doble recombinación y diferente al de la cepa silvestre. Los otros tres exconjugantes poseían las dos bandas, tanto la silvestre como la mutante, por lo que habían sufrido un proceso de recombinación simple y eran portadores tanto del gen silvestre como de la resistencia sustituyente (figura 3.34).



**Figura 3.34. Comprobación de la delección de  $\Delta hlmE$  en *S. clavuligerus oppA2::aph* mediante hibridación tipo Southern.** En la imagen se muestran los patrones de hibridación de ADN total digerido con NcoI de los mutantes delecionados  $\Delta hlmE$  (4, 7, 12, 13, 30 y 38) en comparación con la cepa parental *S. clavuligerus* (WT) utilizando como sonda un fragmento amplificado mediante PCR usando como cebadores Ext-Dir-88 y Ext-Rev-88. A la derecha de la imagen se indican los tamaños de las bandas de hibridación. El marcador de tamaño molecular (M) corresponde al *DNA Molecular Weight Marker II, Digoxigenin-labeled*.

- **Producción de holomicina en *S. clavuligerus oppA2::aph*  $\Delta hlmE$**

Con el fin de determinar si el gen *hlmE* ejerce alguna función sobre la biosíntesis de holomicina en *S. clavuligerus* se llevó a cabo el análisis de la producción de holomicina en la cepa *S. clavuligerus oppA2::aph*  $\Delta hlmE$ .

El crecimiento de las cepas *S. clavuligerus oppA2::aph*  $\Delta hlmE$ , *S. clavuligerus oppA2::aph* (súper productora de holomicina) y *S. clavuligerus* ATCC 27064 (no productora de holomicina), se desarrolló en medio definido SA. Se tomaron muestras a las 24, 36, 48, 60 y 72 horas para poder observar diferencias de producción en el tiempo.

La figura 3.35 muestra el bioensayo frente a *M. luteus* realizado con las muestras tomadas a las 48 horas. Se observa la ausencia de producción de holomicina en los dobles recombinantes obtenidos (4, 13 y 30) y la producción del compuesto en los simples recombinantes (7, 12 y 38).

En el análisis mediante HPLC (figura 3.36) se analizó la producción tan sólo de los dobles recombinantes (4, 13 y 30) junto con la cepa silvestre y la cepa sobre productora de holomicina.

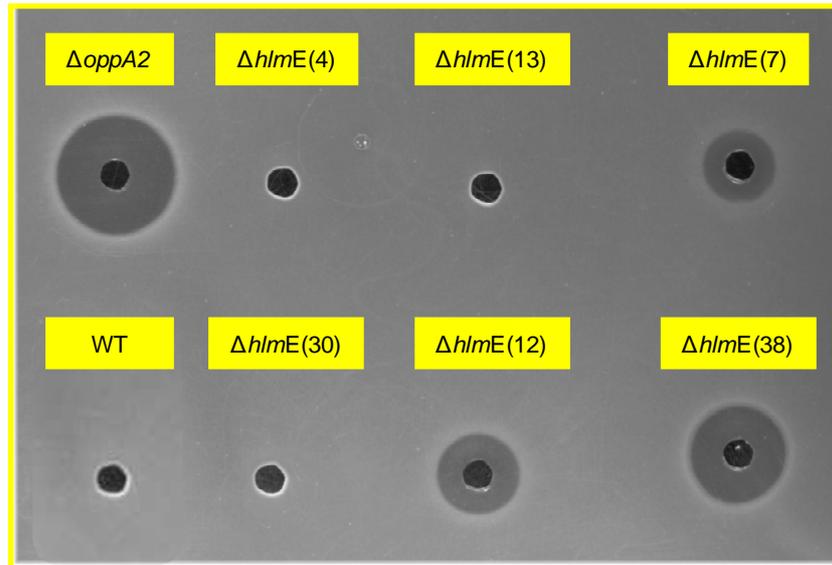


Figura 3.35. Bioensayo frente a *Micrococcus luteus* ATCC 9341. En la imagen se muestran los distintos pocillos del bioensayo con el nombre de las distintas cepas en la parte superior en recuadros amarillos. Las cepas analizadas corresponden a *S. clavuligerus oppA2::aph* ( $\Delta oppA2$ ), la cepa silvestre (WT) y los distintos exconjugantes delecionados ( $\Delta hlmE$  (X)).

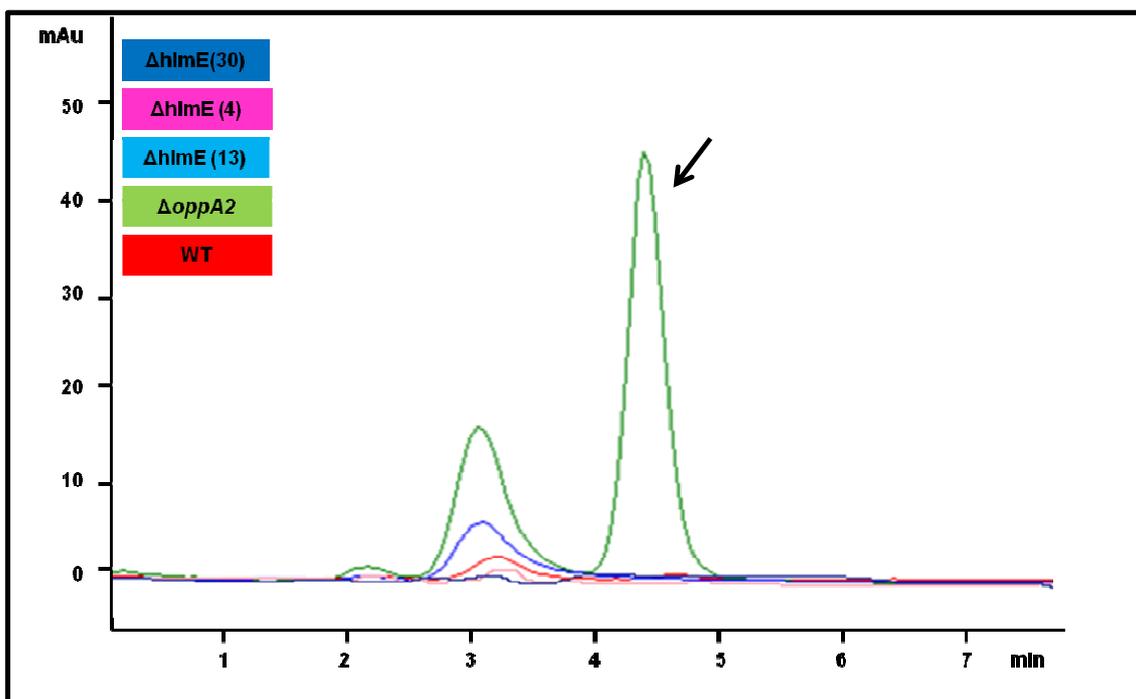
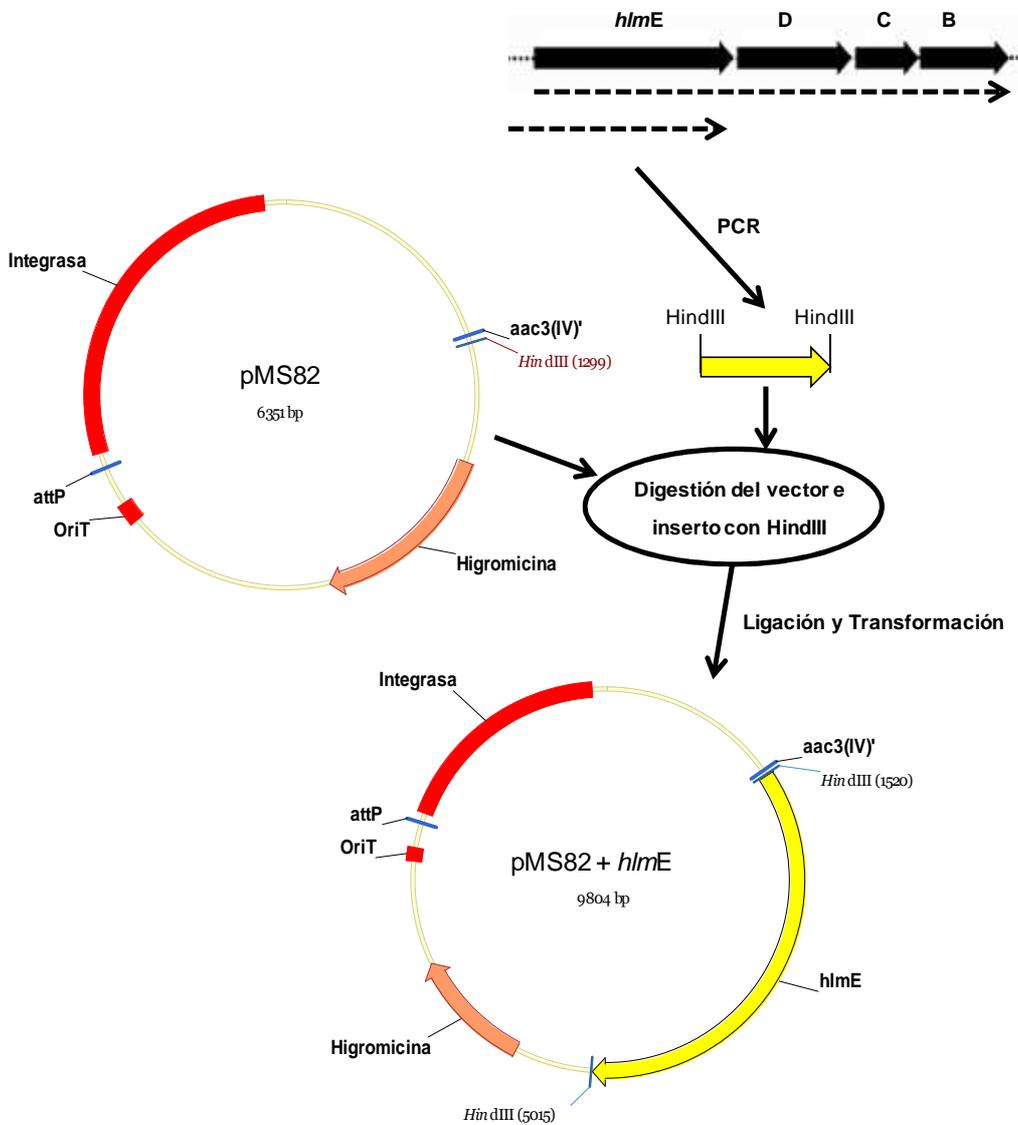


Figura 3.36. Cromatograma de las distintas cepas a las 48 horas. En los recuadros se muestra el nombre de la cepa y el color del cromatograma que le corresponde. La flecha negra indica el pico correspondiente a la holomicina.

- **Complementación de la cepa *S. clavuligerus oppA2::aph ΔhlmE***

La construcción de complementación se realizó en el vector pMS82, plásmido integrativo conjugativo que presenta las resistencias a higromicina (*hyg*) necesaria para la selección de los mutantes. El gen *hlmE*, junto con su región promotora nativa (ver apartado

3.4.2), se obtuvo mediante la digestión amplificado mediante PCR empleándose para ellos los cebadores Dir-comp89 y Rev-comp89, obteniéndose un fragmento de 3453 pb. Estos cebadores presentan en sus colas 5' sendos sitios de restricción HindIII, lo que permitió la inserción del producto de PCR en el sitio HindIII presente en el plásmido pMS82. Se obtuvo así la construcción pMS82+hlmE (figura 3.37.), que finalmente se introdujo mediante conjugación en la cepa *S. clavuligerus oppA2::aph ΔhlmE*, obteniéndose la cepa *S. clavuligerus oppA2::aph ΔhlmE* pMS82+hlmE. Para corroborar la presencia de este fragmento de PCR en el genoma de los ex conjugantes, se llevó a cabo una hibridación de Southern, en la que el ADN genómico digerido con HindIII se hibridó con una sonda (marcada con digoxigenina) consistente en el mismo fragmento de PCR que se empleó para llevar a cabo la construcción de complementación.



**Figura 3.37.** Esquema del proceso de construcción del plásmido pMS82+hlmE. Los sitios de restricción HindIII situados en los extremos del producto de PCR fueron introducidos en el diseño de los cebadores.

Se obtuvieron cinco exconjugantes positivos con los que se llevó a cabo el análisis de la producción de holomicina. El crecimiento de todas las cepas, tanto de los dos clones *S. clavuligerus oppA2::aph ΔhlmE pMS82+hlmE*, la cepa *S. clavuligerus oppA2::aph* (súper productora de holomicina) y la cepa silvestre ATCC 27064 (no productora de holomicina), se desarrollaron en medio definido SA. Se tomaron muestras a las 24, 36, 48, 60 y 72 horas para poder observar diferencias de producción en el tiempo.

Los bioensayos realizados frente a *M. luteus*, y el análisis mediante HPLC, revelaron que la introducción de una copia de *hlmE* bajo el control de su promotor nativo en la cepa *S. clavuligerus oppA2::aph ΔhlmE* no provoca la restauración de la producción de holomicina en la cepa resultante (*S. clavuligerus oppA2::aph ΔhlmE pMS82+hlmE*). Esto puede ser debido a que en el diseño del ReDirect, al seleccionar los nucleótidos por arriba del codón de inicio, se incluyó parte de la región promotora del gen *hlmE*, más concretamente la posible caja -10. Por este motivo al complementar el gen en otra región del genoma de la cepa *S. clavuligerus oppA2::aph ΔhlmE*, siguen sin transcribirse los genes *hlmD-B* que se co-transcriben junto a *hlmE* según hemos comprobado mediante la técnica RACE (ver apartado 3.4.2).

### **3.5. Expresión heteróloga de la agrupación *hlm***

La expresión heteróloga de grupos de genes biosintéticos es una herramienta ampliamente usada para la detección de agrupamientos génicos implicados en la biosíntesis de metabolitos secundarios. La clonación con éxito de una agrupación de genes biosintéticos entera puede ser verificada mediante su expresión heteróloga en un huésped que originalmente no produce el compuesto deseado. La acumulación del producto natural deseado en un huésped heterólogo da evidencia de que todos los genes necesarios para su biosíntesis se encuentran en esa agrupación génica introducida, pudiéndose también encontrar los genes para su regulación y resistencia. Por otro lado, la expresión heteróloga ofrece un gran potencial de obtención de nuevos compuestos por ingeniería metabólica.

La agrupación *hlm* para la biosíntesis de holomicina no está presente en el genoma de *S. coelicolor*, por lo que un mutante no productor de antibióticos de esta especie de *Streptomyces* podría permitir la producción heteróloga de la holomicina.

Por estos motivos, otro de los mecanismos utilizados para corroborar que la agrupación *hlm* era la auténtica responsable de la biosíntesis de holomicina en *S. clavuligerus*, fue la expresión de dicha agrupación en la cepa no productora de holomicina *Streptomyces coelicolor* M1154 (Gomez-Escribano y Bibb, 2011).

### **3.5.1. Construcción del plásmido pVR-hol para la expresión heteróloga de la agrupación *hlm* en *S. coelicolor* M1154**

Una construcción eficaz para la expresión heteróloga requiere como elementos indispensables una integrasa (*int*), un gen de resistencia a tetraciclina (*tetR*), un sitio de integración *att* del fago  $\phi$ C31 y un origen de transferencia (*OrT*), todos ellos presentes en el vector pFL1272, plásmido derivado del vector pIJ787 (Eustaquio *et al.*, 2005), (cedido por el Dr. Felipe Lombo de la Universidad de Oviedo). El vector pFL1272 se digirió con XbaI para aislar un fragmento de casi 7 kb que contiene el casete de integración (figura 3.38). Tras un paso de semi-rellenado TC de los extremos se generaron los extremos compatibles para llevar a cabo su ligación al cósmido linealizado y semirrellenado AG, obteniéndose la construcción pVR-hol. La transformación de pVR-hol produjo la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  pVR-hol, resistente a kanamicina y tetraciclina. Una vez comprobada que la construcción obtenida era la correcta, el cósmido resultante (pVR-hol) se introdujo en la cepa conjugativa *E. coli* ET12567 [pUZ8002] que se conjugó con esporas de *S. coelicolor* M1154.

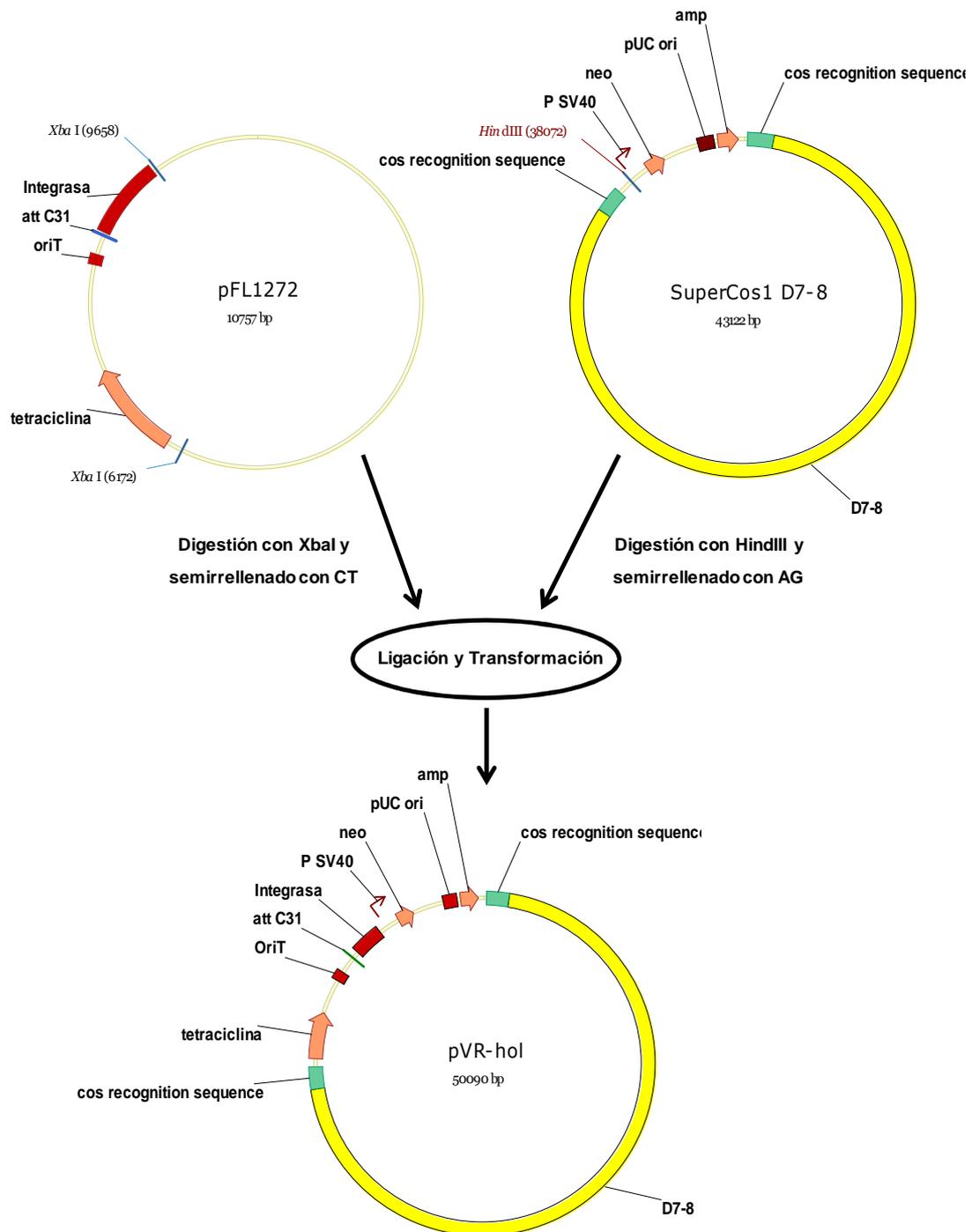
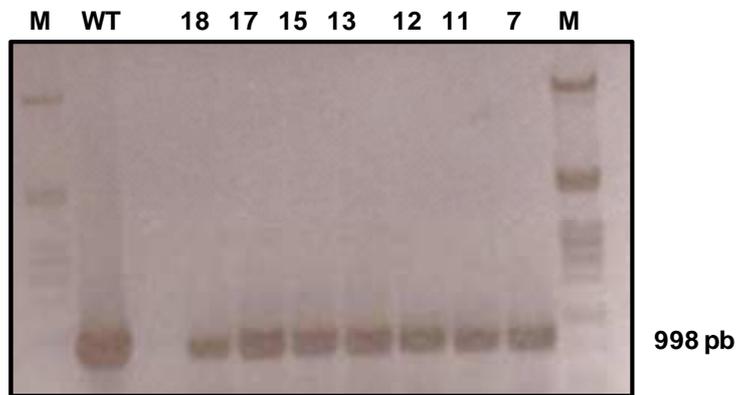


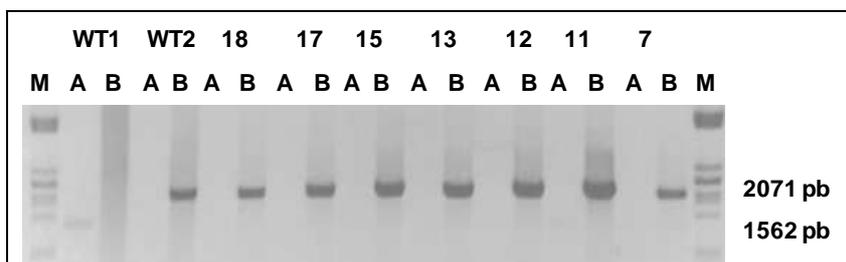
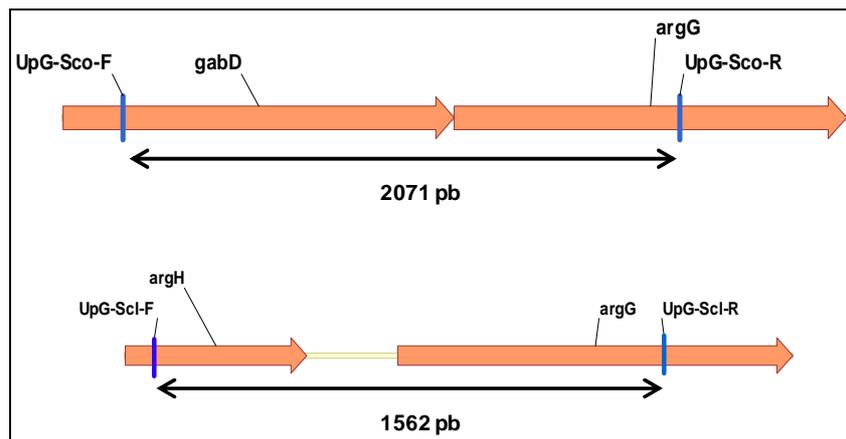
Figura 3.38. Esquema del proceso de construcción del plásmido pVR-hol.

Se obtuvieron 7 exconjugantes resistentes a kanamicina que fueron comprobados mediante PCR. En primer lugar, mediante la amplificación de un fragmento de 998 pb a partir de los cebadores sense PRM y antisense PRM, se comprobó que los transformantes tuvieran la agrupación *hlm* (figura 3.39). En segundo lugar, se comprobó que estos transformantes eran realmente derivados de la cepa *S. coelicolor* M1154 y no una contaminación con cepas de *S. clavuligerus* y en función de la diferente organización de la región *argG* en ambas cepas (Flett

*et al.*, 1987; Rodriguez-Garcia *et al.*, 1995), se diseñaron los cebadores UpG-Sco-F y UpG-Sco-R que amplifican una región entre *gabD-argG* en *S. coelicolor* de 2071 pb y los cebadores UpG-Scl-F y UpG-Scl-R que amplifican una región *argG-argH* de 1562 pb en *S. clavuligerus* (figura 3.40).



**Figura 3.39. Comprobación mediante PCR de la región *hlmA* de los transformantes *S. coelicolor* M1154 pVR-hol obtenidos.** En la imagen se muestran los patrones de ADN total amplificado de los mutantes transformados con el plásmido pVR-hol (7, 11, 12, 13, 15, 17 y 18) en comparación con la cepa *S. clavuligerus* ATCC 27064 (WT) utilizando los cebadores sense PRM y antisense PRM que amplifican la región del gen *hlmA*. A la derecha de la imagen se indica el tamaño de la banda amplificada. El marcador de tamaño molecular (M) corresponde al ADN del fago  $\lambda$  digerido con PstI.



**Figura 3.40. Comprobación de los transformantes *S. coelicolor* M1154 pVR-hol obtenidos mediante PCR de la región *argG*.** En la imagen superior se muestra un esquema de la organización genómica para el gen *argG* y alrededores tanto en la cepa *S. coelicolor* (parte superior) como para *S. clavuligerus* (parte inferior). Se muestran indicados los cebadores utilizados así como el tamaño que amplifican. En la imagen inferior se muestran los patrones de ADN total amplificado de los mutantes transformados con el plásmido pVR-hol (**7**, **11**, **12**, **13**, **15**, **17** y **18**) en comparación con la cepa *S. clavuligerus* ATCC 27064 (**WT1**) y la cepa *S. coelicolor* M1154 (**WT2**). Para ello se han utilizado los cebadores: en los carriles denominados como **A**: UpG-Scl-F y UpG-Scl-R que amplifican una región *argG-argH* de 1562 pb en *S. clavuligerus*, y como **B**: UpG-Sco-F y UpG-Sco-R que amplifican una región entre *gabD-argG* en *S. coelicolor* de 2071 pb. A la derecha de la imagen se indican los tamaños de las bandas amplificadas. El marcador de tamaño molecular (**M**) corresponde al ADN del fago  $\lambda$  digerido con PstI.

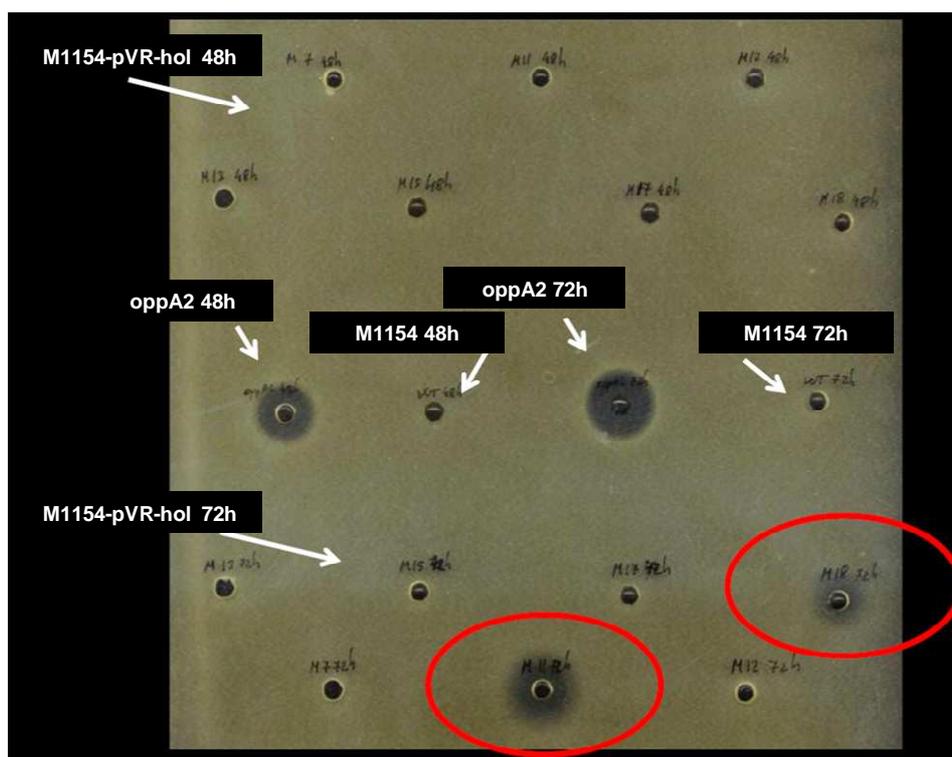
### 3.5.2. Expresión y análisis de la agrupación *hlm* en *S. coelicolor* M1145

Con el fin de determinar si la agrupación *hlm* incluida en el plásmido sería capaz de llevar a cabo la biosíntesis de holomicina en esta cepa se realizó el análisis de la producción de holomicina en la cepa *S. coelicolor* M1145 pVR-hol.

El crecimiento de las cepas *S. coelicolor* M1145 pVR-hol, *S. clavuligerus oppA2::aph* (súper productora de holomicina) y *S. coelicolor* M1145 (no productora de holomicina ni de

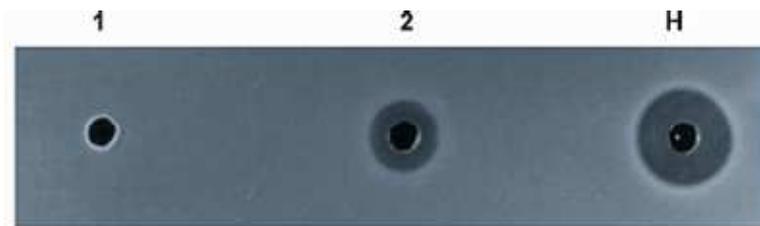
ningún otro compuesto pigmentado ni con actividad frente a *M. luteus*), se desarrollaron en medio definido SA. Se tomaron muestras a las 24, 36, 48, 60, 72 horas para poder observar diferencias de producción en el tiempo.

La figura 3.41 muestra el bioensayo a las 72 horas frente a *M. luteus* donde se determinó la presencia de producción de holomicina en dos de los transformantes obtenidos (11 y 18).



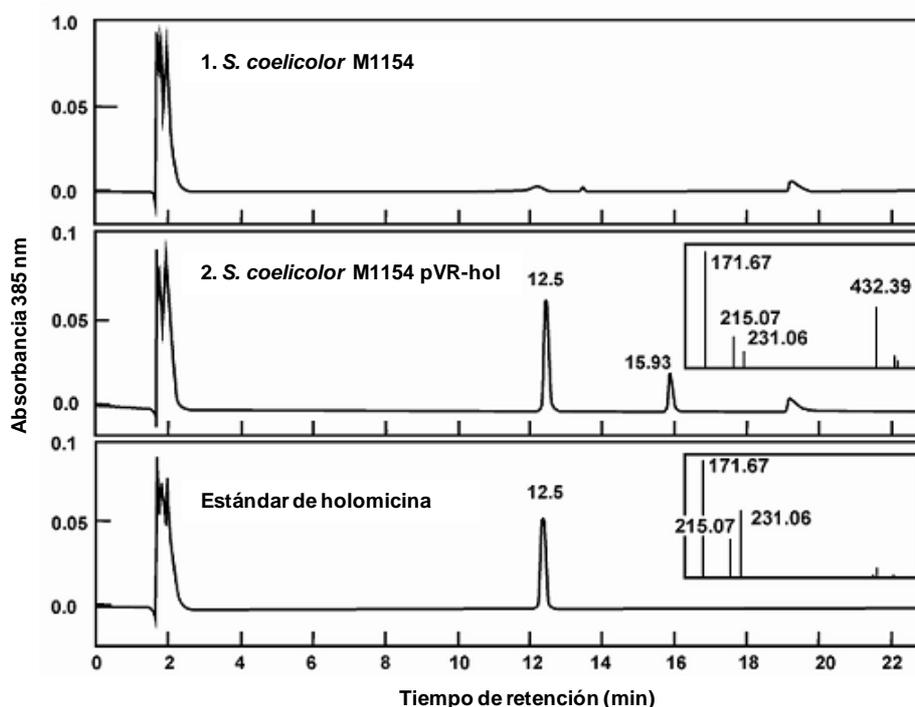
**Figura 3.41. Bioensayo frente a *M. luteus* ATCC 9341.** En la imagen se muestran los distintos pocillos del bioensayo con el nombre de las distintas cepas en blanco. Las cepas analizadas corresponden a *S. clavuligerus oppA2::aph (oppA2)*, la cepa silvestre *S. coelicolor* M1154 (**M1154**) y los distintos transformantes *S. coelicolor* M1154 pVR-hol (**M1154 pVR-hol**). Marcados con círculos rojos se indican los dos pocillos que dieron resultado positivo y que pertenecen a los transformantes 11 y 18.

Al ser todos los clones iguales genéticamente deberían comportarse de la misma manera en cuanto a la producción de holomicina, por lo que las diferencias vendrían dadas en la cantidad de producto y por ello se procedió a concentrar el caldo de cultivo de cada clon de *S. coelicolor* M1154 pVR-hol obtenido y volver a analizar su actividad frente a *M. luteus*. Al concentrar los caldos de cultivo estos poseían actividad contra *M. luteus* (figura 3.42) que no estaba presente en la cepa parental de *S. coelicolor* M1154.



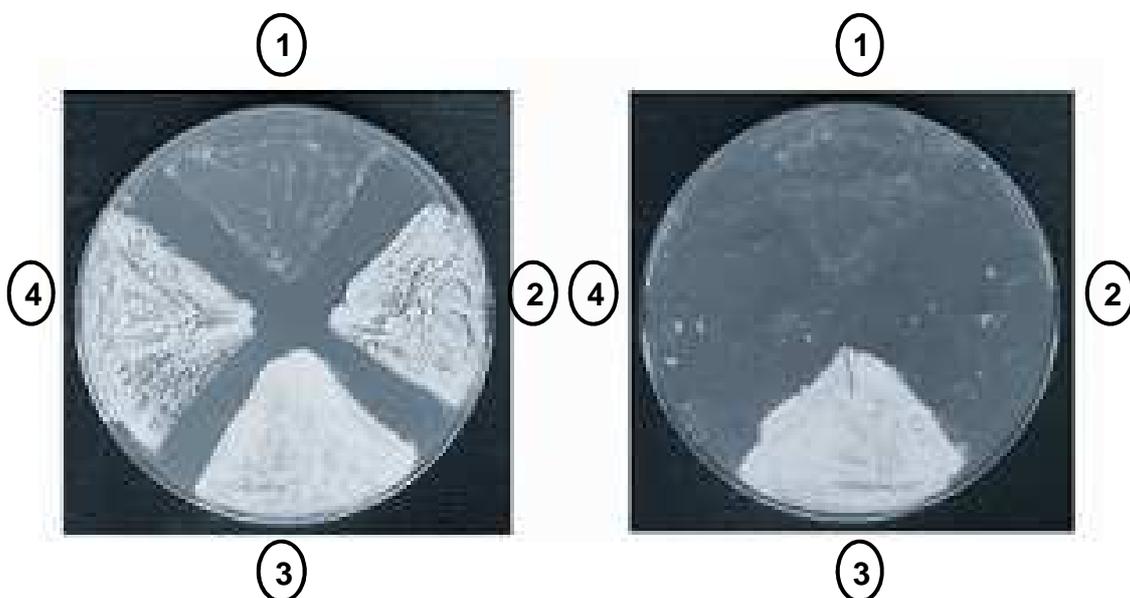
**Figura 3.42. Bioensayo frente a *M. luteus* ATCC 9341.** En la imagen se muestran los extractos de los caldos concentrados 800 veces de las cepas *S. coelicolor* M1154 (1) y *S. coelicolor* M1154 pVR-hol (en la imagen sólo se muestra el concentrado del clon número 7) (2), y un estándar de holomicina pura (20 µg) (H).

Esta producción también se analizó mediante HPLC acoplada a espectrometría de masas (colaboración personal con el Dr. Alfredo Braña de la Universidad de Oviedo) donde identificó el compuesto producido por la cepa *S. coelicolor* M1154 pVR-hol como holomicina (figura 3.43). Como se observa en la figura 3.42, el correspondiente caldo concentrado de la cepa *S. coelicolor* M1154 carecía de este pico. La espectrometría de masas del pico putativo de holomicina permitió la detección de fragmentos de masa de 171,67, 215,07 y 231,06, idénticos a los encontrados en el estándar.



**Figura 3.43. Cromatograma de la producción de las distintas cepas y del estándar de holomicina.** En la imagen se muestra la cepa *S. coelicolor* M1154 (panel superior), *S. coelicolor* M1154 pVR-hol (panel medio), y el estándar de holomicina 1 µg (panel inferior). En los dos recuadros de la derecha de la imagen se muestra el análisis de los espectros de masas del compuesto.

Si bien los diferentes métodos analíticos confirmaron la producción de holomicina en la cepa *S. coelicolor* M1154 pVR-hol, la cantidad del compuesto detectado era sorprendentemente bajo, en el orden de 500-550 veces menor que la de la cepa súper productora *S. clavuligerus oppA2::aph*. Esto podría ser debido a la falta de crecimiento de la cepa *S. coelicolor* M1154 pVR-hol o a la falta de suficientes precursores en *S. coelicolor* para producir este compuesto. En nuestro laboratorio otros transformantes de *S. coelicolor* que llevan cósmidos con fragmentos de ADN heterólogos no se vieron afectados en el crecimiento. Por este motivo, la reducción en el crecimiento de *S. coelicolor* M1154 pVR-hol puede explicarse por su sensibilidad a la holomicina formada. Para probar esta hipótesis, todas las cepas utilizadas en este trabajo fueron cultivadas en placas de SA que contenían cantidades crecientes de holomicina pura (1-100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Tanto la cepa silvestre de *S. clavuligerus* ATCC 27064 y la cepa súper productora de holomicina *S. clavuligerus oppA::aph* fueron capaces de crecer en presencia de 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de holomicina, aunque a simple vista el crecimiento de *S. clavuligerus oppA::aph*, incapaz de producir micelio aéreo, parece menos abundante (figura 3.44).



**Figura 3.44. Prueba de sensibilidad a la holomicina de las distintas cepas en medio SA.** En la imagen de la izquierda se muestra la placa control sin holomicina y en la imagen de la derecha la placa suplementada con 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de holomicina. Las cepas corresponden a *S. clavuligerus oppA::aph* (1), *S. coelicolor* M1154 pVR-hol (2), *S. clavuligerus* ATCC 27064 (3) y *S. coelicolor* M1154 (4).

Curiosamente, las cepas de *S. coelicolor* M1154 crecieron bien hasta 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de holomicina pero fueron inhibidas por 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , es decir, las cepas de *S. coelicolor* son más

sensibles a holomicina y la agrupación *hlm* insertada en *S. coelicolor* no aumenta la resistencia a este compuesto.

## **4. RESULTADOS Y ANÁLISIS II (Riboswitch en *S. clavuligerus*)**



## 4.1. Introducción

Como hemos visto en capítulos anteriores, la holomicina consta de dos unidades de cisteína y, dado que este aminoácido se forma a partir de la metionina, decidimos estudiar si existe en *S. clavuligerus* un fenómeno de *riboswitch* en el gen *metE*, similar al detectado en *S. coelicolor* (Vitreschak *et al.*, 2003; Borovok *et al.*, 2004), y si este mecanismo podría afectar a la producción de antibióticos en *S. clavuligerus*.

El objetivo de esta parte del trabajo es la demostración del mecanismo de *riboswitch* mediado por coenzima B12 (adenosilcobalamina) que se produce en el gen de *Streptomyces* que codifican la metionina sintasa MetE independiente de B12. MetE cataliza la transferencia de un grupo metilo de <sup>5</sup>N-metiltetrahidrofolato (CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub> folato) a L-homocisteína.

En el genoma de *Streptomyces metE* y *metH* codifican dos isoenzimas de metionina sintasa, lo que indica la flexibilidad metabólica y adaptación eficiente de estas bacterias a su entorno. La isoenzima *metH* depende de la coenzima B12 para llevar a cabo su actividad, mientras que la isoenzima *metE* no requiere B12. En *S. clavuligerus*, la región 5'-UTR del gen *metE*, que codifica una metionina sintetasa independiente de B12, contiene un *riboswitch* mediado por B12.

La secuencia determinada para este *riboswitch* es similar a las secuencias de los *riboswitches* mediados por B12 en diversas bacterias (figura 4.1) (Vitreschak *et al.*, 2003; Borovok *et al.*, 2006). La secuencia consenso para los *riboswitches* mediados por B12 consiste en una secuencia corta bien conservada llamada “caja B12” y un conjunto de palíndromos que dan lugar a bucles de horquilla distribuidos a lo largo de la secuencia (Vitreschak *et al.*, 2003).

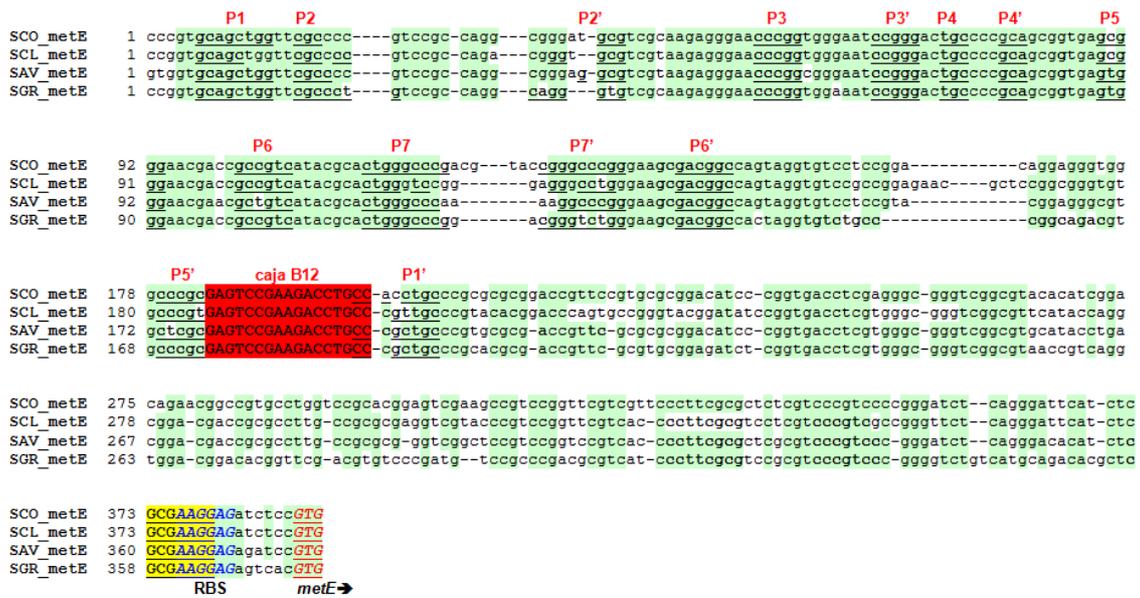


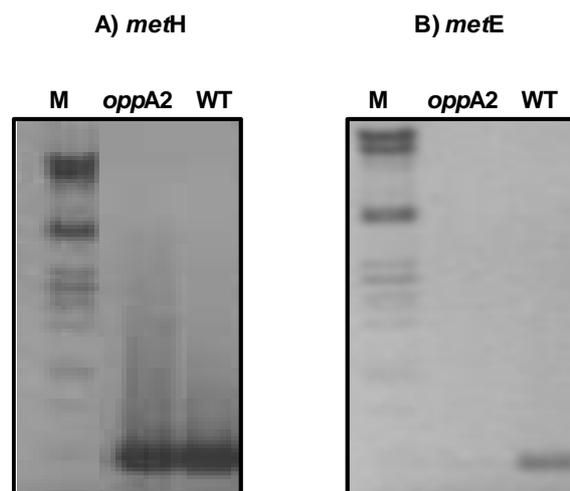
Figura 4.1. Alineamiento de las secuencias pertenecientes al *riboswitch* mediado por B12 en el gen *metE* de distintos *Streptomyces*. Las abreviaturas que se muestran a la izquierda de la imagen se corresponden con: SCO\_metE → *S. coelicolor* (SCO0985), SCL\_metE → *S. clavuligerus* (SCLAV\_p0930), SAV\_metE → *S. avermitilis* (SAV2046) y SGR\_metE → *S. griseus* (SGR\_1212). La secuencia consenso de 18 pares de bases para la caja B12 está recuadrada en color rojo. Las secuencias pertenecientes a los palíndromos de P1/P1' a P7/P7' están subrayadas en negro. Los guiones entre bases indican regiones variables. RBS indica la zona de unión al ribosoma. La flecha negra indica la dirección y el inicio del gen *metE*.

## 4.2. Análisis de la expresión génica de *metH* y *metE* en *S. clavuligerus*

Con el fin de comprobar la presencia y funcionalidad de los genes *metH* y *metE* en *S. clavuligerus*, se llevaron a cabo experimentos de PCR y de RT-PCR a tiempo final, respectivamente.

### 4.2.1. Análisis génico de *metH* y *metE* en las cepas de *S. clavuligerus*

Para averiguar la existencia o no de los genes *metH* y *metE* en las dos cepas de *S. clavuligerus* (la cepa silvestre ATCC 27064 y la cepa súper productora de holomicina *oppA2::aph*), se llevaron a cabo experimentos de PCR. Se usaron como cebadores RT-Di-metH y RT-Re-metH, que amplifican una región interna del gen *metH* de 436 pb, y los cebadores RT-Di-metE y RT-Re-metE que amplifican una región interna del gen *metE* de 460 pb. Como se puede observar en la figura x.x, ambos genes existen en la cepa silvestre ATCC 27064. El resultado indica, en cambio, que en la cepa *oppA2::aph* no existe el gen *metE* (figura 4.2).



**Figura 4.2. Comprobación mediante PCR de la existencia de los genes *methH* y *metE* en *S. clavuligerus* ATCC 27064 (WT) y en *S. clavuligerus oppA2::aph* (*oppA2*). A) *methH*: se muestra la imagen que corresponde al análisis del genoma de ambas cepas para el gen *methH* con los cebadores específicos RT-Di-*methH* y RT-Re-*methH* que amplifican 436 pb. B) *metE*: se muestra la imagen que corresponde al análisis del genoma de ambas cepas para el gen *metE* con los cebadores específicos RT-Di-*metE* y RT-Re-*metE* que amplifican 460 pb. El marcador de tamaño molecular (M) corresponde al ADN del fago  $\lambda$  digerido con PstI.**

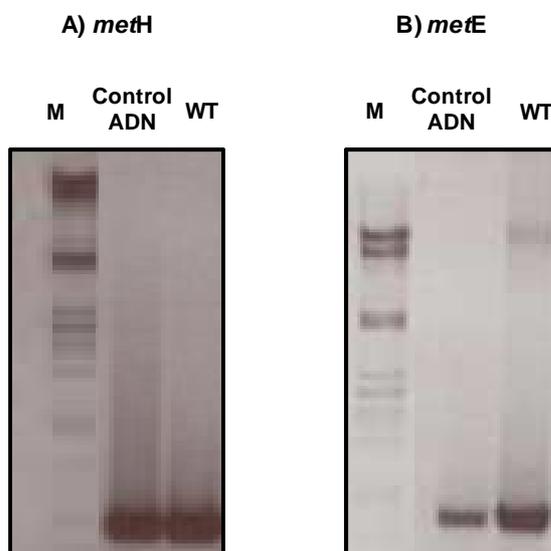
La ausencia del gen *metE* en la cepa *oppA2::aph* es debido a que este gen en la especie *S. clavuligerus* se encuentra situado en el megaplásmido pSCL4 y la cepa *oppA2::aph* carece de él (Álvarez-Álvarez *et al.*, 2013). Debido a este resultado se decidió seguir con los experimentos usando tan sólo la cepa silvestre ATCC 27064.

#### **4.2.2. Análisis de la expresión génica de *methH* y *metE* mediante RT-PCR a tiempo final**

Con el fin de comprobar la existencia de expresión génica de los genes *methH* y *metE* en *S. clavuligerus* ATCC 27064, se llevaron a cabo experimentos de RT-PCR a tiempo final (ver apartado 2.20 de materiales y métodos).

Se extrajeron muestras de ARN a las 24, 36 y 48 horas de un cultivo de *S. clavuligerus* ATCC 27064 crecido en medio SA. El empleo de la técnica de RT-PCR para el análisis transcripcional requirió parejas de oligonucleótidos que amplificaran las regiones de ambos genes. Nuestro objetivo era visualizar la expresión de los genes en la cepa silvestre *S. clavuligerus* ATCC 27064. Se usaron como cebadores RT-Di-*methH* y RT-Re-*methH*, que amplifican

una región interna del gen *metH* de 436 pb, y los cebadores RT-Di-*metE* y RT-Re-*metE* que amplifican una región interna del gen *metE* de 460 pb. Las pruebas de RT-PCR se realizaron a 40 ciclos. Como se puede observar en la figura 4.3, ambos genes se expresan en dicha cepa.



**Figura 4.3. Análisis de la expresión génica de los genes *metH* y *metE* en *S. clavuligerus* ATCC 27064.** **A:** imagen que corresponde al análisis mediante RT-PCR del gen *metH* con los cebadores específicos RT-Di-*metH* y RT-Re-*metH* que amplifican 436 pb. **B:** imagen que corresponde al análisis mediante RT-PCR del gen *metE* con los cebadores específicos RT-Di-*metE* y RT-Re-*metE* que amplifican 460 pb. Sólo se muestra la amplificación a las 48 horas (**WT**) y un control con ADN de la cepa silvestre (**Control ADN**). El marcador de tamaño molecular (**M**) corresponde al ADN del fago  $\lambda$  digerido con PstI.

Gracias a esta técnica podemos hacer una aproximación relativa y concluir que la expresión del gen *metE* es menor que la expresión del gen *metH*. Pero hay que hacer esta aproximación con cautela, ya que la técnica de RT-PCR es una PCR a tiempo final no cuantitativa, donde la intensidad de la banda del producto amplificado no depende sólo de la cantidad de molde inicial, sino de otros factores como la eficiencia de los oligonucleótidos y de la reacción de amplificación. En nuestro caso esta aproximación es suficiente ya que lo que queríamos observar era si ambos genes se expresaban en *S. clavuligerus* ATCC 27064.

### 4.3. Análisis del gen *metH* en *S. clavuligerus*

Una vez determinada la existencia y la capacidad de expresión de ambos genes *metH* y *metE*, se procedió comprobar un posible efecto *riboswitch* sobre el gen *metE* mediado por

vitamina B12. Para ello se llevó a cabo la construcción de la cepa delecionada en el gen *methH* (Vitreschak *et al.*, 2003; Borovok *et al.*, 2004).

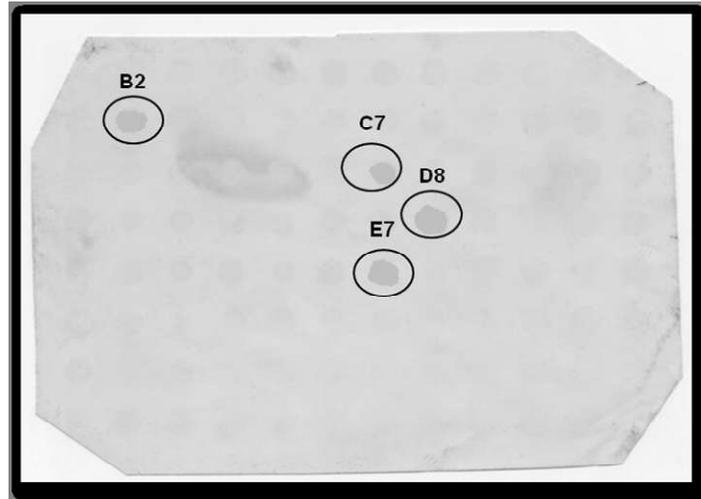
Ya que la inactivación de los genes se estaba llevando a cabo mediante el método del ReDirect<sup>®</sup> (Gust *et al.*, 2002) (ver apartado 2.18 de materiales y métodos), el siguiente paso era la localización del gen *methH* en un cósmido de la genoteca de *S. clavuligerus* previamente construida (ver apartado 3.2 de resultados y discusión).

#### **4.3.1 Búsqueda del gen *methH* en la genoteca de *S. clavuligerus* ATCC 27064**

Para crear una sonda específica con la que rastrear la genoteca se diseñó (programa *Vector NTI Advance™* de Invitrogene™) la pareja de cebadores sonda-Di-*methH* y sonda-Re-*methH* que amplificara mediante PCR un fragmento de 949 pb interno a *methH* al que denominamos como sonda *methH*.

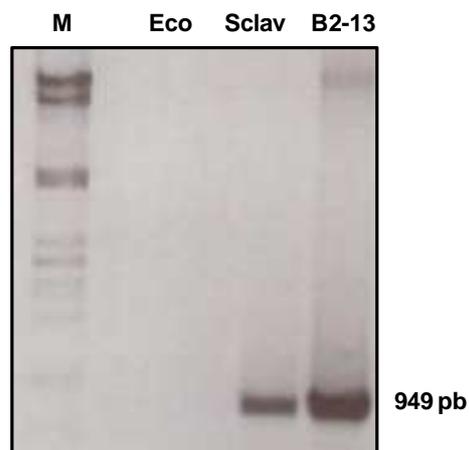
Antes de realizar el rastreo, se comprobó la especificidad de los cebadores sonda-Di-*methH* y sonda-Re-*methH* con los que se obtuvo una sola banda del tamaño esperado (949 pb) para *S. clavuligerus* mientras que utilizando ADNt de *E. coli* como molde el resultado fue negativo (figura 4.5). Dicho fragmento se clonó en el vector pGEM<sup>®</sup>-T easy (Promega) y se secuenció utilizando los cebadores universales SP6 y T7 y los propios cebadores utilizados para su amplificación para verificar su identidad.

La sonda de hibridación *methH* utilizada en el rastreo mediante hibridación de colonias *in situ* se obtuvo por amplificación directa de ADNt de *S. clavuligerus* y posterior purificación y marcaje con digoxigenina. Mediante el rastreo de la placa Máster Total se detectaron cuatro pocillos positivos que correspondían con las posiciones en la membrana: B2, C7, D8 y E7 (figura 4.4).



**Figura 4.4. Rastreo de la placa Máster Total mediante hibridación de colonias *in situ*.** Se muestra la membrana ya hibridada y revelada donde las posiciones positivas aparecen resaltadas con un círculo y marcadas con la localización correspondiente a la placa de microtitulación.

Una vez detectadas las posiciones positivas de la placa Máster Total (MT), con 18 clones cada una; el segundo paso del rastreo consiste en la detección de los cósmidos positivos. Los clones positivos se detectaron mediante PCR (ver apartado 2.10 de materiales y métodos) de colonias (extracción del ADN mediante hervido de las colonias) utilizando los cebadores sonda-Di-metH y sonda-Re-metH. Así, finalmente se localizó un cósmido que porta al menos esa región del genoma de *S. clavuligerus* y que corresponde con la posición **B2-13** (figura 4.5). En este caso los otros tres positivos encontrados en la hibridación *in situ* de la membrana resultaron ser falsos positivos.



**Figura 4.5. Resultados del rastreo del gen *metH* en la librería génica de *S. clavuligerus* ATCC 27064.** Comprobación de la especificidad de los cebadores sonda-Di-metH y sonda-Re-metH con los que se obtuvo una sola banda del tamaño esperado (949 pb) para *S. clavuligerus* (**Sclav**)

mientras que utilizando ADNt de *E. coli* (**Eco**) como molde el resultado era negativo. Comprobación mediante PCR del clon que dio positivo (**B2-13**). La banda amplificada presenta el tamaño esperado de 949 pb. **M**: marcador de peso molecular  $\lambda$  *pstI*.

Para determinar el tamaño del fragmento presente en el cósmido se llevo a cabo la secuenciación de los extremos de los fragmentos de ADN incorporados en el cósmido positivo con el fin de determinar la posición del gen *metH* en dicho fragmento. La secuenciación se realizó con los cebadores T3 y T7 (figura 4.6), los cuales hibridan en los extremos del cósmido permitiendo secuenciar los extremos del fragmento incorporado. Como molde se utilizó ADN cósmido aislado mediante lisis alcalina y purificado con el kit comercial *QIAEX® II Gel Extraction Kit*.



**Figura 4.6.** Fragmento del genoma de *S. clavuligerus* incorporado en el cósmido B2-13. El gen *metH* se indica en color rojo mientras que el resto de genes pertenecientes al genoma de *S. clavuligerus* se representan en color morado. Las flechas continuas indican las zonas de secuenciación (T3 a la izquierda de la imagen y T7 a la derecha). Las flechas discontinuas indican el tamaño de las zonas a la derecha y a la izquierda del gen *metH*. El fragmento incorporado en el cósmido B2-13 mide un total de 40,3 kb.

La situación del gen *metH* dentro del fragmento incorporado en el cósmido es la apropiada para poder llevar a cabo la delección génica mediante el método del ReDirect.

### 4.3.2. Caracterización funcional del gen *metH*

- **Inactivación del gen *metH***

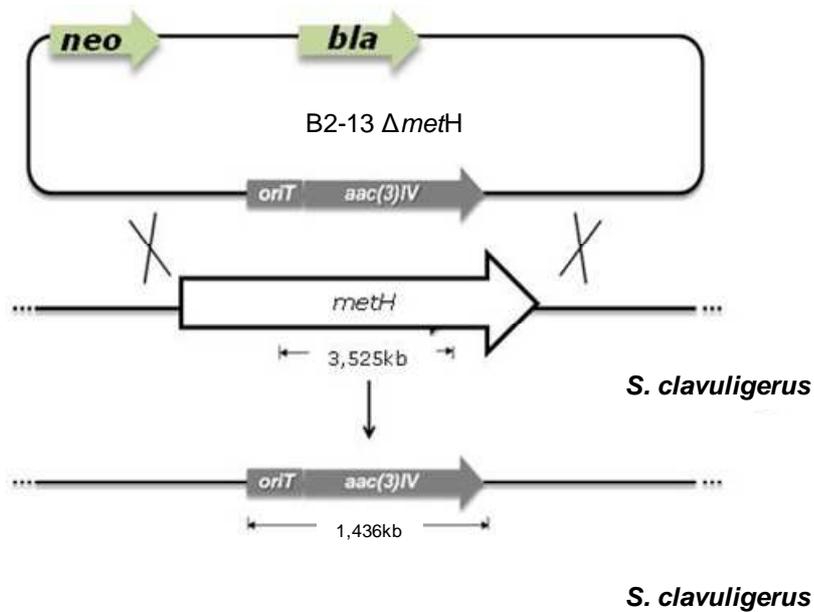
El gen *metH* (3525 pb) codifica una proteína de 1174 aminoácidos que contiene distintos dominios tanto de unión a vitamina B12 como de metiltransferasa. Fue anotado inicialmente en la base de datos del *StrepDB* (<http://strepdb.streptomyces.org.uk>) como SCLAV\_0875, y como SSCG\_05781 en la base de datos del *Broad Institute* (<https://olive.broadinstitute.org>).

Para la obtención del mutante  $\Delta$ *metH* se diseñaron los cebadores específicos ReD-Di *metH* y ReD-Re *metH* empleados en reacciones de PCR con una polimerasa de alta fidelidad de

copia, *GoTaq*<sup>®</sup>, sobre una banda HindIII/EcoRI del plásmido pIJ773 de 1382 pb como ADN molde. Se comprobó mediante electroforesis en agarosa la inexistencia de bandas inespecíficas, por lo que el producto de PCR (1436 pb) fue purificado directamente desde la solución con el kit comercial *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*.

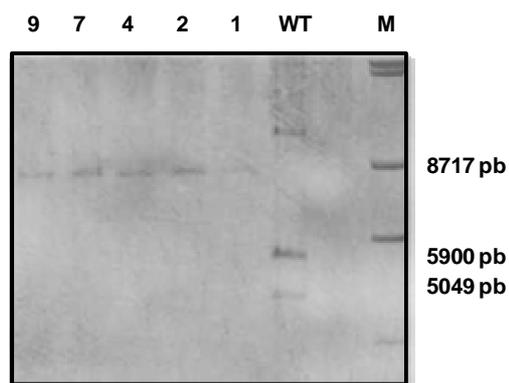
Posteriormente, este producto de PCR se utilizó para la sustitución del gen *metH* localizado en el cósmido B2-13 mediante recombinación doble entre el cósmido y el producto de PCR en la cepa de *E. coli* BW25113/pIJ790 previamente había sido transformada con el cósmido B2-13 de la librería génica de *S. clavuligerus*. Se analizó mediante electroforesis en agarosa que las colonias obtenidas habían incorporado correctamente el cósmido (si el cósmido contiene zonas homólogas es posible que se produzcan eventos de recombinación en el mismo) y la presencia del plásmido pIJ790 (esencial para el proceso de recombinación).

Las colonias de *E. coli* BW25113/pIJ790/B2-13 fueron electroporadas con 100-200 ng del producto de PCR, siguiendo los parámetros descritos en materiales y métodos (ver apartado 2.18.5). Las colonias en las que se produjo la sustitución del gen *metH* por el casete de resistencia se seleccionaron por resistencia a apramicina (figura 4.7). Las construcciones obtenidas se analizaron mediante PCR utilizando dos cebadores externos al gen a delecionar Ext-Dir-*metH* y Ext-Rev-*metH* y otra pareja, como control formada por un cebador interno al gen de resistencia a la apramicina Apratotal y otro externo al gen *metH* (Ext-Rev-*metH*). La PCR de comprobación realizada con los cebadores externos debe resultar en una banda de un tamaño menor en los cósmidos recombinantes ( $\Delta$ *metH*) respecto al cósmido silvestre, mientras que la amplificación a partir de los cebadores control, sólo se debe amplificar sobre los cósmidos recombinantes.



**Figura 4.7. Esquema de la recombinación en la formación del mutante ΔmethH.** En la imagen se presenta un esquema de la recombinación positiva entre el cósmido B2-13 ΔmethH y el genoma de *S. clavuligerus*. Las aspas indican cada zona de recombinación. Se señalan en gris los genes de resistencia a antibióticos que van a permitir la selección de los exconjugantes: *acc(3)IV* (gen de resistencia a apramicina), *neo* (gen de resistencia a kanamicina) y *bla* (gen de resistencia a ampicilina). También se muestran los tamaños, tanto del gen a deleccionar como del inserto sustituyente del mismo.

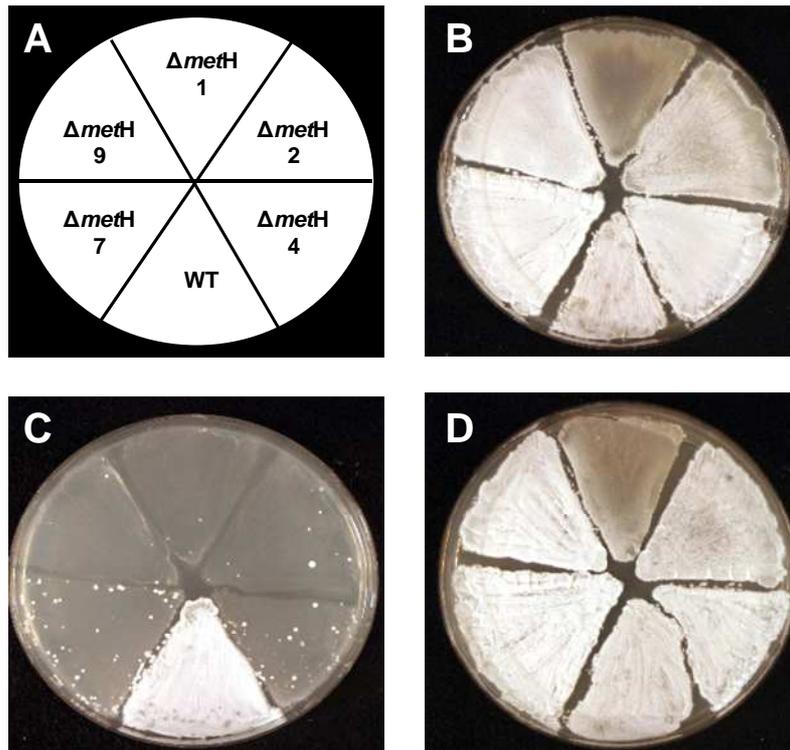
Tras la conjugación de *E. coli* ET13567/pUZ8002/B2-13 ΔmethH con *S. clavuligerus* ATCC 27064, se obtuvieron cinco exconjugantes resistentes a apramicina que se caracterizaron mediante PCR (con los cebadores anteriormente indicados) y mediante hibridación de Southern (ver apartado 2.14), usando cebadores que anillan en secuencias corriente arriba y corriente abajo al gen *methH* (Ext-Dir-methH y Ext-Rev-methH). El patrón de hibridación observado en cada digestión de ADN genómico de los exconjugantes fue el esperado para la doble recombinación y diferente al de la cepa silvestre (figura 4.8).



**Figura 4.8. Comprobación mediante hibridación *Southern* de la delección de  $\Delta$ methH en *S. clavuligerus* ATCC 27064.** En la imagen se muestran los patrones de hibridación de ADN total digerido con NdeI de los mutantes deleccionados  $\Delta$ methH (**9, 7, 4, 2 y 1**) en comparación con la cepa parental *S. clavuligerus* ATCC 27064 (**WT**) utilizando como sonda un fragmento amplificado mediante PCR usando como cebadores Ext-Dir-methH y Ext-Rev-methH. A la derecha de la imagen se indican los tamaños de las bandas de hibridación. El marcador de tamaño molecular. (**M**) corresponde al *DNA Molecular Weight Marker II, Digoxigenin-labeled*.

- **Efecto de la adición de B12 en los mutantes *S. clavuligerus*  $\Delta$ methH**

Para evaluar el efecto de la vitamina B12 en el crecimiento de los mutantes, la cepa *S. clavuligerus* ATCC 27064 y los cinco clones  $\Delta$ methH se sembraron en diferentes condiciones: medio sólido SA, en medio SA suplementado con vitamina B12 y en SA suplementado con vitamina B12 y metionina (figura 4.9).



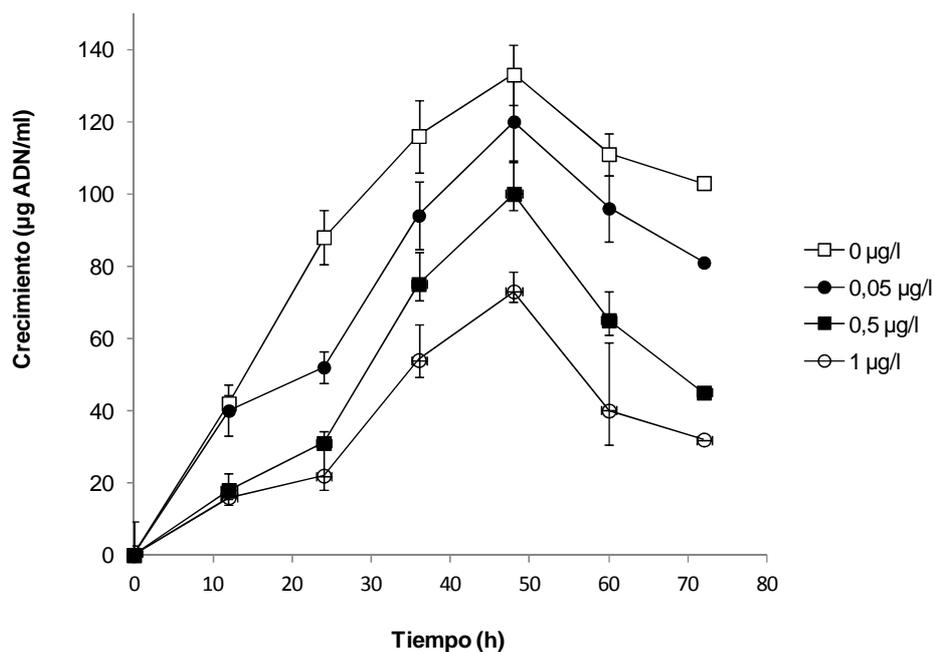
**Figura 4.9.** Efecto de la vitamina B12 en el crecimiento de *S. clavuligerus*  $\Delta methH$ . **B:** crecimiento en placa de medio sólido SA. **C:** crecimiento en placa de medio sólido SA suplementado con vitamina B12 (50 ng/ml). **D:** crecimiento en medio sólido SA suplementado con vitamina B12 (50 ng/ml) y metionina (40 mg/ml). En el panel **A** se indica el orden de siembra de las cepas, siendo WT la cepa silvestre.

Como se aprecia en la figura x.x, tanto la cepa silvestre ATCC 27064 como los mutantes  $\Delta methH$  crecieron correctamente en medio sólido SA. Esto confirma que el gen *metE* se expresa lo suficiente para el crecimiento de esta bacteria sea normal.

El efecto de la vitamina B12 en el crecimiento de los mutantes  $\Delta methH$  es claro, ya que se observa una falta de crecimiento. Sólo aparecen colonias aisladas ocasionales capaces de crecer, especialmente en los mutantes 4 y 7, que podrían corresponder a clones con mutaciones naturales en el sistema de regulación por *riboswitch* debido a la presión selectiva ejercida por la vitamina B12 endógena. El crecimiento se restablece (figura 4.9. D) cuando se añade metionina al medio SA conteniendo B12.

- **Estudio del crecimiento de los mutantes *S. clavuligerus*  $\Delta methH$**

Los cinco clones de la cepa mutante *S. clavuligerus*  $\Delta methH$  se inocularon en medio líquido SA (carente de vitamina B12) y en el mismo medio suplementado con vitamina B12 a distintas concentraciones (0,05  $\mu\text{g/l}$ ; 0,5  $\mu\text{g/l}$  y 1  $\mu\text{g/l}$ ) tomándose muestras a las 24, 36, 48, 60 y 72 horas (figura 4.10).



**Figura 4.10.** Efecto de la vitamina B12 en el crecimiento de la cepa *S. clavuligerus*  $\Delta$ metH. Se muestra el crecimiento del mutante número 1 en medio SA suplementado con distintas concentraciones de vitamina B12 (0; 0,05; 0,5 y 1  $\mu$ g/l).

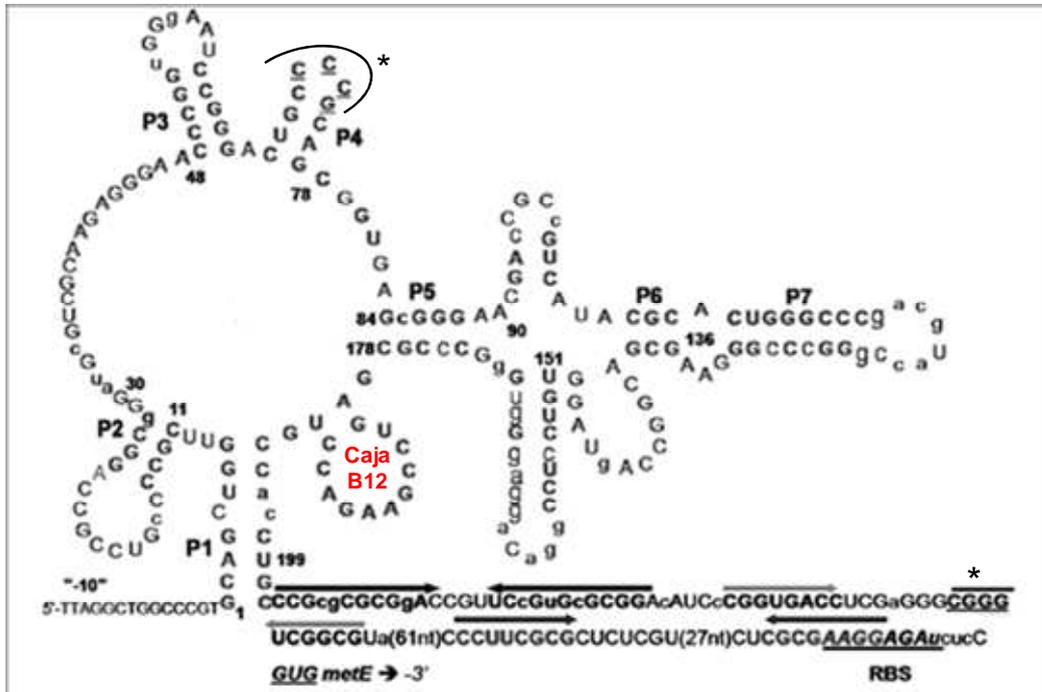
En medio SA la cepa *S. clavuligerus*  $\Delta$ metH crece de forma normal. A medida que aumenta la concentración de vitamina B12 que se añade al medio se observa una disminución del crecimiento que no llega a ser total a concentraciones superiores a 1  $\mu$ g/l (resultados no mostrados). En la cepa silvestre no se aprecian diferencias significativas en el crecimiento debidas a la presencia de B12.

Esto sugiere que en *S. clavuligerus* la vitamina B12 puede reprimir la expresión del gen *metE*, como se ha visto anteriormente en otros genes de *S. coelicolor* (Borovok *et al.*, 2004; Borovok *et al.*, 2006)

- **Estudio de la transcripción del gen *metE* en la cepa *S. clavuligerus*  $\Delta$ metH: fenómeno de *riboswitch*.**

El gen *metE* de *S. clavuligerus* contiene en su región 5'UTR la secuencia consenso para el *riboswitch* mediado por B12 (Vitreschak *et al.*, 2003; Borovok *et al.*, 2006). En la figura 4.11 se muestra la estructura secundaria predicha para el *riboswitch* mediado por B12 en el gen *metE* de *S. clavuligerus* basado en el modelo propuesto Vitreschak *et al.* (Vitreschak *et al.*, 2004). Se muestra la predicción de la estructura en ausencia del co-factor. Hacia la derecha del

*riboswitch* se localizan tres pares de secuencias invertidas, indicadas con flechas contrapuestas. Estas zonas genómicas son sitios potenciales para la terminación de la transcripción. La tercera repetición invertida incluye el sitio de unión al ribosoma (RBS) el cual constituye el modulador de la regulación en la iniciación de la transcripción.



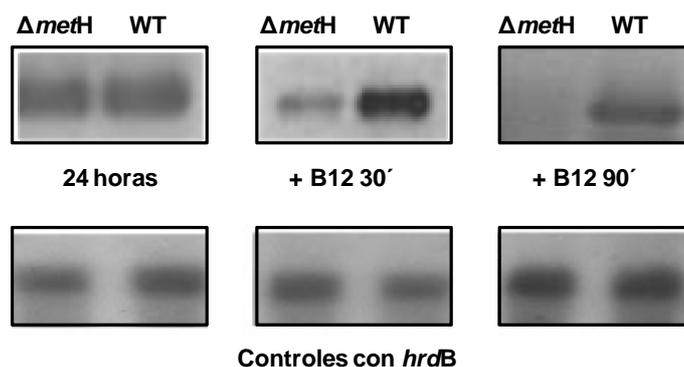
**Figura 4.11. Estructura secundaria predicha para el *riboswitch* mediado por B12 en el gen *metE* de *S. clavuligerus*.**

La estructura ha sido dibujada de acuerdo con el esquema presentado por Vitreschak *et al.*, y es derivada del programa *RNA\_MULTALIN* (Vitreschak *et al.*, 2003; Vitreschak *et al.*, 2004). La caja B12, las secuencias palindrómicas P1-P7, el sitio de unión al ribosoma (RBS) y el codón de inicio de la transcripción (GUG) están indicados en la imagen. Las flechas contrapuestas indican secuencias invertidas, donde la segunda de ellas, marcada con un asterisco puede interactuar con la región P4 y actuar como un terminador de la transcripción. El asterisco indica una posible interacción entre la región del bucle P4 y la región del bucle del terminador de transcripción putativo, las bases CCCGC conservadas en el bucle P4 están enmarcadas por una línea curva, las bases complementarias GGGCG del posible terminador de transcripción putativo se encuentran subrayadas.

Debido a la presencia de esta estructura secundaria predicha y a los estudios previos del crecimiento de las cepas puede inferirse que existe un fenómeno de regulación mediado por *riboswitch*. En este trabajo se realizó su verificación experimental. Para ello se crecieron los distintos clones *S. clavuligerus*  $\Delta methH$ , y también la cepa silvestre *S. clavuligerus* ATCC 27064, en medio SA líquido durante 24 horas. A partir de ese momento se trataron los cultivos con 100  $\mu\text{g/l}$  de B12. Se recogieron muestras de ARN a las 24 horas (tiempo de adición de la vitamina B12) y a los 30 y 90 minutos posteriores a la adición de la vitamina B12 (figura 4.12).

Estas muestras de ARN se utilizaron en reacciones de RT-PCR a tiempo final para observar si existía una inhibición en la expresión del gen *metE*.

Las muestras de ARN (200 ng de ARN) fueron normalizadas usando como control interno el gen de expresión constitutiva *hrdB*, que codifica un factor sigma en *Streptomyces* (figura 4.12).



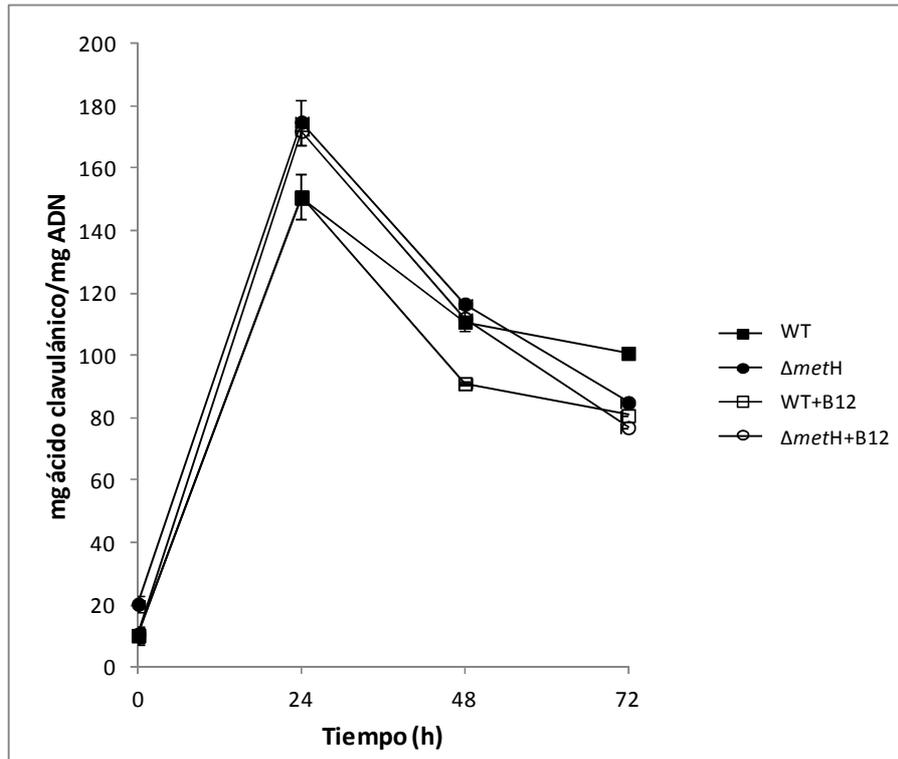
**Figura 4.12. Análisis de la expresión génica de *metE*.** En los recuadros de la parte superior de la imagen se muestran los análisis de RT-PCR a tiempo final de cultivos crecidos en medio definido SA a las 24 horas en la parte izquierda, a los 30 minutos de haber añadido al cultivo anterior vitamina B12 (100  $\mu\text{g/l}$ ) en el medio y a los 90 minutos a la derecha. En los recuadros de la parte inferior de la imagen se muestran los respectivos controles realizados con el gen *hrdB*. Los nombres de las cepas corresponden a: **WT** como la cepa silvestre *S. clavuligerus* ATCC 27064 y  **$\Delta metH$**  como la cepa mutante *S. clavuligerus* ATCC 27064  $\Delta metH$  (sólo se muestran los resultados obtenidos para el clon número 1).

Como se observa en la figura 4.12, la expresión de la metionina sintetasa se reduce independiente de B12 (*metE*) a los 30 minutos de añadir vitamina B12 (100  $\mu\text{g/l}$ ) en un cultivo de medio SA. En el caso de las muestras de ARN, a los 90 minutos se observa una disminución drástica (se podría decir total a simple vista) en la expresión de *metE* en las cepas mutantes  $\Delta metH$ . En contraste, la misma concentración de vitamina B12 no tuvo ningún efecto en las expresiones del gen *hrdB* en ambas cepas, ni tampoco en la expresión de *metE* en la cepa silvestre.

- **Estudio de la producción de antibióticos en *S. clavuligerus*  $\Delta metH$**

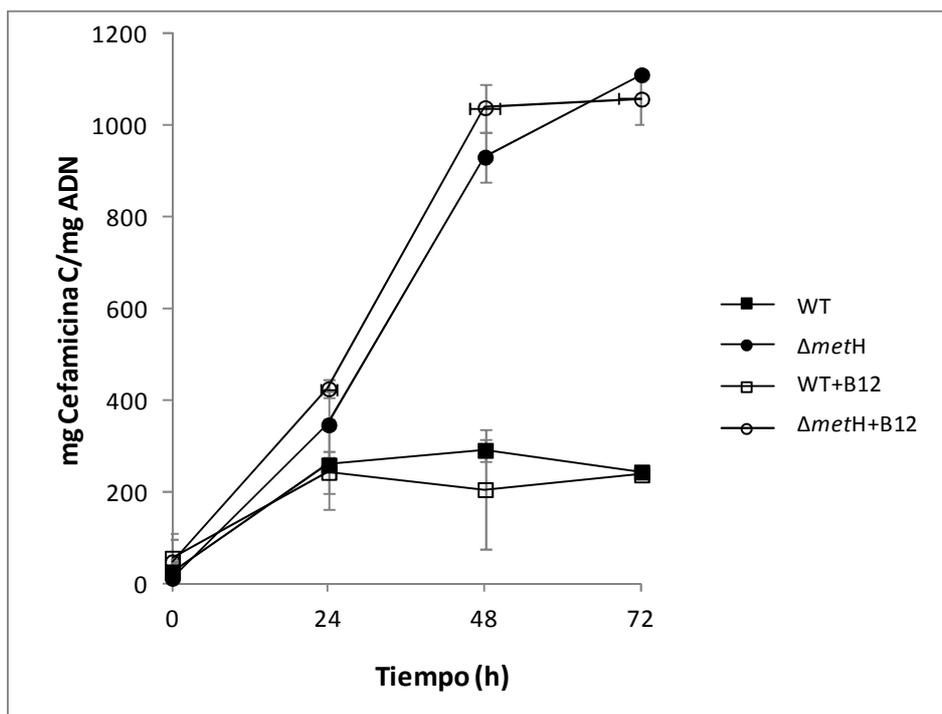
Con el fin de determinar si existían diferencias en la producción tanto de ácido clavulánico como de cefamicina C y holomicina, se llevó a cabo un análisis de producción en los cinco exconjugantes *S. clavuligerus*  $\Delta metH$ .

El crecimiento de todas las cepas, tanto de los cinco clones *S. clavuligerus*  $\Delta metH$  (se muestra como ejemplo el clon número 1) como de la cepa silvestre *S. clavuligerus* ATCC 27064, se desarrollaron en medio definido SA líquido con y sin vitamina B12 (1 $\mu$ g/l). Se tomaron muestras a las 24, 48 y 72 horas para poder observar diferencias de producción en el tiempo.



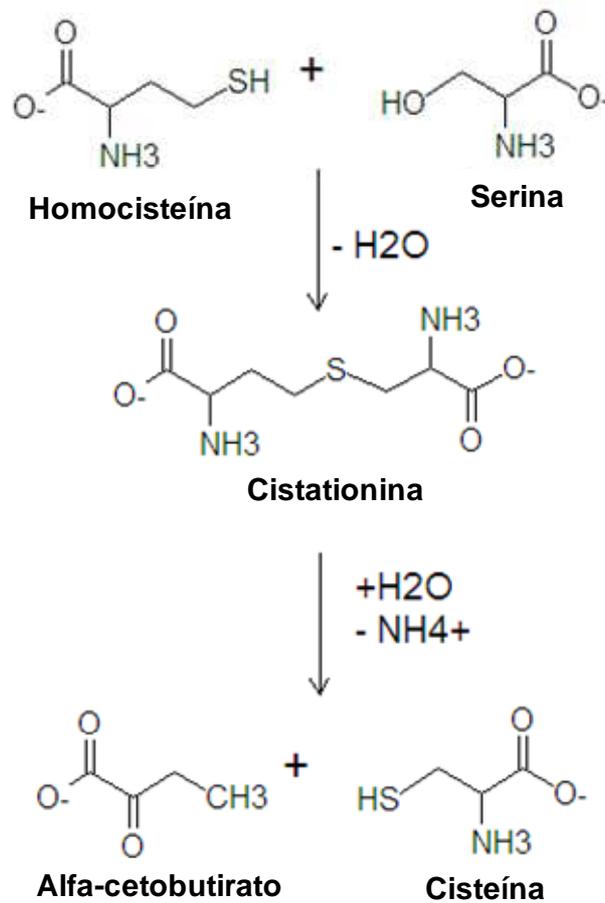
**Figura 4.13.** Efecto de la vitamina B12 en la producción de ácido clavulánico. Se muestra la producción específica, tanto de la cepa silvestre (WT) como de la cepa mutante ( $\Delta metH$ ), en medio líquido SA con y sin adición de vitamina B12 (1 $\mu$ g/l).

No se observan diferencias de producción específica de ácido clavulánico ni entre las dos cepas, silvestre y mutante  $\Delta metH$ , ni respecto a la presencia o ausencia de vitamina B12. Esto puede explicarse ya que entre los precursores del ácido clavulánico no existe cisteína ni metionina ni ningún derivado de los mismos.



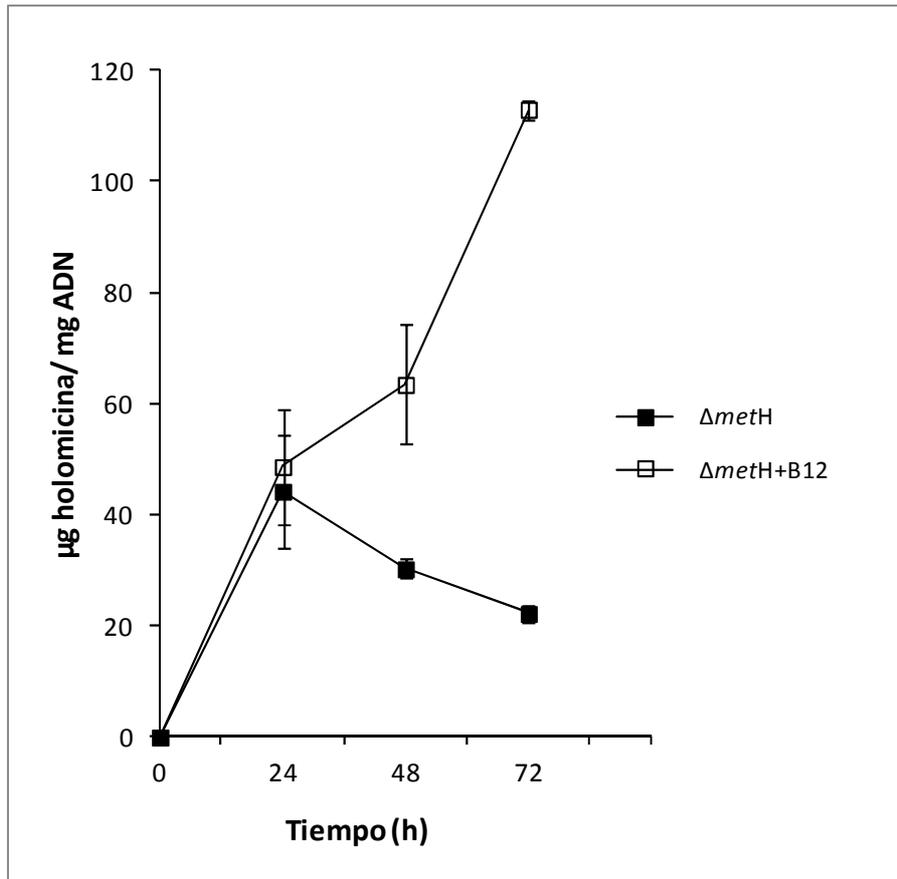
**Figura 4.14. Efecto de la vitamina B12 en la producción de cefamicina C.** Se muestra la producción específica, tanto de la cepa silvestre (WT) como de la cepa mutante ( $\Delta metH$ ), en medio líquido SA con y sin adición de vitamina B12 (1 $\mu$ g/l).

En cuanto a la producción de cefamicina C, que posee un grupo metilo que proviene de la S-adenosilmetionina, se observan diferencias significativas en la producción específica entre la cepa silvestre y la cepa mutante  $\Delta metH$ . La vitamina B12 no produce ningún efecto de aumento ni disminución en la producción específica de cefamicina C en las dos cepas estudiadas. El aumento de producción específica observado en la cepa mutante *metH* puede deberse a un aumento en la biosíntesis de cisteína. Esto se debería a que el azufre necesario para la síntesis de la cisteína proviene de la homocisteína. En este caso el gen *metE*, que convierte la homocisteína a metionina, no sería muy eficiente y esa homocisteína acumulada pasaría a formar parte de la ruta de biosíntesis de cisteína, donde la homocisteína se condensa con la serina para producir cistationina, que es posteriormente fraccionada por la cistationina liasa para producir cisteína y  $\alpha$ -cetobutirato (figura 4.15).



**Figura 4.15. Biosíntesis de la cisteína.** La cisteína beta sintetasa cataliza la reacción superior y la cistationina gamma-liasa cataliza la reacción inferior.

En el caso de la producción de holomicina fue anecdótico observar cómo los cultivos en medio líquido SA de la cepa mutante *S. clavuligerus*  $\Delta$ metH tomaban una tonalidad amarillenta, característica de los cultivos de la cepa súper productora de holomicina  $\Delta$ oppA2. Por ello, sospechando que ese color correspondería a la producción de holomicina, se hicieron bioensayos frente a *M. luteus* y análisis mediante HPLC y se comprobó que la cepa mutante *S. clavuligerus*  $\Delta$ metH producía holomicina (figura 4.16).



**Figura 4.16. Efecto de la vitamina B12 en la producción de holomicina en la cepa  $\Delta methH$ .** Se muestra la producción específica de la cepa mutante ( $\Delta methH$ ) en medio líquido SA con y sin adición de vitamina B12 (1µg/l).

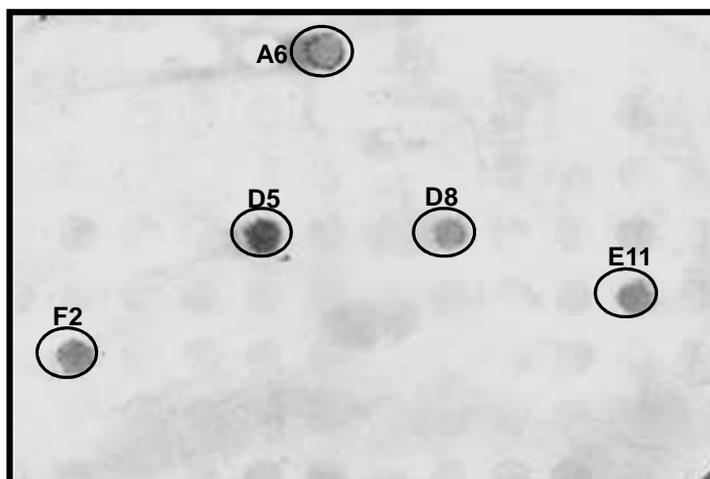
Al suplementar el medio con vitamina B12 (1µg/l), Se observa un aumento en la producción específica de holomicina probablemente porque se detiene el crecimiento. Dicha producción puede ser debido a que la metionina sintasa independiente de B12 (*metE*) no sea lo suficientemente eficaz, como ocurre en *E. coli*, y por ello se sintetice más cisteína que derive en esa producción de holomicina. El aumento de producción de holomicina debido al efecto de la adición de B12 puede ser debido a que en presencia de B12 se reprime la expresión de *metE* y, por lo tanto, al no sintetizarse metionina por este camino, se produciría más cantidad de cisteína, lo que provocaría el aumento en la producción específica de holomicina por esta cepa.

## 4.4. Análisis del gen *metE* en *S. clavuligerus*

### 4.4.1 Búsqueda del gen *metE* en la genoteca de *S. clavuligerus*

Se diseñó la pareja de cebadores sonda-Di-*metE* y sonda-Re-*metE* para amplificar un fragmento interno a *metE* de 1034 pb y crear una sonda específica con la que rastrear la genoteca a la que denominamos como sonda *metE*. Dicho fragmento se clonó en el vector *pGEM<sup>®</sup>-T easy* (Promega) y se secuenció para verificar su identidad utilizando los cebadores universales SP6 y T7 y los propios cebadores utilizados para su amplificación.

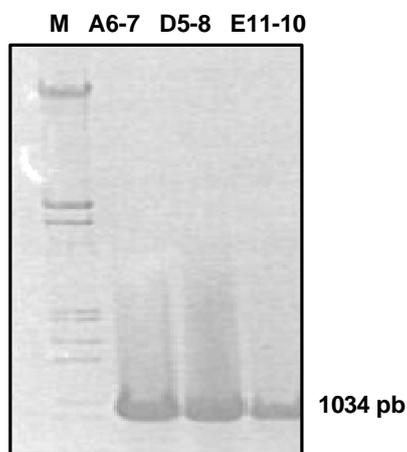
La sonda de hibridación *metE* utilizada en el rastreo mediante hibridación de colonias *in situ* se obtuvo por amplificación directa de ADNt de *S. clavuligerus* y posterior purificación y marcaje con digoxigenina. Mediante el rastreo de la placa Máster Total por esta técnica se detectaron cinco pocillos positivos que correspondían con las posiciones en la membrana: A6, D5, F2, D8 y E11 (figura 4.17).



**Figura 4.17.** Rastreo de la placa Máster Total mediante hibridación de colonias *in situ*. Se muestra la membrana ya hibridada y revelada donde las posiciones positivas aparecen resaltadas con un círculo y marcadas con la localización correspondiente a la placa de microtitulación.

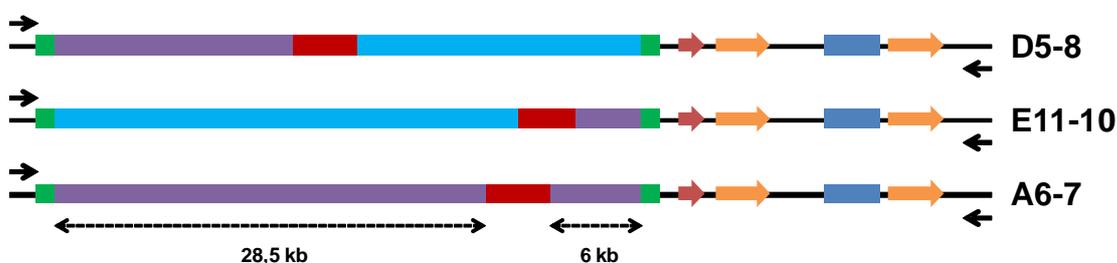
Una vez detectadas las posiciones positivas de la placa Máster Total (MT), con 18 clones cada una; el segundo paso del rastreo consiste en la detección de los cósmidos positivos mediante PCR (ver apartado 2.10 de materiales y métodos) de colonias (extracción del ADN mediante hervido de las colonias) utilizando los cebadores sonda-Di-*metE* y sonda-Re-*metE*

que generan una banda de 1034 pb internas al gen *metE*. Así, finalmente se localizaron tres cósmidos que acomodan al menos esa región del genoma de *S. clavuligerus* y que corresponden con las posiciones **A6-7**, **D5-8** y **E11-10** (Figura 4.18). En este caso los otros dos positivos encontrados en la hibridación *in situ* de la membrana resultaron ser falsos positivos.



**Figura 4.18. Resultados del rastreo del gen *metE* en la librería génica de *S. clavuligerus* ATCC 27064.** Comprobación mediante PCR de los clones que dieron positivo (**A6-7**, **D5-8** y **E11-10**). La banda amplificada presenta el tamaño esperado de 1034 pb. **M**: marcador de peso molecular  $\lambda$  *pstI*.

Como ya se disponía de la secuencia completa del genoma de *S. clavuligerus* y se había optimizado en nuestro laboratorio la secuenciación a partir de ADN cosmídico, se llevó a cabo la secuenciación de los extremos de los fragmentos de ADN incorporados en los cósmidos positivos para *metE* con el fin de determinar la posición del gen en cada fragmento. La secuenciación se realizó con los cebadores T3 y T7 (figura 4.19), los cuales hibridan en los extremos del cósmido permitiendo secuenciar los extremos del fragmento incorporado. Como molde se utilizó ADN cosmídico aislado mediante lisis alcalina y purificado con el kit comercial *QIAEX® II Gel Extraction Kit*.



**Figura 4.19. Fragmentos del genoma de *S. clavuligerus* incorporados en los cósmidos positivos para el gen *metE*.** El gen *metE* se indica en color rojo mientras que el resto de genes pertenecientes al genoma de *S. clavuligerus* se representan en azul claro y los pertenecientes al pSCL4 en color morado. Las flechas continuas indican las zonas de secuenciación (T3 a la izquierda de la imagen y T7 a la derecha). En la parte superior se muestra el cósmido D5-8

que posee dos o más fragmentos en el inserto ya que posee por el extremo T7 genes pertenecientes al pSCL4 y genes del cromosoma por el extremo T3, por lo tanto sabemos que está presente el gen *metE* en ese inserto pero no podemos situarlo con certeza. En el medio se muestra el cósmido E11-10 que posee dos o más fragmentos en el inserto ya que posee por el extremo T3 genes pertenecientes al pSCL4 y genes del cromosoma por el extremo T7, por lo tanto sabemos que está presente el gen *metE* en ese inserto pero no podemos situarlo con seguridad. En la parte inferior se muestra un esquema del cósmido A6-7 en el que las flechas discontinuas indican el tamaño de las zonas a la derecha y a la izquierda del gen *metE*, donde el fragmento incorporado mide un total de 37 kb.

El cósmido **A6-7** fue el elegido para llevar a cabo la delección mediante ReDirect<sup>®</sup> (debido a la localización centrada del gen *metE* en el fragmento de ADNt incorporado por el cósmido).

#### **4.4.2. Caracterización funcional del gen *metE***

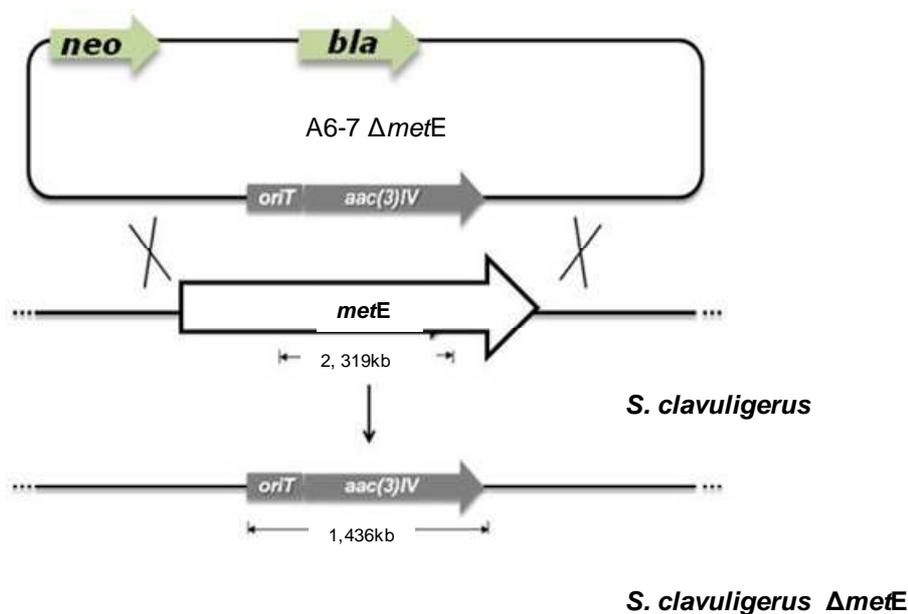
- **Inactivación del gen *metE* en la cepa *S. clavuligerus* ATCC 27064**

El gen *metE* (2319 pb) fue anotado inicialmente en la base de datos del *StrepDB* (<http://strepdb.streptomyces.org.uk>) como SCLAV\_p0930, y como SSCG\_00481 en la base de datos del *Broad Institute* (<https://olive.broadinstitute.org>) y codifica una proteína formada por 772 aminoácidos.

Para la obtención del mutante  $\Delta metE$  se diseñaron los cebadores específicos ReD-Dir *metE* y ReD-Rev *metE*. Esta pareja de cebadores se utilizaron en reacciones de PCR con una polimerasa de alta fidelidad de copia, GoTaq<sup>®</sup>, sobre una banda HindIII/EcoRI del plásmido pIJ773 de 1382 pb como ADN molde. Se comprobó mediante electroforesis en agarosa que no se habían generado bandas inespecíficas por lo que el producto de PCR, de un tamaño final de 1436 pb, fue purificado directamente desde la solución con el kit comercial *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*.

Posteriormente, este producto de PCR se utilizó para la sustitución del gen *metE* localizado en el cósmido A6-7. Este proceso, que se lleva a cabo mediante recombinación doble entre el cósmido y el producto de PCR, fue realizado en la cepa de *E. coli* BW25113/pIJ790, la cual previamente había sido transformada, mediante choque térmico, con el cósmido A6-7 de la librería génica de *S. clavuligerus*. Se analizó mediante electroforesis en agarosa que las colonias obtenidas habían incorporado correctamente el cósmido (si el cósmido contiene zonas homólogas es posible que se produzcan eventos de recombinación en el mismo) y la presencia del plásmido pIJ790 (esencial para el proceso de recombinación).

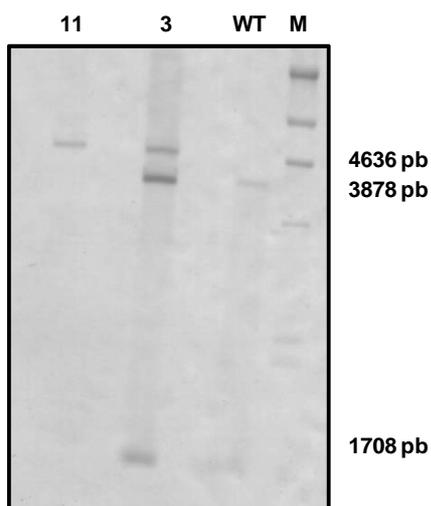
Las colonias de *E. coli* BW25113/pIJ790/A6-7 fueron electroporadas con 100-200 ng del producto de PCR, siguiendo los parámetros descritos en materiales y métodos (ver apartado 2.18.5). Las colonias en las que se produjo la sustitución del gen *metE* por el casete de resistencia se seleccionaron por resistencia a apramicina (figura 4.20). Las construcciones obtenidas se analizaron mediante PCR utilizando dos cebadores externos a los genes a delectonar Dir-Ext-*metE* y Rev-Ext-*metE* y otra pareja, como control formada por un cebador interno al gen de resistencia a la apramicina *Apratotal* y otro externo al gen *metE* (Rev-Ext-*metE*). Así, la PCR de comprobación realizada con los cebadores externos debe resultar en una banda de un tamaño menor en los cósmidos recombinantes ( $\Delta metE$ ) respecto al cósmido silvestre y usando la segunda combinación de cebadores, como control, sólo se debe obtener banda en los cósmidos recombinantes.



**Figura 4.20. Esquema de la recombinação en la formación del mutante  $\Delta metE$ .** En la imagen se presenta un esquema de la recombinação positiva entre el cósmido A6-7  $\Delta metE$  y el genoma de *S. clavuligerus*. Las aspas indican cada zona de recombinação. Se señalan en gris los genes de resistencia a antibióticos que van a permitir la selección de los exconjugantes: *acc(3)IV* (gen de resistencia a apramicina), *neo* (gen de resistencia a kanamicina) y *bla* (gen de resistencia a ampicilina). También se muestran los tamaños, tanto del gen a delectonar como del inserto sustituyente del mismo.

Tras la conjugación de *E. coli* ET13567/pUZ8002/A6-7  $\Delta metE$  con la cepa *S. clavuligerus* ATCC 27064, se obtuvieron diez exconjugantes resistentes a apramicina que se analizaron mediante PCR con los cebadores anteriormente indicados para la comprobación de los cósmidos recombinantes, del que sólo dos de ellos eran dobles recombinantes. Ambos

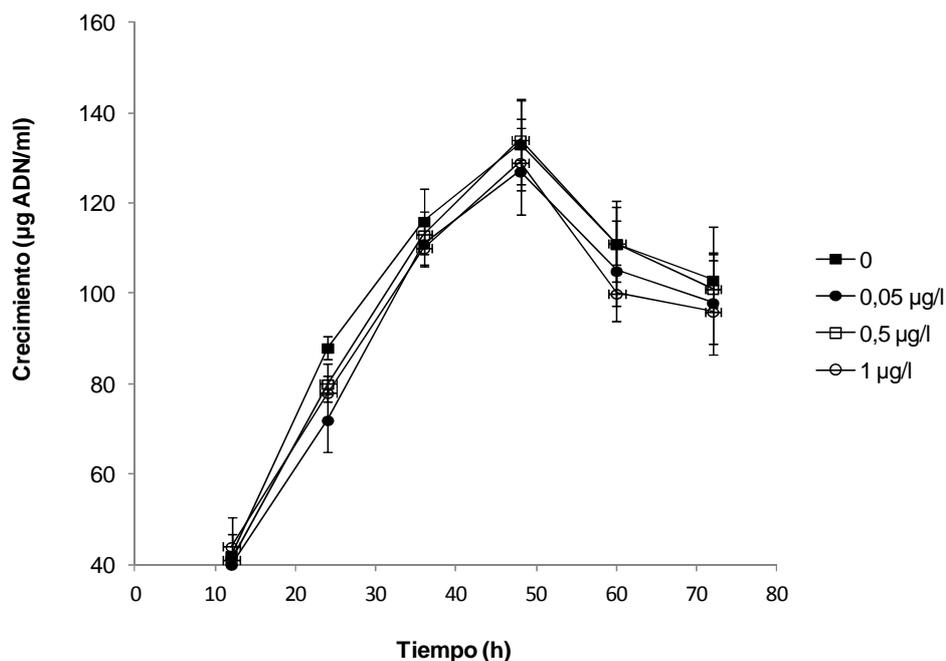
exconjugantes fueron comprobados mediante hibridación de *Southern* (ver apartado 2.14 de materiales y métodos), la cual fue llevada a cabo usando cebadores que anillan en secuencias corriente arriba y corriente abajo al gen *metE* (Dir-Ext-*metE* y Rev-Ext-*metE*). El patrón de hibridación observado en cada digestión de ADN genómico de los exconjugantes fue el esperado para la doble recombinación en uno de ellos y de simple recombinación para el otro (figura 4.21).



**Figura 4.21. Comprobación mediante hibridación tipo Southern de la delección de  $\Delta metE$  en *S. clavuligerus*.** En la imagen se muestran los patrones de hibridación de ADN total digerido con XmaI de los mutantes delecionados  $\Delta metE$  (**3** y **11**) en comparación con la cepa parental *S. clavuligerus* (**WT**) utilizando como sonda un fragmento amplificado mediante PCR usando como cebadores Dir-Ext-*metE* y Rev-Ext-*metE*. A la derecha de la imagen se indican los tamaños de las bandas de hibridación. El marcador de tamaño molecular (**M**) corresponde al *DNA Molecular Weight Marker II, Digoxigenin-labeled*.

- **Estudio del crecimiento de los mutantes *S. clavuligerus*  $\Delta metE$**

La cepa mutante *S. clavuligerus*  $\Delta metE$  se inoculó en medio líquido SA (carente de vitamina B12) y en el mismo medio suplementado con vitamina B12 a distintas concentraciones (0,05  $\mu\text{g/l}$ ; 0,5  $\mu\text{g/l}$  y 1  $\mu\text{g/l}$ ) tomándose muestras a las 24, 36, 48, 60 y 72 horas (figura 4.22).



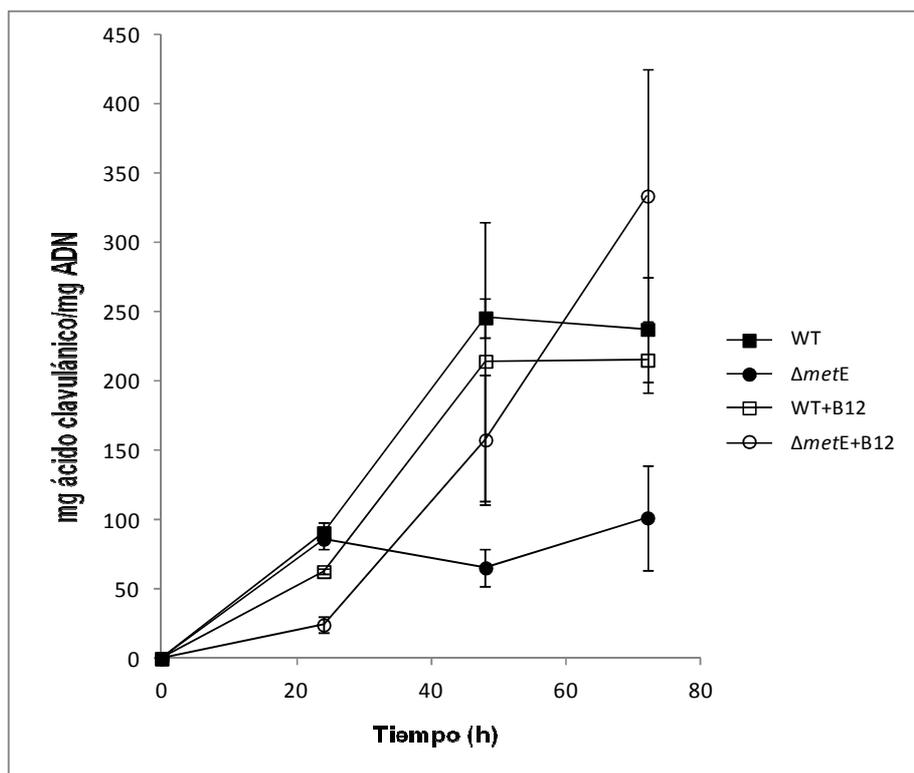
**Figura 4.22. Efecto de la vitamina B12 en el crecimiento de la cepa *S. clavuligerus*  $\Delta$ metE.** Se muestra el crecimiento de la cepa en medio SA suplementado con distintas concentraciones de vitamina B12 (0; 0,05; 0,5 y 1  $\mu$ g/l).

Tanto en ausencia de vitamina B12 como en presencia de la misma en el medio SA, la cepa *S. clavuligerus*  $\Delta$ metE crece de forma normal. Al igual que ocurre con la cepa silvestre no se aprecian diferencias significativas en el crecimiento debido a la presencia de B12.

- **Estudio de la producción de antibióticos en *S. clavuligerus*  $\Delta$ metE**

Se llevó a cabo el análisis de la producción tanto de ácido clavulánico como de cefamicina C y holomicina la cepa *S. clavuligerus*  $\Delta$ metE con el fin de determinar si existían diferencias en la producción de estos compuestos.

Las cepas, *S. clavuligerus*  $\Delta$ metE y *S. clavuligerus* ATCC 27064 se cultivaron en medio definido SA líquido con y sin vitamina B12 (1 $\mu$ g/l) y se recogieron muestras a las 24, 48 y 72 horas para poder observar diferencias de producción en el tiempo.



**Figura 4.23. Efecto de la vitamina B12 en la producción de ácido clavulánico.** Se muestra la producción específica, tanto de la cepa silvestre (WT) como de la cepa mutante ( $\Delta metE$ ), en medio líquido SA con y sin adición de vitamina B12 (1 $\mu$ g/l).

Como se observa en la figura, la producción de ácido clavulánico en la cepa mutante *S. clavuligerus*  $\Delta metE$  es menor que en la cepa silvestre *S. clavuligerus* ATCC 27064. Se observan diferencias de producción específica de ácido clavulánico en la cepa mutante *S. clavuligerus*  $\Delta metE$  en presencia de vitamina B12, donde dicha producción aumenta considerablemente, llegando a sobrepasar la producción de la cepa silvestre *S. clavuligerus* ATCC 27064.

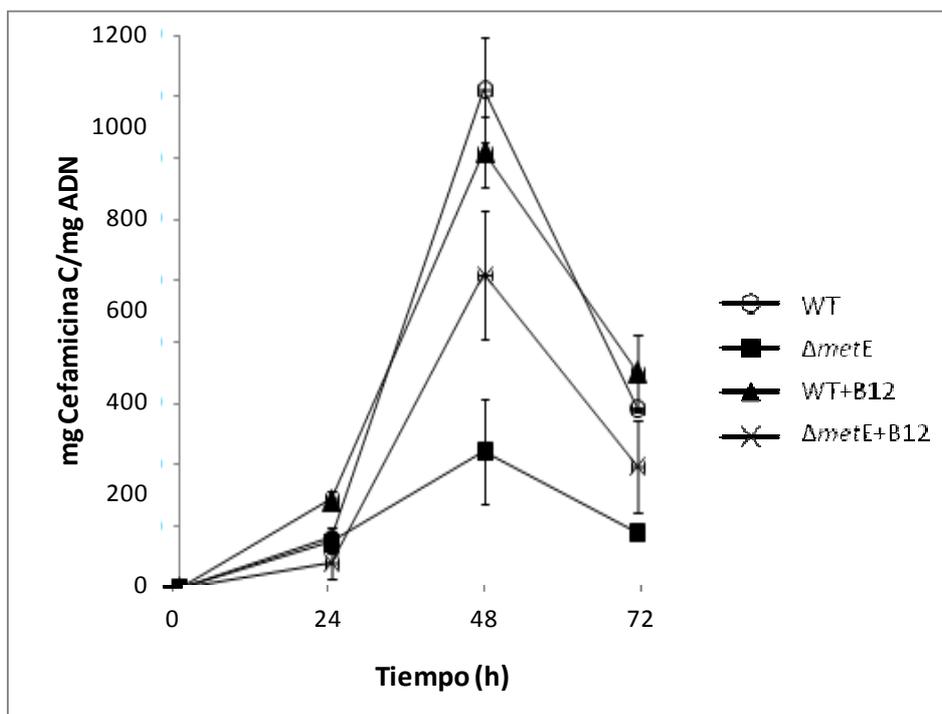


Figura 4.24. Efecto de la vitamina B12 en la producción de cefamicina C. Se muestra la producción específica, tanto de la cepa silvestre (WT) como de la cepa mutante ( $\Delta metE$ ), en medio líquido SA con y sin adición de vitamina B12 (1 $\mu$ g/l).

Se observa un descenso en la producción específica de cefamicina C en la cepa mutante *S. clavuligerus*  $\Delta metE$ . La vitamina B12 produce un efecto de aumento en la producción específica de cefamicina C en la cepa mutante  $\Delta metE$  y ningún efecto sobre la cepa silvestre *S. clavuligerus* ATCC 27064.

En el caso de la holomicina, no se observa producción de este compuesto en la cepa mutante *S. clavuligerus*  $\Delta metE$ .

## 4.5. Análisis del doble mutante *meth*-E en *S. clavuligerus*

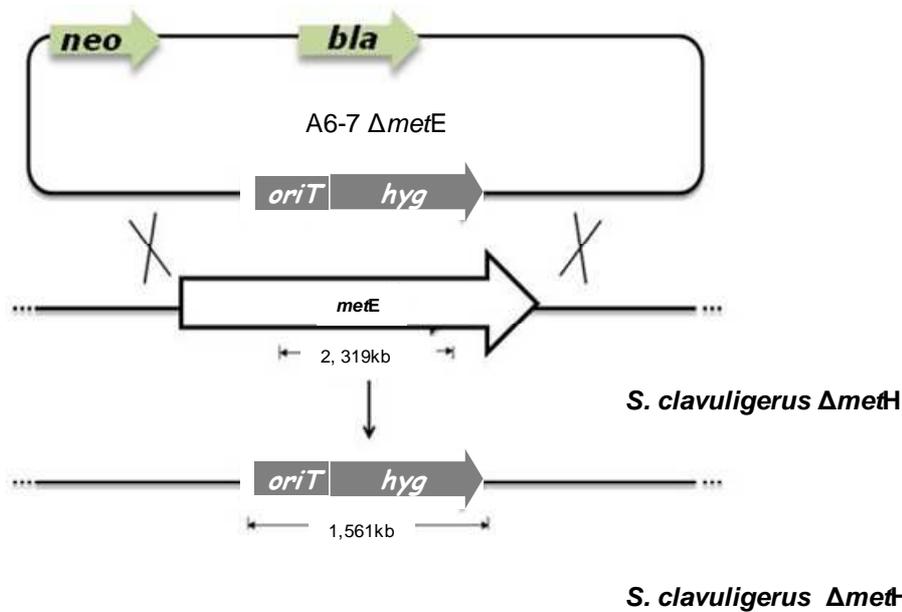
### 4.5.1 Obtención del doble mutante $\Delta meth$ -E

Para conseguir el doble mutante se llevó a cabo la delección del gen *metE* en la cepa *S. clavuligerus*  $\Delta meth$ .

Se utilizaron los mismos cebadores específicos, ReD-Dir metE y ReD-Rev metE, que se utilizaron en el apartado 4.4.2. Esta pareja de cebadores se utilizó en reacciones de PCR con una polimerasa de alta fidelidad de copia, *GoTaq*<sup>®</sup>, sobre una banda XbaI/XbaI del plásmido pIJ10700 de 1507 pb como ADN molde. Se comprobó mediante electroforesis en agarosa que no se habían generado bandas inespecíficas por lo que el producto de PCR, de un tamaño final de 1561 pb, fue purificado directamente desde la solución con el kit comercial *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*.

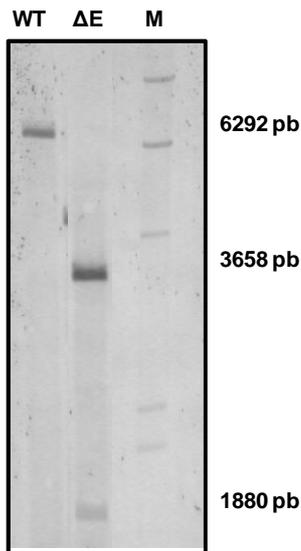
Posteriormente, este producto de PCR se utilizó para la sustitución del gen *metE* localizado en el cósmido A6-7. Este proceso, que se lleva a cabo mediante recombinación doble entre el cósmido y el producto de PCR, fue realizado en la cepa de *E. coli* BW25113/pIJ790, la cual previamente había sido transformada, mediante choque térmico, con el cósmido A6-7 de la librería génica de *S. clavuligerus*. Se analizó mediante electroforesis en agarosa que las colonias obtenidas habían incorporado correctamente el cósmido (si el cósmido contiene zonas homólogas es posible que se produzcan eventos de recombinación en el mismo) y la presencia del plásmido pIJ790 (esencial para el proceso de recombinación).

Las colonias de *E. coli* BW25113/pIJ790/A6-7 fueron electroporadas con 100-200 ng del producto de PCR, siguiendo los parámetros descritos en materiales y métodos (ver apartado 2.18.5). Las colonias en las que se produjo la sustitución del gen *metE* por el casete de resistencia se seleccionaron por resistencia a higromicina (figura 4.25). Las construcciones obtenidas se analizaron mediante PCR utilizando dos cebadores externos a los genes a deleccionar Dir-Ext-metE y Rev-Ext-metE. La PCR de comprobación realizada con los cebadores externos debe resultar en una banda de un tamaño menor en los cósmidos recombinantes ( $\Delta metE$ ) respecto al cósmido silvestre.



**Figura 4.25. Esquema de la recombinación en la formación del mutante  $\Delta metH-E$ .** En la imagen se presenta un esquema de la recombinación positiva entre el cósmido A6-7  $\Delta metE$  y el genoma de *S. clavuligerus*  $\Delta metH$ . Las aspas indican cada zona de recombinación. Se señalan en gris los genes de resistencia a antibióticos que van a permitir la selección de los exconjugantes: *hyg* (gen de resistencia a higromicina), *neo* (gen de resistencia a kanamicina) y *bla* (gen de resistencia a ampicilina). También se muestran los tamaños, tanto del gen a deleccionar como del inserto sustituyente del mismo.

Tras la conjugación de *E. coli* ET13567/pUZ8002/A6-7  $\Delta metE$  con la cepa *S. clavuligerus*  $\Delta metH$ , se obtuvieron diez exconjugantes resistentes a higromicina que se analizaron mediante PCR con los cebadores anteriormente indicados para la comprobación de los cósmidos recombinantes, del que sólo uno de ellos era doble recombinante. Este exconjugante fue comprobado mediante hibridación de tipo Southern (ver apartado 2.14 de materiales y métodos), la cual fue llevada a cabo usando cebadores que anillan en secuencias corriente arriba y corriente abajo al gen *metE* (Dir-Ext-*metE* y Rev-Ext-*metE*). El patrón de hibridación observado en la digestión de ADN genómico del exconjugante fue el esperado para la doble recombinación (figura 4.26).



**Figura 4.26. Comprobación mediante hibridación tipo Southern de la delección de  $\Delta metE$  en *S. clavuligerus*  $\Delta meth$ .** En la imagen se muestran los patrones de hibridación de ADN total digerido con *Sma*I del mutante deleciónado  $\Delta metE$  ( $\Delta E$ ) en comparación con la cepa parental *S. clavuligerus* (**WT**) utilizando como sonda un fragmento amplificado mediante PCR usando como cebadores Dir-Ext-metE y Rev-Ext-metE. A la derecha de la imagen se indican los tamaños de las bandas de hibridación. El marcador de tamaño molecular (**M**) corresponde al *DNA Molecular Weight Marker II, Digoxigenin-labeled*.

#### 4.5.2 Estudio del crecimiento de la cepa *S. clavuligerus* $\Delta meth$ -E

El crecimiento de las cepas, tanto del exconjugante *S. clavuligerus*  $\Delta meth$ -E como de la cepa silvestre *S. clavuligerus* ATCC 27064, se desarrollaron en medio sólido SA con y sin metionina (figura4.27).

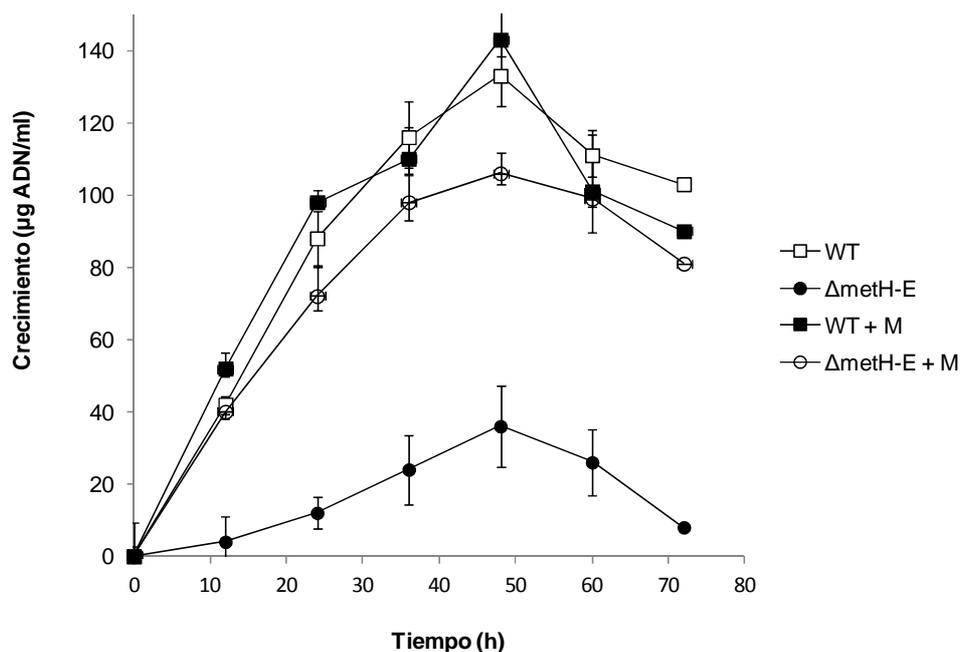


**Figura 4.27. Estudio del crecimiento de la cepa de *S. clavuligerus*  $\Delta meth$ -E.** **B:** crecimiento en placa de medio sólido SA. **C:** crecimiento en placa de medio sólido SA suplementado con metionina (40 mg/ml). En el panel **A** se indica el orden de siembra de las cepas, siendo WT la cepa silvestre.

Como se aprecia en la figura, tanto la cepa silvestre *S. clavuligerus* ATCC 27064 como el mutante *S. clavuligerus*  $\Delta meth$  crecieron correctamente en medio sólido SA. Pero en el caso del doble mutante *S. clavuligerus*  $\Delta meth$ -E se aprecia una clara falta de crecimiento aunque no

llega a ser total como se verá en medio líquido (ver más abajo). El crecimiento se restablece (figura 4.27.C) cuando se añade metionina (40 mg/ml) al medio SA.

En medio líquido SA y en el mismo medio líquido SA suplementado con metionina a una concentración suficiente para el desarrollo de los cultivos (40 mg/ml) se tomaron muestras a las 24, 36, 48, 60 y 72 horas (figura 4.28) para observar si existía una auxotrofia de metionina en el doble mutante *S. clavuligerus*  $\Delta$ metH-E.



**Figura 4.28. Estudio del crecimiento de la cepa *S. clavuligerus*  $\Delta$ metH-E.** Se muestra el crecimiento de la cepa silvestre (WT) y del mutante  $\Delta$ metH-E en medio SA con y sin metionina (M) (40 mg/ml).

En medio SA la cepa *S. clavuligerus*  $\Delta$ metH-E no es auxótrofa para metionina ya que se observa un crecimiento en medio mínimo SA sin metionina. Esto nos lleva a pensar que podría existir una vía de salvamento de metionina como el que existe en otras bacterias (Sufrin *et al.*, 1995; Sekowska y Danchin, 2002; Rodionov *et al.*, 2004; Sekowska *et al.*, 2004; Sekowska *et al.*, 2004). Cuando se le añade metionina (40 mg/ml) al medio SA la cepa  $\Delta$ metH-E crece de forma normal. En el caso de la cepa silvestre no se observa una alteración en el crecimiento debido a la presencia de metionina en el medio.

Se llevó a cabo el análisis de la producción tanto de ácido clavulánico, cefamicina C y holomicina en el exconjugante *S. clavuligerus*  $\Delta$ metH-E con el fin de determinar si existían diferencias en la producción de estos compuestos. El crecimiento de las cepas se desarrollaron

en medio definido SA líquido con y sin metionina (40 mg/ml). Se tomaron muestras a las 24, 48 y 72 horas para poder observar diferencias de producción en el tiempo.

La única diferencia respecto a la cepa silvestre *S. clavuligerus* ATCC 27064 es que el doble mutante *S. clavuligerus*  $\Delta$ metH-E produce holomicina al igual que el mutante *S. clavuligerus*  $\Delta$ metH (resultados no mostrados). La producción de holomicina observada en esta cepa doble mutante *S. clavuligerus*  $\Delta$ metH-E puede deberse a un aumento en la biosíntesis de cisteína. Esto se debería a que el azufre necesario para la síntesis de la cisteína proviene de la homocisteína. En este caso al estar bloqueada el final de la vía de biosíntesis normal de metionina que convierte la homocisteína a metionina, esta homocisteína acumulada pasaría a formar parte de la ruta de biosíntesis de cisteína, donde la homocisteína se condensa con la serina para producir cistationina, que es posteriormente fraccionada por la cistationina liasa para producir cisteína y  $\alpha$ -cetobutirato.

## **5. DISCUSIÓN GENERAL**



## 5.1. Aislamiento y caracterización de la agrupación génica para la biosíntesis de holomicina en *S. clavuligerus*.

Las librerías génicas o genotecas, herramientas útiles en estudios de Biología Molecular, son ampliamente utilizadas en el género *Streptomyces*, tanto para el aislamiento de secuencias génicas (Kharel *et al.*, 2010), como en proyectos de secuenciación de genomas (Bentley *et al.*, 2002; Ikeda *et al.*, 2003) y la obtención de mutantes delecionados mediante la tecnología ReDirect<sup>®</sup> (Gust *et al.*, 2002).

La construcción de la librería génica desarrollada en este trabajo, precisó de algunas modificaciones puntuales al protocolo original (*SuperCos1 Vector Kit, Stratagene*) como fueron: la optimización de la digestión del cósmido SuperCos 1 y de las digestiones parciales de ADN genómico y la optimización de la ultracentrifugación en gradiente de sacarosa. Tras su aplicación, se obtuvo un proceso reproducible y de resultados satisfactorios.

La principal complicación asociada al trabajo con una genoteca es el rastreo de la misma. Los métodos tradicionales de rastreo conllevan el análisis de un elevado número de clones, lo cual es muy laborioso y precisa de un notable gasto de material y de tiempo. Así, con el objetivo de facilitar el rastreo de las librerías génicas se han desarrollado diferentes sistemas, basados en la búsqueda mediante PCR, hibridación de colonias *in situ* o combinación de ambas técnicas. La organización de la genoteca realizada en esta tesis se diseñó de tal manera que permitiese el rastreo por diferentes técnicas. Dependiendo de las características de la secuencia objeto de búsqueda (genes de secuencia conocida o búsqueda de varias secuencias conjuntas), se puede aplicar el rastreo mediante PCR o mediante hibridación de colonias *in situ*, lo que aporta una mayor funcionalidad a dicha organización. Los clones de la genoteca de *S. clavuligerus* se organizaron en placas de microtitulación siguiendo una disposición piramidal, facilitando un rastreo sistemático en dos pasos (Martínez-Castro *et al.*, 2009).

El análisis de la genoteca de *S. clavuligerus*, previamente construida, empleando una sonda homóloga al gen *hlmA* (acetiltransferasa) permitió localizar la agrupación génica de holomicina. Este hecho nos permitió amplificar mediante PCR la primera sonda utilizada para analizar la genoteca de *S. clavuligerus*. El análisis de la genoteca con esta sonda y adicionales análisis posteriores llevaron al aislamiento de tres cósmidos, D7-8, D9-17 y H11-11, como

potenciales candidatos a albergar el agrupamiento génico. La secuenciación parcial de estos cósmidos mostró la existencia de la agrupación completa tan sólo en el cósmido D7-8, cuyo inserto comprendía una región de 35,2 kb, tamaño suficiente para contener todos los genes de biosíntesis de holomicina.

El agrupamiento génico para la biosíntesis de holomicina presente en *S. clavuligerus* consta de 13 marcos de lectura (genes). Este grupo está formado por un gen (*hlmE*) que codifica una NRPS con tres dominios: ciclación (Cy), adenilación (A) y tiolación (T); dos genes independientes que codifican tioesterasas (*hlmC* y *hlmK*); un gen independiente que posee un dominio de condensación (*hlmL*); un gen que codifica una proteína tipo globina (*hlmG*); una acil-CoA deshidrogenasa codificada por *hlmB*; tres oxidorreductasas dependientes de flavina (*hlmI*, *HlmD* y *hlmF*); un gen que codifica una acetiltransferasa (*hlmA*); dos proteínas reguladoras (*hlmJ*, *hlmM*) y, finalmente, un gen que codifica un transportador de tipo MFS (*hlmH*) (Li y Walsh, 2010; Robles-Reglero *et al.*, 2013). La confirmación de la implicación de estos genes en la biosíntesis de holomicina se consiguió mediante la inactivación de los genes *hlmA*, *hlmF* y *hlmE* en la cepa súper productora de holomicina *S. clavuligerus oppA2::aph*, dado que los mencionados mutantes presentaron un fenotipo no productor de dicho compuesto.

Además de la confirmación mediante la inactivación génica, se llevó a cabo la expresión heteróloga de dicha agrupación en una cepa hospedadora no productora de holomicina, *S. coelicolor* M1154. La cepa transformante *S. coelicolor* M1154 pVR-hol produce un compuesto bioactivo con el mismo tiempo de retención de HPLC y el mismo espectro de masas que el de la holomicina, aunque la producción de holomicina por *S. coelicolor* M1154 pVR-hol es unas 500 veces menor que en la cepa súper productora *S. clavuligerus oppA2::aph*. Un resultado similar se ha obtenido en *Streptomyces albus*; sin embargo, aunque la producción de holomicina por esta cepa hospedadora no se describió con detalle, la bioactividad de esta cepa parece ser también muy baja (Huang *et al.*, 2011). Se ha observado con frecuencia, un bajo nivel de expresión heteróloga de agrupaciones de genes en estas cepas de *S. coelicolor*, sin embargo, en casos particulares, tales como los de la coumermicina A1 o la clorobiocina, la expresión heteróloga en estas cepas de *S. coelicolor* produjo niveles de compuesto muy satisfactorios (Flinspach *et al.*, 2010). Una de las posibles causas para la baja actividad observada, podría ser el lento crecimiento de la cepa *S. coelicolor* M1154 pVR-hol debido a su sensibilidad elevada a la holomicina que produce. La interrupción del gen *hlmI*, que codifica una tiorredoxina disulfuro reductasa, resulta en un mutante sensible a holomicina (Li y Walsh, 2011). Dado que tanto la cepa *S. coelicolor* M1154 como la cepa transformante *S. coelicolor*

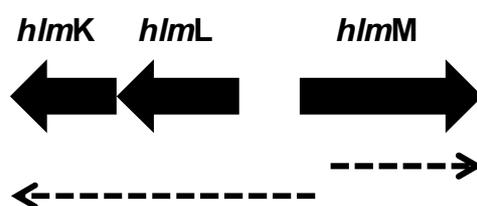
M1154 pVR-hol son igualmente sensibles a holomicina, puede concluirse que un gen independiente, situado fuera de la agrupación *hlm*, podría contribuir a la resistencia a holomicina en las cepas productoras de este compuesto.

Los experimentos de transcriptómica realizados en este trabajo demostraron que los genes *hlm* fueron claramente sobre expresados en las cepas productoras de holomicina en comparación con la cepa silvestre *S. clavuligerus* ATCC 27064. Según lo determinado mediante microarrays, los valores medios de Mc para la transcripción de los genes *hlm* fue de 6,25, tanto en la fase exponencial como en la fase estacionaria, para la cepa altamente productora de holomicina *S. clavuligerus oppA2::aph* (de la Fuente *et al.*, 2002), mientras que para las otras dos cepas de producción moderada,  $\Delta clcR::aph$  y  $\Delta ccaR::tsr$ , los valores de Mc no fueron tan elevados, 4,7 y 5,1. Estos resultados corresponden a un nivel medio de transcripción de 73, 26 y 34 veces mayor que en la cepa silvestre, respectivamente. Todos los genes *hlm* se transcriben en los mutantes productores de holomicina hasta un máximo de 172 veces más que en la cepa de tipo silvestre pero en el caso de *hlmI* (que codifica una tiorredoxina disulfuro reductasa) y *hlmM* (que codifica un regulador de tipo LuxR) su nivel de diferencia de transcripción no es tan elevada, siendo sus máximos de 27 y 8 veces superiores a la cepa silvestre. Por ello, las manchas de proteínas correspondientes a HlmD , HlmF y HlmG , visualizadas en el proteoma de la cepa mutante  $\Delta ccaR::tsr$ , no se detectaron en el proteoma de la cepa silvestre, es decir, se encuentran por debajo del nivel de detección.

Los análisis mediante la técnica RACE indicaron que las secuencias anotadas para los genes *hlmE*, *hlmI*, *hlmH* y *hlmM* son incorrectas. Los nuevos puntos de inicio de la transcripción están precedidos por secuencias de ADN -10 y -35 conservadas (Strohl, 1992). Gracias a este análisis RACE de la transcripción de la agrupación *hlm* se puede concluir que existen ocho transcritos, cuatro de ellos policistrónicos (*hlmB-E*, *hlmFG*, *hlmHI* y *hlmKL*) y cuatro monocistrónicos (*hlmA*, *hlmH*, *hlmJ* y *hlmM*). Resulta también llamativo el hecho de que el gen *hlmJ* y el policistrón *hlmFG* den lugar a transcritos sin secuencia líder. Los ARNm sin secuencia líder carecen de sitio de unión a los ribosomas, por lo que el inicio de su traducción responde a un mecanismo distinto al de los ARNm canónicos y basado en el reconocimiento directo por parte del ribosoma del codón de inicio del gen, de manera dependiente del ARNt de iniciación (Moll *et al.*, 2002; Moll *et al.*, 2004; Laursen *et al.*, 2005). Se ha especulado con la posibilidad de que los genes que dan lugar a este tipo de transcritos, dada la particular regulación a la que está sujeta su traducción, estén relacionados con la respuesta de las células a condiciones fisiológicas particulares. En el caso concreto de *Streptomyces* se conocen muchos ARNm sin

secuencia líder vinculados a mecanismos de resistencia a antibióticos y al metabolismo secundario (Moll *et al.*, 2002), siendo el gen *phoP* de *S. coelicolor* uno de los más paradigmáticos, dada la importancia del regulador global que codifica (Sola-Landa *et al.*, 2005).

Este patrón de transcripción de los genes *hlm* sugiere que la interrupción del gen *hlmI* realizada por Huang *et al.* en 2011 (Huang *et al.*, 2011) y en el que se determina la ausencia total de producción de holomicina, podría ser debido a que dicha interrupción estaría afectando a la expresión de los genes *hlmK* y *hlmL* que forman el policistrón *hlmKL* (figura 5.1).



**Figura 5.1. Transcritos *hlmLK* y *hlmM*.** En la imagen se muestran los genes y las transcripciones detectadas mediante la técnica RACE. Las flechas discontinuas indican los transcritos de la agrupación. La orientación de la transcripción se indica con flechas.

## 5.2. Biosíntesis de metionina: *riboswitch* en *S. clavuligerus*

El trabajo realizado por Vitreschak *et al.* (2003), identifica el elemento B12 como una estructura de ARN altamente conservada y ampliamente distribuida en la región 5'-UTR de genes relacionados con la biosíntesis de la vitamina B12 en diversas bacterias. Concretamente, el elemento B12 se describe como una secuencia consenso para el fenómeno del *riboswitch* mediado por vitamina B12, que consiste en una secuencia corta conservada a la que denominaron *caja B12* y un conjunto de palíndromos que dan lugar a bucles en horquilla distribuidos a lo largo de la secuencia (Vitreschak *et al.*, 2003). Puesto que en *S. clavuligerus*, la región 5'-UTR del gen *metE*, que codifica una metionina sintetasa independiente de B12, contiene un *riboswitch* mediado por vitamina B12 similar a los encontrados en otras bacterias (Vitreschak *et al.*, 2003; Borovok *et al.*, 2006), en este trabajo se estudia el papel de la coenzima B12 en la regulación de la transcripción del gen *metE* en *S. clavuligerus*. La presencia de dicha *caja B12* (aproximadamente 350 nucleótidos) como elemento de control genético permitiría a la coenzima B12 controlar su expresión mediante una inhibición de la transcripción del mismo. Estos estudios se derivan del hecho de que las bacterias que poseen enzimas que

llevan a cabo la misma función (isoenzimas), unas dependientes de B12 y las otras independientes de B12, se regulan mediante *riboswitches* (Rodionov *et al.*, 2003).

En *S. clavuligerus* ATCC 27064, el nivel de producción de B12 endógeno no es lo suficientemente alto como para inhibir la transcripción del gen *metE* a través del *riboswitch*, aunque sí se sintetizan niveles de coenzima B12 suficientes para permitir una actividad enzimática de MetH completamente funcional. La suplementación del cultivo con coenzima B12 exógeno supone una represión de la expresión del gen que codifica la isoenzima independiente de B12, *metE*.

Para analizar el fenómeno de *riboswitch* mediado por B12 sobre el gen *metE*, se aplicó la técnica cualitativa de RT-PCR, trabajando sobre la cepa *S. clavuligerus*  $\Delta$ *metH*, que carece de la actividad metionina sintasa MetH. En los cinco clones  $\Delta$ *metH* obtenidos se observó la existencia de colonias resistentes a la inhibición de la transcripción mediada por B12. Debido a que la región 5'-UTR del gen *metE* contiene un *riboswitch* mediado por B12 que controla su transcripción, se asume una alteración en el propio *riboswitch* como causante de la resistencia a la adición de B12 observada en los mutantes  $\Delta$ *metH*. Existen descritas en la literatura mutaciones puntuales en regiones implicadas en la unión y el reconocimiento de la vitamina B12 (Nahvi *et al.*, 2002; Vitreschak *et al.*, 2003), como en el caso del gen *metE* en *Mycobacterium tuberculosis*, donde una mutación puntual en la región del *riboswitch* suprime el efecto de la inhibición mediada por B12 en la transcripción de *metE* (Warner *et al.*, 2007).

Todos estos estudios establecen que los *riboswitch* de B12 son un elemento de control importante en la regulación génica de *Streptomyces* ya que todo indica a que cada uno de estos sistemas existe para funcionar bajo diferentes condiciones ambientales. Es conocido que en *S. coelicolor* el gen *nrkJ*, que codifica una ribonucleótido reductasa (RNR) de clase II dependiente de B12, pertenece al sistema primario para permitir la recuperación eficiente de crecimiento después de la privación de oxígeno, mientras que la RNR de clase I (independiente de B12 pero regulada mediante un *riboswitch* de B12) codificada por el gen *nrkAB* puede funcionar como un sistema de copia de seguridad cuando la RNR de clase II está inactiva, por ejemplo, cuando la biosíntesis de vitamina B12 es limitada debido a la insuficiente disponibilidad de cobalto o de precursores biosintéticos para B12 (Borovok *et al.*, 2006). De manera similar en *S. clavuligerus*, la metionina sintasa dependiente de B12 codificada por el gen *metH* puede funcionar como metionina sintasa primaria, mientras que la metionina sintasa independiente de B12 codificada por el gen *metE* se establecería como sistema de copia de seguridad cuando la isoenzima MetH se encuentre inactiva y/o la coenzima B12 sea

limitante debido a insuficiente biosíntesis, transporte o deficiencia de cobalto en el medio de cultivo. Y, aunque la reacción catalizada por la isoenzima MetH y la coenzima B12 en *E. coli* es unas cien veces más rápida que la catalizada por la isoenzima MetE (Greene, 1996), la presencia de estas vías alternativas ofrece la flexibilidad y la adaptación metabólica eficiente que poseen los estreptomicetos al hábitat de suelos oligotróficos proporcionándoles una ventaja competitiva.

Los *riboswitch* son hoy en día reconocidos como un importante sistema de control genético, ya que regulan genes fundamentales y vías metabólicas en procariontes, incluyendo bacterias patógenas humanas como son *Listeria* y algunas micobacterias. Por todo ello, los *riboswitch* se han convertido en objetivos potenciales para el desarrollo de nuevas clases de agentes antimicrobianos, compuestos que se asemejan estrechamente al ligando natural del *riboswitch* y causan la interrupción inducida de la expresión de genes metabólicos esenciales (Sudarsan *et al.*, 2005; Blount y Breaker, 2006; Cegelski *et al.*, 2008). Adicionalmente, la comprensión de los mecanismos de *riboswitch* puede conducir a la ingeniería genética de elementos de control genético nuevos que sean más simples y más versátiles que los sistemas que existen en la actualidad a base de proteínas (Winkler y Breaker, 2003; Winkler y Breaker, 2005; Bauer y Sues, 2006).



## **6. CONCLUSIONES**



1. El agrupamiento génico responsable de la biosíntesis de holomicina en *S. clavuligerus* ATCC 27064, consta de 13 genes (de *hlmA* a *hlmM*).
2. Debido a la sensibilidad a la holomicina de la cepa usada para la expresión heteróloga, un gen independiente (o varios de ellos, interactuando o no), situado fuera de la agrupación *hlm*, debe contribuir a la resistencia a holomicina en las cepas productoras de este compuesto.
3. Los mutantes  $\Delta hlmA$ ,  $\Delta hlmF$  y  $\Delta hlmE$  obtenidos mediante la inactivación de los genes *hlmA*, *hlmF* y *hlmE* respectivamente, no producen holomicina ni tampoco se ha detectado la presencia de intermediarios de la ruta.
4. Los genes *hlm* están sobre expresados en las cepas productoras de holomicina *S. clavuligerus oppA2::aph*,  $\Delta clcR::aph$  y  $\Delta ccaR::tsr$  en comparación con la cepa silvestre *S. clavuligerus* ATCC 27064, donde el nivel medio de transcripción es de 73, 26 y 34 veces mayor que en la cepa silvestre, respectivamente.
5. Todos los genes *hlm* se transcriben en los mutantes productores de holomicina hasta un máximo de 172 veces más que en la cepa de tipo silvestre. En el caso de *hlmI* (que codifica una tiorredoxina disulfuro reductasa) y *hlmM* (que codifica un regulador de tipo LuxR) su nivel de diferencia de transcripción no es tan elevada, siendo sus máximos de 27 y 8 veces superiores a la cepa silvestre.
6. Las secuencias de los genes *hlmE*, *hlmI*, *hlmH* y *hlmM* previamente anotadas en las bases de datos *Broad Institute* y *StrepDB* son incorrectas.
7. El perfil de transcripción de la agrupación *hlm* en *S. clavuligerus* consta de ocho transcritos, cuatro de ellos policistrónicos (*hlmB-E*, *hlmFG*, *hlmHI* y *hlmKL*) y cuatro monocistrónicos (*hlmA*, *hlmH*, *hlmJ* y *hlmM*).
8. *S. clavuligerus* ATCC 27064 posee un fenómeno de *riboswitch* mediado por coenzima B12 sobre el gen *metE* en la cepa. Este es el primer caso demostrado en esta especie.
9. El nivel de producción de B12 endógeno en *S. clavuligerus* ATCC 27064, no es lo suficientemente alto como para inhibir la transcripción del gen *metE* a través del

*riboswitch*, aunque sí que sintetiza suficiente coenzima B12 como para permitir una actividad enzimática de MetH completamente funcional.



## **7. ANEXOS**



## 7.1. Oligonucleótidos usados para las RT-PCR de Holomicina

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Análisis de la región
LRT-PCR03483	CGTCTCCATCGTCAACTACG	Primer directo para el entorno de <i>hlmA</i>
RRT-PCR03483	ACCAGGCCGTCGAACAAC	Primer reverso para el entorno de <i>hlmA</i>
RT-Dir-85	AGATGGTCCGTACGTTCTG	Primer directo para el entorno de <i>hlmB</i>
RT-Rev-85	GCCATTGGTGATGAAGACCT	Primer reverso para el entorno de <i>hlmB</i>
RT-Dir-86	GGTCCGGCTCTACTGTTTT	Primer directo para el entorno de <i>hlmC</i>
RT-Rev-86	GTCATCGTGGTGTGGACAG	Primer reverso para el entorno de <i>hlmC</i>
RT-Dir-87	AGGCTTCAACTGGGACCAC	Primer directo para el entorno de <i>hlmD</i>
RT-Rev-87	AGTTTGCGTACGTCGGTGAG	Primer reverso para el entorno de <i>hlmD</i>
DIR_RT_88	GACGAGAGTGCCGGTTCC	Primer directo para el entorno de <i>hlmE</i>
REV_RT_88	AAGTCTGCGTGAAGTACC	Primer reverso para el entorno de <i>hlmE</i>
RT-Dir-89	AAATCCGATCCCCTCTCCTT	Primer directo para el entorno de <i>hlmF</i>
RT-Rev-89	ACAGTCGGCTTCTCCACAT	Primer reverso para el entorno de <i>hlmF</i>
RT-Dir-90	GACATTCCGACGATGTACGA	Primer directo para el entorno de <i>hlmG</i>
RT-Rev-90	GAACCCCATTCGATATACGC	Primer reverso para el entorno de <i>hlmG</i>
RT-Dir-91	GTACGGGCTTCCCTACAGC	Primer directo para el entorno de <i>hlmH</i>
RT-Rev-91	TAGCTGCCGATCGAGATACC	Primer reverso para el entorno de <i>hlmH</i>
RT-Dir-92	ATACGGGGCGGAGTTCATAC	Primer directo para el entorno de <i>hlmI</i>
RT-Rev-92	TTGACGGTCCCCTCGAT	Primer reverso para el entorno de <i>hlmI</i>
RT-Dir-93	AAGCAATCACCTGCCATCTC	Primer directo para el entorno de <i>hlmJ</i>
RT-Rev-93	CACTCGTATCCCTCGTGGTT	Primer reverso para el entorno de <i>hlmJ</i>
RT-Dir-94	GTCGGTACGCCCTGTTCTGTC	Primer directo para el entorno de <i>hlmK</i>
RT-Rev-94	CGCATCAGCGGCAGTAG	Primer reverso para el entorno de <i>hlmK</i>
RT-Dir-95	ATGTCCACGAAGACCGAAGA	Primer directo para el entorno de <i>hlmL</i>
RT-Rev-95	GAACAGTTCGGTGACGACAG	Primer reverso para el entorno de <i>hlmL</i>
RT-Dir-96	TATGGCTGGGATTCTCTTG	Primer directo para el entorno de <i>hlmM</i>
RT-Rev-96	CCACGGACAAGGAACAGAGT	Primer reverso para el entorno de <i>hlmM</i>
DIR_RT_92-91	GCGACGGACTCCTGACC	Primer directo para el entorno intergénico <i>hlmI-hlmH</i>
REV_RT_92-91	CGATCAGGGTGATGGTGAA	Primer reverso para el entorno intergénico <i>hlmI-hlmH</i>
DIR_RT_85-83	GGCTACGGCTACCTGAAAG	Primer directo para el entorno intergénico <i>hlmB-hlmA</i>
REV_RT_85-83	TCGTCGTAGTTGACGATGGA	Primer reverso para el entorno intergénico <i>hlmB-hlmA</i>

## 7.2. Oligonucleótidos utilizados en experimentos ReDirect, expresión heteróloga y comprobaciones

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Análisis de la región
sense PRM	GCCGCCCAACCTCCGTA	Primer directo para la sonda de <i>hlmA</i>
antisense PRM	TGCCGGCCCAACCACCC	Primer reverso para la sonda de <i>hlmA</i>
UPΔ03483	TTCTGGCCCGGCGGACCAGAAGGGACCA CCGCTTCATGATTCCGGGGATCCGTCGACC	Primer directo para la delección de <i>hlmA</i> mediante la técnica del ReDirect.
DWΔ03483	AAGAGGTTACGGAGTCCCGGGCTCACTC GGCCCGGTCATGTAGGCTGGAGCTGCTT C	Primer reverso para la delección de <i>hlmA</i> mediante la técnica del ReDirect.
exDir03483	GCCGCCCAACCTCCGTA	Primer directo para la comprobación del ReDirect de <i>hlmA</i>
exRev03483	TGCCGGCCCAACCACCC	Primer reverso para la comprobación del ReDirect de <i>hlmA</i>
Apratotal	GGGGCCGGACGCTACGGAAG	Primer directo para comprobación del casete de apramicina
L-Southern-03483	AGCAGGGTCCAGACGATCTA	Primer directo para la comprobación por <i>Southern</i> de <i>hlmA</i>
R-Southern-03483	GACGAGGTGCTGAAGCTGTT	Primer reverso para la comprobación por <i>Southern</i> de <i>hlmA</i>
ReD-Di03489	GTGTTGACCGGGTCATGAATCCCCCTCATC ATTTCGCCATGATTCCGGGGATCCGTCGACC	Primer directo para la delección de <i>hlmF</i> mediante la técnica del ReDirect.
ReD-Re03489	CACCGACCCATTCTACATCGTCGGAATGTC CTCCGCCATCATGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Primer reverso para la delección de <i>hlmF</i> mediante la técnica del ReDirect.
Ext-Dir-89	CGGGTCTCGTAGAAGC	Primer directo para la comprobación del ReDirect de <i>hlmF</i>
Ext-Rev-89	GGCACGTCCTTCATCTTCTC	Primer reverso para la comprobación del ReDirect de <i>hlmF</i>
ReD-Di03488	TGACCATTGGTGGTACCGAAGGGTCTTC GGTCAGTTCTGATTCCGGGGATCCGTCGACC	Primer directo para la delección de <i>hlmE</i> mediante la técnica del ReDirect.
ReD-Re03488	TGCCCGGGTGGGCTCCGTGAGGCCGTGCG CCGTTCCGCTCATGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Primer reverso para la delección de <i>hlmE</i> mediante la técnica del ReDirect.
Ext-Dir-88	CTCGATCCGGCGGTAGTA	Primer directo para la comprobación del ReDirect de <i>hlmE</i>
Ext-Rev-88	GCGACAGGAACGAAGTGG	Primer reverso para la comprobación del ReDirect de <i>hlmE</i>
UpG-Sco-F	CCTACGAGATCGTCTGGAG	Primer directo para la región <i>gabD-argG</i> de <i>S. coelicolor</i>
UpG-Sco-R	ATGATCCGGTCTCTGATCTG	Primer reverso para la región <i>gabD-argG</i> de <i>S. coelicolor</i>
UpG-Sci-F	GGATCGTGGACATCCTCAAC	Primer directo para la región <i>gabG-argH</i> de <i>S. clavuligerus</i>
UpG-Sci-R	CTCGTACACCTCACGGACT	Primer reverso para la región <i>gabG-argH</i> de <i>S. clavuligerus</i>
sonda-Di-metH	ACCTCGTGCATCATCCTC	Primer directo para la sonda de <i>metH</i>
sonda-Re-metH	AGTTCGAGGTAGTCGCGGTA	Primer reverso para la sonda de <i>metH</i>
ReD-Di metH	GCAAAGCCGACAGCCGTGCGATCCCAGGGA GCACATTCCATGATTCCGGGGATCCGTCACC	Primer directo para la delección de <i>metH</i> mediante la técnica del ReDirect.
ReD-Re metH	CCGGGATCACTGGGATCACCAGGGGCAC CGGGCTCCTCATGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Primer reverso para la delección de <i>metH</i> mediante la técnica del ReDirect.
Ext-Dir-metH	ACGGACACAATCTCGACCTC	Primer directo para la comprobación del ReDirect de <i>metH</i>
Ext-Rev-metH	ACTGGATGTTCTTCGCCATC	Primer reverso para la comprobación del ReDirect de <i>metH</i>
sonda-Di-metE	CGGGAGCTGAAGAAGCCAT	Primer directo para la sonda de <i>metE</i>
sonda-Re-metE	ATCTCGGTGGTCTTCTGGCG	Primer reverso para la sonda de <i>metE</i>
ReD-Dir metE	GGGTTCTCAGGGATTCATCTCGGAAGGA GATCTCCGTGATTCCGGGGATCCGTCGACC	Primer directo para la delección de <i>metE</i> mediante la técnica del ReDirect.
ReD-Rev metE	GCACCGTGGGTGCCCGGCCCGGGCGGT GTGCCGGATCATGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Primer reverso para la delección de <i>metE</i> mediante la técnica del ReDirect.
Dir-Ext-metE	ACCTGCTGATACGGGATGTC	Primer directo para la comprobación del ReDirect de <i>metE</i>
Rev-Ext-metE	TCGCTCTACGACGAGTCAA	Primer reverso para la comprobación del ReDirect de <i>metE</i>

### 7.3. Oligonucleótidos usados para las RT-PCR de Riboswitch

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Análisis de la región
RT-Di-metH	CTGGGACGACTGTGTGGAG	Primer directo para el entorno de <i>metH</i>
RT-Re-metH	GAGGGTGTTCGATGAGGATGT	Primer reverso para el entorno de <i>metH</i>
RT-Di-metE	GACCCGTCACCTATCTGCTG	Primer directo para el entorno de <i>metE</i>
RT-Re-metE	AGGGTGGACAGGGACTTCTC	Primer reverso para el entorno de <i>metE</i>

## **8. BIBLIOGRAFÍA**



**Aharonowitz Y, Cohen G, Martin JF. 1992.** Penicillin and cephalosporin biosynthetic genes: structure, organization, regulation, and evolution. *Annual Reviews in Microbiology* **46**: 461-495.

**Aharonowitz Y. 1980.** Nitrogen metabolite regulation of antibiotic biosynthesis. *Annual Reviews in Microbiology* **34**: 209-233.

**Aharonowitz Y, Demain AL. 1979.** Nitrogen nutrition and regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. *Canadian journal of microbiology* **25**: 61-67.

**Aidoo KA, Wong A, Alexander DC, Rittammer RA, Jensen SE. 1994.** Cloning, sequencing and disruption of a gene from *Streptomyces clavuligerus* involved in clavulanic acid biosynthesis. *Gene* **147**: 41-46.

**Alduina, R; Piccolo, L; D'Alia, D; Ferraro, C; Gunnarsson, N; Donadio, S; Puglia, AM. 2007.** Phosphate-controlled regulator for the biosynthesis of the dalbavancin precursor A40926. *Journal of Bacteriology* **189**: 8120-8129.

**Alexander DC, Jensen SE. 1998.** Investigation of the *Streptomyces clavuligerus* cephamycin C gene cluster and its regulation by the CcaR protein. *Journal of Bacteriology* **180**: 4068-4079.

**Allan EJ, Prosser J. 1983.** Mycelial growth and branching of *Streptomyces coelicolor* A3 (2) on solid medium. *Journal of general microbiology* **129**: 2029-2036.

**Álvarez-Álvarez, R; Rodríguez-García, A; Martínez-Burgo, Y; Robles-Reglero, V; Santamarta, I; Pérez-Redondo, R; Martín, JF; Liras, P. 2013.** A 1.8-Mb-reduced *Streptomyces clavuligerus* genome: relevance for secondary metabolism and differentiation. *Applied Microbiology and Biotechnology* : 1-13.

**Ames TD, Breaker RR. 2010.** Bacterial riboswitch discovery and analysis. *The Chemical Biology of Nucleic Acids* : 433-454.

**Aminov RI. 2009.** The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environmental microbiology* **11**: 2970-2988.

**Anderson TB, Brian P, Champness WC. 2001.** Genetic and transcriptional analysis of absA, an antibiotic gene cluster-linked two-component system that regulates multiple antibiotics in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular microbiology* **39**: 553-566.

**Antón N, Mendes MV, Martín JF, Aparicio JF. 2004.** Identification of PimR as a positive regulator of pimaricin biosynthesis in *Streptomyces natalensis*. *Journal of Bacteriology* **186**: 2567-2575.

**Apel AK, Sola-Landa A, Rodríguez-García A, Martín JF. 2007.** Phosphate control of phoA, phoC and phoD gene expression in *Streptomyces coelicolor* reveals significant differences in binding of PhoP to their promoter regions. *Microbiology* **153**: 3527-3537.

- Arakawa K, Mochizuki S, Yamada K, Noma T, Kinashi H. 2007.**  $\gamma$ -Butyrolactone autoregulator-receptor system involved in lankacidin and lankamycin production and morphological differentiation in *Streptomyces rochei*. *Microbiology* **153**: 1817-1827.
- Arias P, Fernández-Moreno MA, Malpartida F. 1999.** Characterization of the pathway-specific positive transcriptional regulator for actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) as a DNA-binding protein. *Journal of Bacteriology* **181**: 6958-6968.
- Asturias JA, Liras P, Martín JF. 1990.** Phosphate control of pabS gene transcription during candicidin biosynthesis. *Gene* **93**: 79-84.
- Atsushi M, Soon-Kwang H, Hiroshi I, Sueharu H, Teruhiko B. 1994.** Phosphorylation of the AfsR protein involved in secondary metabolism in *Streptomyces* species by a eukaryotic-type protein kinase. *Gene* **146**: 47-56.
- Baltz RH, McHenney MA, Cantwell CA, Queener SW, Solenberg PJ. 1997.** Applications of transposition mutagenesis in antibiotic producing streptomycetes. *Antonie van Leeuwenhoek* **71**: 179-187.
- Bao K, Cohen SN. 2003.** Recruitment of terminal protein to the ends of *Streptomyces* linear plasmids and chromosomes by a novel telomere-binding protein essential for linear DNA replication. *Genes & development* **17**: 774-785.
- Barredo J, Ozcengiz G, Demain AL. 2014.** Advances in Beta-Lactam Antibiotics. In: Anonymous *Antimicrobial Compounds*. Springer, 115-147.
- Barrick J, Breaker R. 2007.** The distributions, mechanisms, and structures of metabolite-binding riboswitches. *Genome biology* **8**: R239.
- Barrick, JE; Corbino, KA; Winkler, WC; Nahvi, A; Mandal, M; Collins, J; Lee, M; Roth, A; Sudarsan, N; Jona, I. 2004.** New RNA motifs suggest an expanded scope for riboswitches in bacterial genetic control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 6421-6426.
- Bauer G, Suess B. 2006.** Engineered riboswitches as novel tools in molecular biology. *Journal of Biotechnology* **124**: 4-11.
- Benders GA, Powell BC, Hutchison CA. 2005.** Transcriptional analysis of the conserved ftsZ gene cluster in *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma pneumoniae*. *Journal of Bacteriology* **187**: 4542-4551.
- Bentley, SD; Brown, S; Murphy, LD; Harris, DE; Quail, MA; Parkhill, J; Barrell, BG; McCormick, JR; Santamaria, RI; Losick, R. 2004.** SCP1, a 356 023 bp linear plasmid adapted to the ecology and developmental biology of its host, *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Molecular microbiology* **51**: 1615-1628.

**Bentley, SD; Chater, KF; Cerdeno-Tarraga, A-M; Challis, GL; Thomson, NR; James, KD; Harris, DE; Quail, MA; Kieser, H; Harper, D. 2002.** Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Nature* **417**: 141-147.

**Bibb MJ, Molle V, Buttner MJ. 2000.** BldN, an Extracytoplasmic Function RNA Polymerase Sigma Factor Required for Aerial Mycelium Formation in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Journal of Bacteriology* **182**: 4606-4616.

**Bibb M. 1996.** The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A 3 (2). *Microbiology* **142**: 1335-1344.

**Bibb MJ. 2005.** Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Current opinion in microbiology* **8**: 208-215.

**Bignell DR, Warawa JL, Strap JL, Chater KF, Leskiw BK. 2000.** Study of the bldG locus suggests that an anti-anti-sigma factor and an anti-sigma factor may be involved in *Streptomyces coelicolor* antibiotic production and sporulation. *Microbiology* **146**: 2161-2173.

**Blanco G, Rodicio MR, Puglia AM, Méndez C, Thompson CJ, Salas JA. 1994.** Synthesis of ribosomal proteins during growth of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular microbiology* **12**: 375-385.

**Block KF, Hammond MC, Breaker RR. 2010.** Evidence for widespread gene control function by the ydaO riboswitch candidate. *Journal of Bacteriology* **192**: 3983-3989.

**Blount KF, Breaker RR. 2006.** Riboswitches as antibacterial drug targets. *Nature biotechnology* **24**: 1558-1564.

**Borovok I, Gorovitz B, Yanku M, Schreiber R, Gust B, Chater K, Aharonowitz Y, Cohen G. 2004.** Alternative oxygen-dependent and oxygen-independent ribonucleotide reductases in *Streptomyces*: cross-regulation and physiological role in response to oxygen limitation. *Molecular microbiology* **54**: 1022-1035.

**Borovok I, Gorovitz B, Schreiber R, Aharonowitz Y, Cohen G. 2006.** Coenzyme B12 controls transcription of the *Streptomyces* class Ia ribonucleotide reductase nrdABS operon via a riboswitch mechanism. *Journal of Bacteriology* **188**: 2512-2520.

**Borsuk P, Przykorska A, Blachnio K, Koper M, Pawlowicz JM, Pekala, M, Weglenski P. 2007.** L-arginine influences the structure and function of arginase mRNA in *Aspergillus nidulans*. *Biological chemistry* **388**: 135-144.

**Bouras N, Merrouche R, Lamari L, Mathieu F, Sabaou N, Lebrihi A. 2008.** Precursor-directed biosynthesis of new dithiolopyrrolone analogs by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Process Biochemistry* **43**: 1244-1252.

- Bouras N, Mathieu F, Sabaou N, Lebrihi A. 2007.** Influence on dithiopyrrolone antibiotic production by organic acids in *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Process Biochemistry* **42**: 925-933.
- Bourn WR, Babb B. 1995.** Computer assisted identification and classification of streptomycete promoters. *Nucleic acids research* **23**: 3696-3703.
- Braña AF, Wolfe S, Demain AL. 1986.** Relationship between nitrogen assimilation and cephalosporin synthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Archives of Microbiology* **146**: 46-51.
- Breaker RR. 2012.** Riboswitches and the RNA World. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **4**.
- Breaker RR. 2011.** Prospects for riboswitch discovery and analysis. *Molecular cell* **43**: 867-879.
- Brian P, Riggle PJ, Santos RA, Champness WC. 1996.** Global negative regulation of *Streptomyces coelicolor* antibiotic synthesis mediated by an *absA*-encoded putative signal transduction system. *Journal of Bacteriology* **178**: 3221-3231.
- Broad Institute (Cambridge).** Genoma *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064. **2008**.
- Brown AG, Corbett DF, Eglington AJ, Howarth TT. 1977.** Structures of olivanic acid derivatives MM 4550 and MM 13902; two new, fused  $\beta$ -lactams isolated from *Streptomyces olivaceus*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* : 523-525.
- Brown D, Evans JR, Fletton RA. 1979.** Structures of three novel  $\beta$ -lactams isolated from *Streptomyces clavuligerus*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* : 282-283.
- Brown AG, Butterworth D, Cole M. 1976.** Naturally-occurring beta-lactamase inhibitors with antibacterial activity. *The Journal of antibiotics* **29**: 668-669.
- Bullock WO, Fernandez JM, Short JM. 1987.** XLI-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with P-galactosidase selection. *BioTechniques* **5**: 376-378.
- Burton K. 1968.** Determination of DNA concentration with diphenylamine. *Methods Enzymol.* **12**: 163-166.
- Carl B, Arnold A, Hauer B, Fetzner S. 2004.** Sequence and transcriptional analysis of a gene cluster of *Pseudomonas putida* 86 involved in quinoline degradation. *Gene* **331**: 177-188.
- Carmody M, Byrne B, Murphy B, Breen C, Lynch S, Flood E, Finnan S, Caffrey P. 2004.** Analysis and manipulation of amphotericin biosynthetic genes by means of modified phage KC515 transduction techniques. *Gene* **343**: 107-115.
- Cegelski L, Marshall GR, Eldridge GR, Hultgren SJ. 2008.** The biology and future prospects of antivirulence therapies. *Nature Reviews Microbiology* **6**: 17-27.
- Celmer WD, Solomon IA. 1955.** The structures of thiolutin and aureothricin, antibiotics containing a unique pyrrolinodithiol nucleus. *J Amer Chem Soc* **77**: 2861-2865.

**Celmer WD, Tanner FWJ, Harfenist M, Lees TM, Solomons IA. 1952.** Characterization of the antibiotic thiolutin and its relationship with aureothricin. *J Amer Chem Soc* **74**: 6304-6305.

**Challis GL. 2008.** Mining microbial genomes for new natural products and biosynthetic pathways. *Microbiology* **154**: 1555-1569.

**Challis GL, Hopwood DA. 2003.** Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 14555-14561.

**Chang H, Chen M, Shieh Y, Bibb M, Chen C. 1996.** The cutRS signal transduction system of *Streptomyces lividans* represses the biosynthesis of the polyketide antibiotic actinorhodin. *Molecular microbiology* **21**: 1075.

**Chang P, Cohen SN. 1994.** Bidirectional replication from an internal origin in a linear *Streptomyces* plasmid. *Science* **265**: 952-954.

**Charusanti P, Fong NL, Nagarajan H. 2012.** Exploiting adaptive laboratory evolution of *Streptomyces clavuligerus* for antibiotic discovery and overproduction. *PLoS one* **7**: e33727.

**Chater KF, Chandra G. 2008.** The use of the rare UUA codon to define “expression space” for genes involved in secondary metabolism, development and environmental adaptation in *Streptomyces*. *The Journal of Microbiology* **46**: 1-11.

**Chater KF, Chandra G. 2006.** The evolution of development in *Streptomyces* analysed by genome comparisons. *FEMS microbiology reviews* **30**: 651-672.

**Chater KF. 1993.** Genetics of differentiation in *Streptomyces*. *Annual Reviews in Microbiology* **47**: 685-711.

**Chater KF, Hopwood DA, Kieser T, Thompson CJ. 1982.** Gene cloning in *Streptomyces*. *Current topics in microbiology and immunology* **96**: 69-95.

**Chater KF, Wilde LC. 1980.** *Streptomyces albus* G mutants defective in the SalGI restriction-modification system. *Journal of general microbiology* **116**: 323-334.

**Cheah MT, Wachter A, Sudarsan N, Breaker RR. 2007.** Control of alternative RNA splicing and gene expression by eukaryotic riboswitches. *Nature* **447**: 497-500.

**Chen CW, Huang C, Lee H, Tsai H, Kirby R. 2002.** Once the circle has been broken: dynamics and evolution of *Streptomyces* chromosomes. *TRENDS in Genetics* **18**: 522-529.

**Cheng Y, Fang A, Demain A. 1995.** Effect of amino acids on rapamycin biosynthesis by *Streptomyces hygroscopicus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **43**: 1096-1098.

**Chorin AC, Bijeire L, Monje MC, Baziard G, Lebrihi A, Mathieu F. 2009.** Expression of pyrrothine N-acyltransferase activities in *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137: new insights into dithiopyrrolone antibiotic biosynthetic pathway. *Journal of applied microbiology* **107**: 1751-1762.

**Clarke L, Carbon J. 1976.** A colony bank containing synthetic Col EI hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. 1976. *Biotechnology (Reading, Mass.)* **24**: 179-187.

**Darbon E, Martel C, Nowacka A, Pegot S, Moreau PL, Virolle M. 2012.** Transcriptional and preliminary functional analysis of the six genes located in divergence of *phoR/phoP* in *Streptomyces lividans*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **95**: 1553-1566.

**Datsenko KA, Wanner BL. 2000.** One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 6640-6645.

**Daza A, Martin JF, Dominguez A, Gil JA. 1989.** Sporulation of several species of *Streptomyces* in submerged cultures after nutritional downshift. *Journal of general microbiology* **135**: 2483-2491.

**de la Fuente A, Lorenzana LM, Martin JF, Liras P. 2002.** Mutants of *Streptomyces clavuligerus* with disruptions in different genes for clavulanic acid biosynthesis produce large amounts of holomycin: possible cross-regulation of two unrelated secondary metabolic pathways. *Journal of Bacteriology* **184**: 6559-6565.

**De Schrijver A, De Mot R. 1999.** A subfamily of MalT-related ATP-dependent regulators in the LuxR family. *Microbiology* **145**: 1287-1288.

**Del Sol R, Pitman A, Herron P, Dyson P. 2003.** The product of a developmental gene, *crgA*, that coordinates reproductive growth in *Streptomyces* belongs to a novel family of small actinomycete-specific proteins. *Journal of Bacteriology* **185**: 6678-6685.

**Demain A. 1999.** Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* **52**: 455-463.

**Demain AL, Fang A. 1995.** Emerging Concepts of Secondary Metabolism in Actinomycetes. *Actinomycetologia* **9**: 98-117.

**D'Onofrio A, Crawford JM, Stewart EJ, D'Onofrio A, Crawford JM, Stewart EJ, Witt K, Gavrish E, Epstein S, Clardy J, Lewis K. 2010.** Siderophores from neighboring organisms promote the growth of uncultured bacteria. *Chemistry & biology* **17**: 254-264.

**Doran JL, Leskiw B, Aippersbach S, Jensen SE. 1990.** Isolation and characterization of a beta-lactamase-inhibitory protein from *Streptomyces clavuligerus* and cloning and analysis of the corresponding gene. *Journal of Bacteriology* **172**: 4909-4918.

**Egan LA, Busby RW, Iwata-Reuyl D, Townsend CA. 1997.** Probable role of clavaminic acid as the terminal intermediate in the common pathway to clavulanic acid and the antipodal clavam metabolites. *Journal of the American Chemical Society* **119**: 2348-2355.

**Elander R. 2003.** Industrial production of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology* **61**: 385-392.

- Elliot M, Damji F, Passantino R, Chater K, Leskiw B. 1998.** The bldD gene of *Streptomyces coelicolor* A3 (2): a regulatory gene involved in morphogenesis and antibiotic production. *Journal of Bacteriology* **180**: 1549-1555.
- Elliot MA, Karoonuthaisiri N, Huang J. 2003.** The chaplins: a family of hydrophobic cell-surface proteins involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*. *Genes & development* **17**: 1727-1740.
- Elliot MA, Bibb MJ, Buttner MJ, Leskiw BK. 2001.** BldD is a direct regulator of key developmental genes in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Molecular microbiology* **40**: 257-269.
- Embley T, Stackebrandt E. 1994.** The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes. *Annual Reviews in Microbiology* **48**: 257-289.
- Ensign JC. 1978.** Formation, properties, and germination of actinomycete spores. *Annual Reviews in Microbiology* **32**: 185-219.
- Epshtein V, Toulmé F, Rahmouni AR, Borukhov S, Nudler E. 2003.** Transcription through the roadblocks: the role of RNA polymerase cooperation. *The EMBO journal* **22**: 4719-4727.
- Ettliger L, Gäumann E, Hütter R. 1959.** Stoffwechselprodukte von Actinomyceten 17. Mitteilung Holomycin. *Helvetica chimica acta* **42**: 563-569.
- Eustaquio AS, Gust B, Galm U, Li SM, Chater KF, Heide L. 2005.** Heterologous expression of novobiocin and clorobiocin biosynthetic gene clusters. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 2452-2459.
- Evans GA, Lewis K, Rothenberg BE. 1989.** High efficiency vectors for cosmid microcloning and genomic analysis. *Gene* **79**: 9-20.
- Feinberg AP, Vogelstein B. 1983.** A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry* **132**: 6-13.
- Fischer G, Kyriacou A, Decaris B, Leblond P. 1997a.** Genetic instability and its possible evolutionary implications on the chromosomal structure of *Streptomyces*. *Biochimie* **79**: 555-558.
- Fischer G, Decaris B, Leblond P. 1997b.** Occurrence of deletions, associated with genetic instability in *Streptomyces ambofaciens*, is independent of the linearity of the chromosomal DNA. *Journal of Bacteriology* **179**: 4553-4558.
- Flärdh K, Buttner MJ. 2009.** Streptomyces morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Reviews Microbiology* **7**: 36-49.
- Flett F, Platt J, Cullum J. 1987.** DNA rearrangements associated with instability of an arginine gene in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Basic Microbiology* **27**: 3-10.
- Flinspach, K.; Westrich, L.; Kaysser, L.; Siebenberg, S.; Gomez-Escribano, J.P.; Bibb, M.; Gust, B.; Heide, L. 2010.** Heterologous expression of the biosynthetic gene clusters of coumermycin

A(1), clorobiocin and caprazamycins in genetically modified *Streptomyces coelicolor* strains. *Biopolymers* **93**: 823-832.

**Floriano B, Bibb M. 1996.** afsR is a pleiotropic but conditionally required regulatory gene for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Molecular microbiology* **21**: 385-396.

**Folcher M, Gaillard H, Nguyen LT, Nguyen KT, Lacroix P, Bamas-Jacques N, Rinkel M, Thompson CJ. 2001.** Pleiotropic functions of a *Streptomyces pristinaespiralis* autoregulator receptor in development, antibiotic biosynthesis, and expression of a superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 44297-44306.

**Fukuda D, Haines AS, Song Z, Murphy AC, Hothersall J, Stephens ER, Gurney R, Cox RJ, Crosby J, Willis CL. 2011.** A natural plasmid uniquely encodes two biosynthetic pathways creating a potent anti-MRSA antibiotic. *PloS one* **6**: e18031.

**Galagan JE, Henn MR, Ma L, Cuomo CA, Birren B. 2005.** Genomics of the fungal kingdom: insights into eukaryotic biology. *Genome research* **15**: 1620-1631.

**Gao B, Gupta RS. 2012.** Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **76**: 66-112.

**Garrity GM, Bell JA, Lilburn T. 2005.** The revised road map to the manual. In: Anonymous *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. Springer, 159-187.

**Garrity GM, Holt JG. 2001.** The road map to the manual. In: In Boone DR, Castenholz RW (ed), ed. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology, Vol 2*. Springer-Verlag: Berlin, Germany., 119-166.

**Gelfand MS, Mironov AA, Jomantas J, Kozlov YI, Perumov DA. 1999.** A conserved RNA structure element involved in the regulation of bacterial riboflavin synthesis genes. *Trends in genetics: TIG* **15**: 439.

**Gilbert W. 1986.** Origin of life: The RNA world. *Nature* **319**.

**Glazebrook MA, Doull JL, Stuttard C, Vining LC. 1990.** Sporulation of *Streptomyces venezuelae* in submerged cultures. *Journal of general microbiology* **136**: 581-588.

**Gomez-Escribano JP, Martín JF, Hesketh A, Bibb M, Liras P. 2008.** *Streptomyces clavuligerus* relA-null mutants overproduce clavulanic acid and cephamycin C: negative regulation of secondary metabolism by (p) ppGpp. *Microbiology* **154**: 744-755.

**Gomez-Escribano JP, Bibb MJ. 2011.** Engineering *Streptomyces coelicolor* for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *Microbial biotechnology* **4**: 207-215.

**Goodfellow M, Whitman WB, Parte AC. 2012.** Vol. 5: *The actinobacteria*. Springer: New York.

**Goodfellow M. 1989.** The actinomycetes. I. Suprageneric classification of actinomycetes. In: Anonymous In: *Williams ST, Sharpe ME & Holt JG (Eds) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins: Baltimore, 2333-2339.

**Granozzi C, Billetta R, Passantino R, Sollazzo M, Puglia A. 1990.** A breakdown in macromolecular synthesis preceding differentiation in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Journal of general microbiology* **136**: 713-716.

**Gravius B, Glocker D, Pigac J, Pandža K, Hranueli D, Cullum J. 1994.** The 387 kb linear plasmid pPZG101 of *Streptomyces rimosus* and its interactions with the chromosome. *Microbiology* **140**: 2271-2277.

**Greene R. 1996.** Biosynthesis of methionine. *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology, 2nd ed.* ASM Press, Washington, DC : 542-560.

**Gregory MA, Till R, Smith MC. 2003.** Integration site for *Streptomyces* phage phiBT1 and development of site-specific integrating vectors. *Journal of Bacteriology* **185**: 5320-5323.

**Grundty FJ, Lehman SC, Henkin TM. 2003.** The L box regulon: lysine sensing by leader RNAs of bacterial lysine biosynthesis genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**: 12057-12062.

**Guerra SM, Rodríguez-García A, Santos-Aberturas J. 2012.** LAL regulators SCO0877 and SCO7173 as pleiotropic modulators of phosphate starvation response and actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. *PLoS One* **7**: e31475.

**Gust B, Kieser T, Chater KF. 2002.** REDIRECT technology: PCR-targeting system in *Streptomyces coelicolor*.

**Gust B, Chandra G, Jakimowicz D, Yuqing T, Bruton CJ, Chater KF. 2004.** Lambda red-mediated genetic manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces*. *Advances in Applied Microbiology* **54**: 107-128.

**Hakenbeck R, Stock JB. 1996.** [24] Analysis of two-component signal transduction systems involved in transcriptional regulation. *Methods in enzymology* **273**: 281-300.

**Hanahan D. 1985.** Techniques for transformation of *E. coli*. *DNA cloning* **1**: 109-135.

**Hanahan D. 1983.** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**: 557-580.

**Hardisson C, Manzanal M. 1976.** Ultrastructural studies of sporulation in *Streptomyces*. *Journal of Bacteriology* **127**: 1443-1454.

**Hardisson C, Manzanal M, Salas J, Suárez J. 1978.** Fine structure, physiology and biochemistry of arthrospore germination in *Streptomyces antibioticus*. *Journal of general microbiology* **105**: 203-214.

**Harrison SC. 1991.** A structural taxonomy of DNA-binding domains. *Nature* **353**: 715-719.

**He W, Lei J, Liu Y, Wang Y. 2008.** The LuxR family members GdmRI and GdmRII are positive regulators of geldanamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus* 17997. *Archives of Microbiology* **189**: 501-510.

- Hesketh A, Chen WJ, Ryding J, Chang S, Bibb M. 2007.** The global role of ppGpp synthesis in morphological differentiation and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Genome Biol* **8**: R161.
- Higgins CE, Kastner RE. 1971.** *Streptomyces clavuligerus* sp. nov., a  $\beta$ -lactam antibiotic producer. *Int J Syst Bacteriol.* **21**: 326-331.
- Hirsch C, Ensign J. 1978.** Some properties of *Streptomyces viridochromogenes* spores. *Journal of Bacteriology* **134**: 1056-1063.
- Hobbs G, Frazer CM, Gardner DCJ, Cullum JA, Oliver SG. 1989.** Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. *Appl Microbiol Biotechnol.* **31**: 272-277.
- Hohn B. 1975.** DNA as substrate for packaging into bacteriophage lambda in vitro. *Journal of Molecular Biology* **98**: 93-106.
- Holmes DS, Quigley M. 1981.** A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical Biochemistry* **114**: 193-197.
- Hopwood DA, Hintermann G, Kieser T, Wright HM. 1984.** Integrated DNA sequences in three streptomycetes form related autonomous plasmids after transfer to *Streptomyces lividans*. *Plasmid* **11**: 1-16.
- Horinouchi S. 2007.** Mining and polishing of the treasure trove in the bacterial genus *Streptomyces*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **71**: 283-299.
- Horinouchi S. 2003.** AfsR as an integrator of signals that are sensed by multiple serine/threonine kinases in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **30**: 462-467.
- Horinouchi S, Beppu T. 1992.** Regulation of secondary metabolism and cell differentiation in *Streptomyces* A-factor as a microbial hormone and the AfsR protein as a component of a two-component regulatory system. *Gene* **115**: 167-172.
- Hu W, Braña AF, Demain AL. 1984.** Carbon source regulation of cephem antibiotic production by resting cells of *Streptomyces clavuligerus* and its reversal by protein synthesis inhibitors. *Enzyme Microb. Technol.* **6**: 155-160.
- Huang J, Shi J, Molle V. 2005.** Cross-regulation among disparate antibiotic biosynthetic pathways of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular microbiology* **58**: 1276-1287.
- Huang S, Yudong Z, Zhiwei Q. 2011.** Identification and heterologous expression of the biosynthetic gene cluster for holomycin produced by *Streptomyces clavuligerus*. *Process Biochemistry* **46** (3): 811-816.
- Hutchings MI, Hoskisson PA, Chandra G, Buttner MJ. 2004.** Sensing and responding to diverse extracellular signals? Analysis of the sensor kinases and response regulators of *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Microbiology* **150**: 2795-2806.

- Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Shinose M, Kikuchi H, Shiba T, Sakaki Y, Hattori M. 2003.** Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature biotechnology* **21**: 526-531.
- Inoue H, Nojima H, Okayama H. 1990.** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.
- Jensen SE. 2012.** Biosynthesis of clavam metabolites. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **39**: 1407-1419.
- Jimenez A, Tipper DJ, Davies J. 1973.** Mode of action of thiolutin, an inhibitor of macromolecular synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **3**: 729-738.
- Joyce GF. 1991.** The rise and fall of the RNA world. *The New biologist* **3**: 399.
- Juhl MJ, Clark DP. 1990.** Thiophene-degrading *Escherichia coli* mutants possess sulfone oxidase activity and show altered resistance to sulfur-containing antibiotics. *Applied and Environmental Microbiology* **56**: 3179-3185.
- Keen CL, Mendelovitz S, Cohen G, Aharonowitz Y, Roy KL. 1988.** Isolation and characterization of a linear DNA plasmid from *Streptomyces clavuligerus*. *Molecular and General Genetics MGG* **212**: 172-176.
- Kelly K, Ochi K, Jones G. 1991.** Pleiotropic effects of a relC mutation in *Streptomyces antibioticus*. *Journal of Bacteriology* **173**: 2297-2300.
- Kenig M, Reading C. 1979.** Holomycin and an antibiotic (MM 19290) related to tunicamycin, metabolites of *Streptomyces clavuligerus*. *The Journal of antibiotics* **32**: 549.
- Khachatourians GG, Tipper DJ. 1974.** Inhibition of messenger ribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli* by thiolutin. *Journal of Bacteriology* **119**: 795-804.
- Kharel MK, Shepherd MD, Nybo SE, Smith ML, Bosserman MA, Rohr J. 2010.** Isolation of *Streptomyces* species from soil. *Current protocols in microbiology* : 10E. 4.1-10E. 4.5.
- Khokhlov A, Anisova L, Tovarova I. 1973.** Effect of A-factor on the growth of asporogenous mutants of *Streptomyces griseus*, not producing this factor. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie* **13**: 647-655.
- Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. 2000.** *Practical Streptomyces genetics*.: John Innes Foundation, Norwich, U.K.
- Kim HS, Park YI. 2008.** Isolation and identification of a novel microorganism producing the immunosuppressant tacrolimus. *Journal of bioscience and bioengineering* **105**: 418-421.
- Kim JN, Breaker RR. 2008.** Purine sensing by riboswitches. *Biology of the Cell* **100**: 1-11.
- Kim SB, Lonsdale J, Seong C, Goodfellow M. 2003.** *Streptacidiphilus* gen. nov., acidophilic actinomycetes with wall chemotype I and emendation of the family Streptomycetaceae

(Waksman and Henrici (1943)) emend. Rainey et al. 1997. *Antonie van Leeuwenhoek* **83**: 107-116.

**Kim YJ, Song JY, Moon MH, Smith CP, Hong S, Chang YK. 2007.** pH shock induces overexpression of regulatory and biosynthetic genes for actinorhodin production in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Applied Microbiology and Biotechnology* **76**: 1119-1130.

**Kinashi H, Mori E, Hatani A, Nimi O. 1994.** Isolation and characterization of linear plasmids from lankacidin-producing *Streptomyces* species. *The Journal of antibiotics* **47**: 1447.

**Kirby R, Hopwood D. 1977.** Genetic determination of methylenomycin synthesis by the SCP1 plasmid of *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Journal of general microbiology* **98**: 239-252.

**Kubodera T, Watanabe M, Yoshiuchi K, Yamashita N, Nishimura A, Nakai S, Gomi K, Hanamoto H. 2003.** Thiamine-regulated gene expression of *Aspergillus oryzae* thiA requires splicing of the intron containing a riboswitch-like domain in the 5'-UTR. *FEBS letters* **555**: 516-520.

**Kučer E, Coates N, Challis I, Gregory M, Wilkinson B, Sheridan R, Petković H. 2007.** Roles of rapH and rapG in positive regulation of rapamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus*. *Journal of Bacteriology* **189**: 4756-4763.

**Kwong T, Tahlan K, Anders CL, Jensen SE. 2013.** Carboxyethylarginine Synthase Genes Show Complex Cross-Regulation in *Streptomyces clavuligerus*. *Applied and Environmental Microbiology* **79**: 240-249.

**Kwong T, Zelyas NJ, Cai H, Tahlan K, Wong A, Jensen SE. 2012.** 5S clavam biosynthesis is controlled by an atypical two-component regulatory system in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **56**: 4845-4855.

**Lamari L, Zitouni A, Boudjella H. 2002.** New dithiopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233: I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *Journal of antibiotics* **55**: 696-701.

**Lamari L, Zitouni A, Dob T. 2002.** New dithiopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233: II. Physicochemical properties and structure elucidation. *The Journal of antibiotics* **55**: 702-706.

**Laursen BS, Sørensen HP, Mortensen KK, Sperling-Petersen HU. 2005.** Initiation of protein synthesis in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **69**: 101-123.

**Lawlor EJ, Baylis HA, Chater KF. 1987.** Pleiotropic morphological and antibiotic deficiencies result from mutations in a gene encoding a tRNA-like product in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Genes & development* **1**: 1305-1310.

- Leblond P, Fischer G, Francou F, Berger F, Guérineau M, Decaris B. 1996.** The unstable region of *Streptomyces ambofaciens* includes 210 kb terminal inverted repeats flanking the extremities of the linear chromosomal DNA. *Molecular microbiology* **19**: 261-271.
- Leblond P, Decaris B. 1994.** New insights into the genetic instability of *Streptomyces*. *FEMS microbiology letters* **123**: 225-232.
- Lebrihi A, Lamsaif D, Lefebvre G, Germain P. 1992.** Effect of ammonium ions on spiramycin biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **37**: 382-387.
- Lechevalier M. 1989.** Lipids in bacterial taxonomy. *Practical handbook of microbiology*. CRC, Boca Raton : 455-561.
- Lee P, Umeyama T, Horinouchi S. 2002.** afsS is a target of AfsR, a transcriptional factor with ATPase activity that globally controls secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Molecular microbiology* **43**: 1413-1430.
- Leskiw B, Mah R, Lawlor E, Chater K. 1993.** Accumulation of bldA-specified tRNA is temporally regulated in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Journal of Bacteriology* **175**: 1995-2005.
- Leskiw B, Lawlor E, Fernandez-Abalos J, Chater K. 1991.** TTA codons in some genes prevent their expression in a class of developmental, antibiotic-negative, *Streptomyces* mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**: 2461-2465.
- Li B, Forseth RR, Bowers AA, Schroeder FC, Walsh CT. 2012.** A Backup Plan for Self-Protection: S-Methylation of Holomycin Biosynthetic Intermediates in *Streptomyces clavuligerus*. *ChemBioChem* **13**: 2521-2526.
- Li B, Walsh CT. 2011.** *Streptomyces clavuligerus* Hml1 is an intramolecular disulfide-forming dithiol oxidase in holomycin biosynthesis. *Biochemistry* **50**: 4615-4622.
- Li B, Walsh CT. 2010.** Identification of the gene cluster for the dithiopyrrolone antibiotic holomycin in *Streptomyces clavuligerus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 19731-19735.
- Li B, Lyle MP, Chen G, Li J, Hu K, Tang L, Alaoui-Jamali MA, Webster J. 2007.** Substituted 6-amino-4H-[1,2]dithiolo[4,3-b]pyrrol-5-ones: synthesis, structure-activity relationships, and cytotoxic activity on selected human cancer cell lines. *Bioorganic & medicinal chemistry* **15**: 4601-4608.
- Lian W, Jayapal K, Charaniya S, Mehra S, Glod F, Kyung YS, Sherman D, Hu WS. 2008.** Genome-wide transcriptome analysis reveals that a pleiotropic antibiotic regulator, AfsS, modulates nutritional stress response in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *BMC genomics* **9**: 56.
- Lin Y, Kieser HM, Hopwood DA, Chen CW. 1993.** The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. *Molecular microbiology* **10**: 923-933.

- Linares J, Gustafsson I, Baquero F, Martinez J. 2006.** Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Science Signaling* **103**: 19484.
- Liras P, Santamarta I, Pérez-Redondo R. 2011.** Clavulanic acid and clavams biosynthesis and regulation. *Streptomyces: molecular biology and biotechnology*. Caister Academic Press, Wymondham, UK : 167-178.
- Liras P, Gomez-Escribano JP, Santamarta I. 2008.** Regulatory mechanisms controlling antibiotic production in *Streptomyces clavuligerus*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **35**: 667-676.
- Liras P, Martín JF. 2006.** Gene clusters for beta-lactam antibiotics and control of their expression: why have clusters evolved, and from where did they originate? *International Microbiology* **9**: 9.
- Liras P. 2014.** Holomycin, a dithiolopyrrolone compound produced by *Streptomyces clavuligerus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* : 1-8.
- Liu G, Chater KF, Chandra G, Niu G, Tan H. 2013.** Molecular Regulation of Antibiotic Biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **77**: 112-143.
- Locci R. 1989.** Streptomycetes and related genera. *Bergey's manual of systematic bacteriology* **4**: 2451-2508.
- Lombó F, Braña AF, Méndez C, Salas JA. 1999.** The mithramycin gene cluster of *Streptomyces argillaceus* contains a positive regulatory gene and two repeated DNA sequences that are located at both ends of the cluster. *Journal of Bacteriology* **181**: 642-647.
- Lorenzana LM, Perez-Redondo R, Santamarta I, Martin JF, Liras P. 2004.** Two oligopeptide-permease-encoding genes in the clavulanic acid cluster of *Streptomyces clavuligerus* are essential for production of the beta-lactamase inhibitor. *Journal of Bacteriology* **186**: 3431-3438.
- MacNeil DJ, Gewain KM, Ruby CL, Dezeny G, Gibbons PH, MacNeil T. 1992.** Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene* **111**: 61-68.
- Maddocks SE, Oyston PC. 2008.** Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology* **154**: 3609-3623.
- Madduri K, Hutchinson CR. 1995.** Functional characterization and transcriptional analysis of the dnrR1 locus, which controls daunorubicin biosynthesis in *Streptomyces peucetius*. *Journal of Bacteriology* **177**: 1208-1215.
- Mandal M, Breaker RR. 2004.** Gene regulation by riboswitches. *Nature reviews molecular cell biology* **5**: 451-463.

- Mandal M, Lee M, Barrick JE, Weinberg Z, Emilsson GM, Ruzzo WL, Breaker RR. 2004.** A glycine-dependent riboswitch that uses cooperative binding to control gene expression. *Science* **306**: 275-279.
- Mandal M, Boese B, Barrick JE, Winkler WC, Breaker RR. 2003.** Riboswitches Control Fundamental Biochemical Pathways in *Bacillus subtilis* and Other Bacteria. *Cell* **113**: 577-586.
- Manteca A, Sanchez J. 2009.** *Streptomyces* development in colonies and soils. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 2920-2924.
- Manteca A, Alvarez R, Salazar N, Yagüe P, Sanchez J. 2008.** Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of *Streptomyces coelicolor*. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 3877-3886.
- Marsh EN, Chang MDT, Townsend CA. 1992.** Two isozymes of clavamate synthase central to clavulanic acid formation: cloning and sequencing of both genes from *Streptomyces clavuligerus*. *Biochemistry* **31**: 12648-12657.
- Martin JF. 1989.** Molecular mechanisms for the control by phosphate of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. *Regulation of Secondary Metabolism in Actinomycetes (Shapiro, Ed.)*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, USA : 213-238.
- Martin JF, Liras P. 1989.** Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. *Annual Reviews in Microbiology* **43**: 173-206.
- Martín JF. 2004.** Phosphate control of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites is mediated by the PhoR-PhoP system: an unfinished story. *Journal of Bacteriology* **186**: 5197-5201.
- Martín JF, Demain AL. 1980.** Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiological reviews* **44**: 230.
- Martín J, Liras P. 2010.** Engineering of regulatory cascades and networks controlling antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Current opinion in microbiology* **13**: 263-273.
- Martínez-Castro M, Solera E, Martín JF, Barreiro C. 2009.** Efficient pyramidal arrangement of an ordered cosmid library: Rapid screening of genes of the tacrolimus-producer *Streptomyces* sp. ATCC 55098. *Journal of microbiological methods* **78**: 150-154.
- Martínez-Hackert E, Stock AM. 1997.** The DNA-binding domain of OmpR: crystal structures of a winged helix transcription factor. *Structure* **5**: 109-124.
- Mazodier P, Thompson C, Boccard F. 1990.** The chromosomal integration site of the *Streptomyces* element pSAM2 overlaps a putative tRNA gene conserved among actinomycetes. *Molecular and General Genetics MGG* **222**: 431-434.
- McCarthy AJ, Williams ST. 1992.** Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment—a review. *Gene* **115**: 189-192.

**McDaniel BAM, Grundy FJ, Artsimovitch I, Henkin TM. 2003.** Transcription termination control of the S box system: direct measurement of S-adenosylmethionine by the leader RNA. *Science Signaling* **100**: 3083.

**McDowall KJ, Thamchaipenet A, Hunter IS. 1999.** Phosphate control of oxytetracycline production by *Streptomyces rimosus* is at the level of transcription from promoters overlapped by tandem repeats similar to those of the DNA-binding sites of the OmpR family. *Journal of Bacteriology* **181**: 3025-3032.

**McInerney BV, Gregson RP, Lacey MJ, Akhurst RJ, Lyons GR, Rhodes SH, Smith DRJ, Engelhardt LM, White AH. 1991.** Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp., Part 1. Dithiopyrrolone derivatives with antibiotic activity. *Journal of natural products* **54**: 774-784.

**McKenzie NL, Nodwell JR. 2007.** Phosphorylated AbsA2 negatively regulates antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* through interactions with pathway-specific regulatory gene promoters. *Journal of Bacteriology* **189**: 5284-5292.

**McVITTIE A. 1974.** Ultrastructural studies on sporulation in wild-type and white colony mutants of *Streptomyces coelicolor*. *Journal of general microbiology* **81**: 291-302.

**Medema MH, Trefzer A, Kovalchuk A, van den Berg M, Müller U, Heijne W, Wu L, Alam MT, Ronning CM, Nierman WC. 2010.** The sequence of a 1.8-Mb bacterial linear plasmid reveals a rich evolutionary reservoir of secondary metabolic pathways. *Genome Biology and Evolution* **2**: 212.

**Mendes MV, Tunca S, Antón N, Recio E, Sola-Landa A, Aparicio JF, Martín JF. 2007.** The two-component phoR-phoP system of *Streptomyces natalensis*: Inactivation or deletion of phoP reduces the negative phosphate regulation of pimaricin biosynthesis. *Metabolic engineering* **9**: 217-227.

**Méndez C, Brana AF, Manzanal MB, Hardisson C. 1985.** Role of substrate mycelium in colony development in *Streptomyces*. *Canadian journal of microbiology* **31**: 446-450.

**Merrick M. 1976.** A morphological and genetic mapping study of bald colony mutants of *Streptomyces coelicolor*. *Journal of general microbiology* **96**: 299-315.

**Miguélez EM, Martín C, Manzanal MB, Hardisson C. 1992.** Growth and morphogenesis in *Streptomyces*. *FEMS microbiology letters* **100**: 351-359.

**Miller JH. 1972.** Experiments in Molecular Genetics. *Cold Spring Harbor Press.* : 352-355.

**Miranda-Ríos J, Navarro M, Soberón M. 2001.** A conserved RNA structure (thi box) is involved in regulation of thiamin biosynthetic gene expression in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 9736-9741.

**Mironov AS, Gusarov I, Rafikov R, Lopez LE, Shatalin K, Kreneva RA, Perumov DA, Nudler E. 2002.** Sensing small molecules by nascent RNA: a mechanism to control transcription in bacteria. *Cell* **111**: 747.

**Moll I, Hirokawa G, Kiel MC, Kaji A, Bläsi U. 2004.** Translation initiation with 70S ribosomes: an alternative pathway for leaderless mRNAs. *Nucleic acids research* **32**: 3354-3363.

**Moll I, Grill S, Gualerzi CO, Bläsi U. 2002.** Leaderless mRNAs in bacteria: surprises in ribosomal recruitment and translational control. *Molecular microbiology* **43**: 239-246.

**Molle V, Buttner MJ. 2000.** Different alleles of the response regulator gene bldM arrest *Streptomyces coelicolor* development at distinct stages. *Molecular microbiology* **36**: 1265-1278.

**Mosher RH, Paradkar AS, Anders C, Barton B, Jensen SE. 1999.** Genes specific for the biosynthesis of clavam metabolites antipodal to clavulanic acid are clustered with the gene for clavamate synthase 1 in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**: 1215-1224.

**Mueller O, Hahnenberger K, Dittmann M. 2000.** A microfluidic system for high-speed reproducible DNA sizing and quantitation. *Electrophoresis* **21**: 128-134.

**Mullis KB, Faloona FA. 1987.** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology* **155**: 335-350.

**Murphy AC, Fukuda D, Song Z. 2011.** Engineered Thiomarinol Antibiotics Active against MRSA Are Generated by Mutagenesis and Mutasynthesis of *Pseudoalteromonas* SANK73390. *Angewandte Chemie* **123**: 3329-3332.

**Musialowski MS, Flett F, Scott GB, Hobbs G, Smith CP, Oliver SG. 1994.** Functional evidence that the principal DNA replication origin of the *Streptomyces coelicolor* chromosome is close to the dnaA-gyrB region. *Journal of Bacteriology* **176**: 5123-5125.

**Nagarajan R, Boeck LD, Gorman M, . 1971.** . beta.-Lactam antibiotics from Streptomyces. *Journal of the American Chemical Society* **93**: 2308-2310.

**Nahvi A, Sudarsan N, Ebert MS, Zou X, Brown KL, Breaker RR. 2002.** Genetic control by a metabolite binding mRNA. *Chemistry & biology* **9**: 1043-1049.

**Nardiz N, Santamarta I, Lorenzana LM, Martin JF, Liras P. 2011.** A rhodanese-like protein is highly overrepresented in the mutant *S. clavuligerus* oppA2::aph: effect on holomycin and other secondary metabolites production. *Microbial biotechnology* **4**: 216-225.

**Netolitzky DJ, Wu X, Jensen SE, Roy KL. 1995.** Giant linear plasmids of  $\beta$ -lactam antibiotic producing *Streptomyces*. *FEMS microbiology letters* **131**: 27-34.

- Nodwell JR, Yang M, Kuo D, Losick R. 1999.** Extracellular complementation and the identification of additional genes involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*. *Genetics* **151**: 569-584.
- Nodwell JR, Losick R. 1998.** Purification of an extracellular signaling molecule involved in production of aerial mycelium by *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology* **180**: 1334-1337.
- Nou X, Kadner RJ. 2000.** Adenosylcobalamin inhibits ribosome binding to btuB RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 7190-7195.
- Novotna J, Vohradsky J, Berndt P, Gramajo H, Langen H, Li XM, Minas W, Orsaria L, Roeder D, Thompson CJ. 2003.** Proteomic studies of diauxic lag in the differentiating prokaryote *Streptomyces coelicolor* reveal a regulatory network of stress-induced proteins and central metabolic enzymes. *Molecular microbiology* **48**: 1289-1303.
- Nudler E, Mironov AS. 2004.** The riboswitch control of bacterial metabolism. *Trends in biochemical sciences* **29**: 11-17.
- Ochi K. 1990.** A relaxed (rel) mutant of *Streptomyces coelicolor* A3 (2) with a missing ribosomal protein lacks the ability to accumulate ppGpp, A-factor and prodigiosin. *Journal of general microbiology* **136**: 2405-2412.
- Ohnishi Y, Ishikawa J, Hara H. 2008.** Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *Journal of Bacteriology* **190**: 4050-4060.
- Ohnishi Y, Yamazaki H, Kato J, Tomono A, Horinouchi S. 2005.** AdpA, a central transcriptional regulator in the A-factor regulatory cascade that leads to morphological development and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **69**: 431-439.
- Okamura K. 1977.** Holomycin and N-propionylholothin, antibiotics produced by a cephamycin C producer (Notes). *Journal of Antibiotics* **30**: p334-336.
- Oliva B, O'Neill A, Wilson JM, O'Hanlon PJ, Chopra I. 2001.** Antimicrobial properties and mode of action of the pyrrothine holomycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**: 532-539.
- Oliynyk M, Samborsky M, Lester JB. 2007.** Complete genome sequence of the erythromycin-producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338. *Nature biotechnology* **25**: 447-453.
- O'Neill A, Oliva B, Storey C, Hoyle A, Fishwick C, Chopra I. 2000.** RNA polymerase inhibitors with activity against rifampin-resistant mutants of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**: 3163-3166.
- Paradkar A. 2013.** Clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*: biogenesis, regulation and strain improvement. *The Journal of antibiotics* .

- Paradkar AS, Aidoo KA, Jensen SE. 1998.** A pathway-specific transcriptional activator regulates late steps of clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Molecular microbiology* **27**: 831-843.
- Park S, Yang Y, Song E. 2009.** Mass spectrometric screening of transcriptional regulators involved in antibiotic biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **36**: 1073-1083.
- Perez-Llarena F, Martin JF, Galleni M. 1997a.** The bla gene of the cephamycin cluster of *Streptomyces clavuligerus* encodes a class A beta-lactamase of low enzymatic activity. *Journal of Bacteriology* **179**: 6035-6040.
- Perez-Llarena FJ, Liras P, Rodriguez-Garcia A, Martin JF. 1997b.** A regulatory gene (ccaR) required for cephamycin and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*: amplification results in overproduction of both beta-lactam compounds. *Journal of Bacteriology* **179**: 2053-2059.
- Perez-Redondo R, Rodriguez-Garcia A, Martin JF, Liras P. 1998.** The claR gene of *Streptomyces clavuligerus*, encoding a LysR-type regulatory protein controlling clavulanic acid biosynthesis, is linked to the clavulanate-9-aldehyde reductase (car) gene. *Gene* **211**: 311-321.
- Pérez-Rueda E, Collado-Vides J. 2000.** The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic acids research* **28**: 1838-1847.
- Pérez-Rueda E, Gralla JD, Collado-Vides J. 1998.** Genomic position analyses and the transcription machinery. *Journal of Molecular Biology* **275**: 165-170.
- Piret JM, Chater KF. 1985.** Phage-mediated cloning of bldA, a region involved in *Streptomyces coelicolor* morphological development, and its analysis by genetic complementation. *Journal of Bacteriology* **163**: 965-972.
- Pope MK, Green B, Westpheling J. 1998.** The bldB Gene Encodes a Small Protein Required for Morphogenesis, Antibiotic Production, and Catabolite Control in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology* **180**: 1556-1562.
- Pospiech A, Neumann B. 1995.** A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. *Trends in genetics : TIG* **11**: 217-218.
- Puglia AM, Vohradsky J, Thompson CJ. 1995.** Developmental control of the heat-shock stress regulon in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular microbiology* **17**: 737-746.
- Qin Z, Baker AT, Raab A. 2013a.** The Fish Pathogen *Yersinia ruckeri* Produces Holomycin and Uses an RNA Methyltransferase for Self-resistance. *Journal of Biological Chemistry* **288**: 14688-14697.
- Qin Z, Huang S, Yu Y, Deng H. 2013b.** Dithiopyrrolone Natural Products: Isolation, Synthesis and Biosynthesis. *Marine drugs* **11**: 3970-3997.

**Quintana ET, Wierzbicka K, Mackiewicz P. 2008.** *Streptomyces sudanensis* sp. nov., a new pathogen isolated from patients with actinomycetoma. *Antonie van Leeuwenhoek* **93**: 305-313.

**Ravel J, Wellington EM, Hill RT. 2000.** Interspecific Transfer of Streptomyces Giant Linear Plasmids in Sterile Amended Soil Microcosms. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 529-534.

**Redenbach M, Kieser HM, Denapaite D. 1996.** A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3 (2) chromosome. *Molecular microbiology* **21**: 77-96.

**Redondo-Nieto M, Lloret J, Larenas J. 2008.** Transcriptional organization of the region encoding the synthesis of the flagellar filament in *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Bacteriology* **190**: 4106-4109.

**Rius N, Maeda K, Demain AL. 1996.** Induction of l-lysine-aminotransferase by l-lysine in *Streptomyces clavuligerus*, producer of cephalosporins. *FEMS microbiology letters* **144**: 207-211.

**Robles-Reglero V, Santamarta I, Alvarez-Alvarez R, Martin JF, Liras P. 2013.** Transcriptional analysis and proteomics of the holomycin gene cluster in overproducer mutants of *Streptomyces clavuligerus*. *Journal of Biotechnology* .

**Rodionov DA, Vitreschak AG, Mironov AA, Gelfand MS. 2004.** Comparative genomics of the methionine metabolism in Gram-positive bacteria: a variety of regulatory systems. *Nucleic acids research* **32**: 3340-3353.

**Rodionov DA, Vitreschak AG, Mironov AA, Gelfand MS. 2003.** Comparative genomics of the vitamin B12 metabolism and regulation in prokaryotes. *The Journal of biological chemistry* **278**: 41148-41159.

**Rodriguez-Garcia A, Martin JF, Liras P. 1995.** The argG gene of *Streptomyces clavuligerus* has low homology to unstable argG from other actinomycetes: effect of amplification on clavulanic acid biosynthesis. *Gene* **167**: 9-15.

**Romero J, Liras P, Martin J. F. 1984.** Dissociation of cephamycin and clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*.. *Appl Microbiol Biotechnol.* **20**: 318-325.

**Rueda B, Miguélez EM, Hardisson C, Manzanal MB. 2001.** Mycelial differentiation and spore formation by *Streptomyces brasiliensis* in submerged culture. *Canadian journal of microbiology* **47**: 1042-1047.

**Salah-Bey K, Blanc V, Thompson CJ. 1995.** Stress-activated expression of a *Streptomyces pristinaespiralis* multidrug resistance gene (ptr) in various *Streptomyces spp.* and *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **17**: 1001-1012.

- Salowe SP, Marsh EN, Townsend CA. 1990.** Purification and characterization of clavamate synthase from *Streptomyces clavuligerus*: an unusual oxidative enzyme in natural product biosynthesis. *Biochemistry* **29**: 6499-6508.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 2001.** Molecular cloning. A laboratory manual. *Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. New York, USA* .
- Sanchez L, Brana AF. 1996.** Cell density influences antibiotic biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Microbiology (Reading, England)* **142 ( Pt 5)**: 1209-1220.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**: 5463-5467.
- Santamarta I, Rodríguez-García A, Pérez-Redondo R, Martín JF, Liras P. 2002.** CcaR is an autoregulatory protein that binds to the ccaR and cefD-cmcl promoters of the cephamycin C-clavulanic acid cluster in *Streptomyces clavuligerus*. *Journal of Bacteriology* **184**: 3106-3113.
- Santamarta I, Lopez-Garcia MT, Kurt A, Nardiz N, Alvarez-Alvarez R, Perez-Redondo R, Martin JF, Liras P. 2011.** Characterization of DNA-binding sequences for CcaR in the cephamycin-clavulanic acid supercluster of *Streptomyces clavuligerus*. *Molecular microbiology* **81**: 968-981.
- Santos-Aberturas J, Vicente CM, Payero TD, Martín-Sánchez L, Cañibano C, Martín JF, Aparicio JF. 2012.** Hierarchical Control on Polyene Macrolide Biosynthesis: PimR Modulates Pimaricin Production via the PAS-LuxR Transcriptional Activator PimM. *PLoS one* **7**: e38536.
- Santos-Beneit F, Barriuso-Iglesias M, Fernández-Martínez LT, Martínez-Castro M, Sola-Landa A, Rodríguez-García A, Martín JF. 2011.** The RNA polymerase omega factor RpoZ is regulated by PhoP and has an important role in antibiotic biosynthesis and morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor*. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 7586-7594.
- Sattely ES, Fischbach MA, Walsh CT. 2008.** Total biosynthesis: in vitro reconstitution of polyketide and nonribosomal peptide pathways. *Natural product reports* **25**: 757-793.
- Saudagar PS, Shaligram NS, Singhal RS. 2008.** Immobilization of *Streptomyces clavuligerus* on loofah sponge for the production of clavulanic acid. *Bioresource technology* **99**: 2250-2253.
- Sawai R, Suzuki A, Takano Y, Lee P, Horinouchi S. 2004.** Phosphorylation of AfsR by multiple serine/threonine kinases in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Gene* **334**: 53-61.
- Scharf DH, Remme N, Heinekamp T, Hortschansky P, Brakhage AA, Hertweck C. 2010.** Transannular disulfide formation in gliotoxin biosynthesis and its role in self-resistance of the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Journal of the American Chemical Society* **132**: 10136-10141.
- Schroeder A, Mueller O, Stocker S. 2006.** The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC molecular biology* **7**: 3.

- Sekowska A, Dénervaud V, Ashida H. 2004.** Bacterial variations on the methionine salvage pathway. *BMC microbiology* **4**: 9.
- Sekowska A, Danchin A. 2002.** The methionine salvage pathway in *Bacillus subtilis*. *BMC microbiology* **2**: 8.
- Serganov A, Nudler E. 2013.** A Decade of Riboswitches. *Cell* **152**: 17-24.
- Shiozawa H, Kagasaki T, Kinoshita T, Haruyama H, Domon H, Utsui Y, Kodama K, Takahashi S. 1993.** Thiomarinol, a new hybrid antimicrobial antibiotic produced by a marine bacterium. Fermentation, isolation, structure, and antimicrobial activity. *The Journal of antibiotics* **46**: 1834-1842.
- Sola-Landa A, Moura R, Martin J. 2003.** The two-component PhoR-PhoP system controls both primary metabolism and secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces lividans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**: 6133-6138.
- Sola-Landa A, Rodríguez-García A, Franco-Domínguez E, Martín JF. 2005.** Binding of PhoP to promoters of phosphate-regulated genes in *Streptomyces coelicolor*: identification of PHO boxes. *Molecular microbiology* **56**: 1373-1385.
- Song JY, Jensen SE, Lee KJ. 2010.** Clavulanic acid biosynthesis and genetic manipulation for its overproduction. *Applied Microbiology and Biotechnology* **88**: 659-669.
- Southern EM. 1975.** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* **98**: 503-517.
- Stock JB, Stock AM, Mottonen JM. 1990.** Signal transduction in bacteria. *Nature* **344**: 395.
- Stormo GD, Ji Y. 2001.** Do mRNAs act as direct sensors of small molecules to control their expression? *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 9465-9467.
- Strohl WR. 1992.** Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. *Nucleic acids research* **20**: 961-974.
- Sudarsan N, Cohen-Chalamish S, Nakamura S, Emilsson GM, Breaker RR. 2005.** Thiamine pyrophosphate riboswitches are targets for the antimicrobial compound pyrithiamine. *Chemistry & biology* **12**: 1325-1335.
- Sudarsan N, Barrick JE, Breaker RR. 2003.** Metabolite-binding RNA domains are present in the genes of eukaryotes. *Rna* **9**: 644-647.
- Sufrin JR, Meshnick SR, Spiess AJ, Garofalo-Hannan J, Pan XQ, Bacchi CJ. 1995.** Methionine recycling pathways and antimalarial drug design. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**: 2511-2515.
- Tahlan K, Anders C, Wong A, Mosher RH, Beatty PH, Brumlik MJ, Griffin A, Hughes C, Griffin J, Barton B. 2007.** 5 Clavam Biosynthetic Genes Are Located in Both the Clavam and Paralog Gene Clusters in *Streptomyces clavuligerus*. *Chemistry & biology* **14**: 131-142.

- Tahlan K, Anders C, Jensen SE. 2004.** The paralogous pairs of genes involved in clavulanic acid and clavam metabolite biosynthesis are differently regulated in *Streptomyces clavuligerus*. *Journal of Bacteriology* **186**: 6286-6297.
- Takano E. 2006.**  $\gamma$ -Butyrolactones: *Streptomyces* signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation. *Current opinion in microbiology* **9**: 287-294.
- Takano E, Chakraborty R, Nihira T, Yamada Y, Bibb MJ. 2001.** A complex role for the  $\gamma$ -butyrolactone SCB1 in regulating antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Molecular microbiology* **41**: 1015-1028.
- Tanaka A, Takano Y, Ohnishi Y, Horinouchi S. 2007.** AfsR Recruits RNA Polymerase to the afsS Promoter: A Model for Transcriptional Activation by SARPs. *Journal of Molecular Biology* **369**: 322-333.
- Tang L, Grimm A, Zhang Y, Hutchinson CR. 1996.** Purification and characterization of the DNA-binding protein Dnrl, a transcriptional factor of daunorubicin biosynthesis in *Streptomyces peucetius*. *Molecular microbiology* **22**: 801-813.
- Tang Z, Xiao C, Zhuang Y. 2011.** Improved oxytetracycline production in *Streptomyces rimosus* M4018 by metabolic engineering of the G6PDH gene in the pentose phosphate pathway. *Enzyme and microbial technology* **49**: 17-24.
- Tautz D, Renz M. 1983.** An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. *Analytical Biochemistry* **132**: 14-19.
- te Poele EM, Bolhuis H, Dijkhuizen L. 2008.** Actinomycete integrative and conjugative elements. *Antonie van Leeuwenhoek* **94**: 127-143.
- Thai W, Paradkar AS, Jensen SE. 2001.** Construction and analysis of  $\beta$ -lactamase-inhibitory protein (BLIP) non-producer mutants of *Streptomyces clavuligerus*. *Microbiology* **147**: 325-335.
- Tipper D. 1973.** Inhibition of yeast ribonucleic acid polymerases by thiolutin. *Journal of Bacteriology* **116**: 245-256.
- Trepanier NK, Nguyen GD, Leedell PJ, Leskiw BK. 1997.** Use of polymerase chain reaction to identify a leucyl tRNA in *Streptomyces coelicolor*. *Gene* **193**: 59-63.
- Tsai H, Huang C, Tessmer I, Erie DA, Chen CW. 2011.** Linear *Streptomyces* plasmids form superhelical circles through interactions between their terminal proteins. *Nucleic acids research* **39**: 2165-2174.
- Tseng H, Chen C. 1991.** A cloned ompR-like gene of *Streptomyces lividans* 66 suppresses defective melC1, a putative copper-transfer gene. *Molecular microbiology* **5**: 1187-1196.
- Umeyama T, Lee P, Ueda K, Horinouchi S. 1999.** An AfsK/AfsR system involved in the response of aerial mycelium formation to glucose in *Streptomyces griseus*. *Microbiology* **145**: 2281-2292.

- Vitreschak AG, Rodionov DA, Mironov AA, Gelfand MS. 2004.** Riboswitches: the oldest mechanism for the regulation of gene expression? *TRENDS in Genetics* **20**: 44-50.
- Vitreschak AG, Rodionov DA, Mironov AA, Gelfand MS. 2003.** Regulation of the vitamin B12 metabolism and transport in bacteria by a conserved RNA structural element. *RNA (New York, N.Y.)* **9**: 1084-1097.
- Volff J, Altenbuchner J. 2000.** A new beginning with new ends: linearisation of circular chromosomes during bacterial evolution. *FEMS microbiology letters* **186**: 143-150.
- Volff J, Altenbuchner J. 1998.** Genetic instability of the *Streptomyces* chromosome. *Molecular microbiology* **27**: 239-246.
- von Döhren H, Gräfe U. 1997.** General aspects of secondary metabolism. *Biotechnology Set, Second Edition* : 1-55.
- Wang X, Yan Y, Zhang B. 2010.** Genome sequence of the milbemycin-producing bacterium *Streptomyces bingchenggensis*. *Journal of Bacteriology* **192**: 4526-4527.
- Ward JM, Hodgson JE. 1993.** The biosynthetic genes for clavulanic acid and cephamycin production occur as a 'super-cluster' in three *Streptomyces*. *FEMS microbiology letters* **110**: 239-242.
- Warner DF, Savvi S, Mizrahi V, Dawes SS. 2007.** A riboswitch regulates expression of the coenzyme B12-independent methionine synthase in *Mycobacterium tuberculosis*: implications for differential methionine synthase function in strains H37Rv and CDC1551. *Journal of Bacteriology* **189**: 3655-3659.
- Weber T, Welzel K, Pelzer S, Vente A, Wohlleben W. 2003.** Exploiting the genetic potential of polyketide producing streptomycetes. *Journal of Biotechnology* **106**: 221-232.
- Webster JM, Li J, Chen G. 2000.** Anticancer property of thiolopyrrolones. .
- White III HB. 1976.** Coenzymes as fossils of an earlier metabolic state. *Journal of Molecular Evolution* **7**: 101-104.
- Whitney J, Brannon D, Mabe J, Wicker K. 1972.** Incorporation of labeled precursors into A16886B, a novel  $\beta$ -lactam antibiotic produced by *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1**: 247-251.
- Wietz M, Mansson M, Gotfredsen CH, Larsen TO, Gram L. 2010.** Antibacterial compounds from marine *Vibrionaceae* isolated on a global expedition. *Marine drugs* **8**: 2946-2960.
- Wietzorrek A, Bibb M. 1997.** A novel family of proteins that regulates antibiotic production in streptomycetes appears to contain an OmpR-like DNA-binding fold. *Molecular microbiology* **25**: 1181-1184.

- Willey J, Schwedock J, Losick R. 1993.** Multiple extracellular signals govern the production of a morphogenetic protein involved in aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor*. *Genes & development* **7**: 895-903.
- Wilson DJ, Xue Y, Reynolds KA, Sherman DH. 2001.** Characterization and analysis of the PikD regulatory factor in the pikromycin biosynthetic pathway of *Streptomyces venezuelae*. *Journal of Bacteriology* **183**: 3468-3475.
- Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC. 2003.** Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *The EMBO journal* **22**: 6267-6276.
- Winkler W, Nahvi A, Breaker RR. 2002.** Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature* **419**: 952-956.
- Winkler WC, Breaker RR. 2005.** Regulation of bacterial gene expression by riboswitches. *Annu.Rev.Microbiol.* **59**: 487-517.
- Winkler WC, Breaker RR. 2003.** Genetic control by metabolite-binding riboswitches. *ChemBiochem* **4**: 1024-1032.
- Winkler WC, Cohen-Chalamish S, Breaker RR. 2002.** An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**: 15908-15913.
- Witt D, Stackebrandt E. 1990.** Unification of the genera *Streptoverticillum* and *Streptomyces*, and amendment of *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339AL. *Systematic and applied microbiology* **13**: 361-371.
- Wright F, Bibb MJ. 1992.** Codon usage in the G C-rich in *Streptomyces* genome. *Gene* **113**: 55-65.
- Wu X, Roy KL. 1993.** Complete nucleotide sequence of a linear plasmid from *Streptomyces clavuligerus* and characterization of its RNA transcripts. *Journal of Bacteriology* **175**: 37-52.
- Xu J, Tozawa Y, Lai C, Hayashi H, Ochi K. 2002.** A rifampicin resistance mutation in the rpoB gene confers ppGpp-independent antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Molecular Genetics and Genomics* **268**: 179-189.
- Yim G, Wang HH, FRS JD. 2007.** Antibiotics as signalling molecules. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **362**: 1195-1200.
- Yoon K, Cho J. 2007.** Transcriptional analysis of the gum gene cluster from *Xanthomonas oryzae pathovar oryzae*. *Biotechnology Letters* **29**: 95-103.
- Zelyas NJ, Cai H, Kwong T, Jensen SE. 2008.** Alanylclavam biosynthetic genes are clustered together with one group of clavulanic acid biosynthetic genes in *Streptomyces clavuligerus*. *Journal of Bacteriology* **190**: 7957-7965.

**Zhang C. 1996.** Bacterial signalling involving eukaryotic-type protein kinases. *Molecular microbiology* **20**: 9-15.

**Zhao G, Li J, Qin S, Huang HY, Zhu WY, Xu LH, Li WJ. 2010.** *Streptomyces artemisiae* sp. nov., isolated from surface-sterilized tissue of *Artemisia annua* L. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**: 27-32.