



Universidad de León

Departamento de Biología Molecular

Área de Microbiología

**Análisis transcriptómico de cepas derivadas de
Streptomyces clavuligerus ATCC 27064:
expresión heteróloga de genes
y activación de compuestos bioactivos.**

Yolanda Martínez Burgo

León, 2016

**Memoria presentada por Yolanda Martínez Burgo
para optar al grado de Doctor**

A mi familia

Agradecimientos

A todas aquellas personas e instituciones que han hecho posible la realización de esta tesis doctoral, deseo expresar mis más sinceros agradecimientos.

Al Ministerio de Educación, por concederme una beca del Programa de Formación de Profesorado Universitario. A la Organización Europea de Biología Molecular, por otorgarme una *EMBO Short Term Fellowship* para mi estancia en Friburgo, Alemania. Del mismo modo, el trabajo desarrollado a lo largo de esta tesis doctoral se encuentra enmarcado en la financiación obtenida a través de los proyectos BIO2009-09820, LE046A11-2 y BIO2012-34723 concedidos respectivamente por el Ministerio de Ciencia e Innovación, la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León, y el Ministerio de Educación y Ciencia. A la Universidad de León, incluyendo a las Áreas de Fisiología Vegetal y Bioquímica, y al Instituto de Biotecnología, INBIOTEC, por ofrecerme los recursos para la consecución de este trabajo.

A la Dra. Paloma Liras, por la dirección de esta tesis, la oportunidad de trabajar en su laboratorio, su confianza en mí desde el principio, su gran apoyo, perseverancia y cercanía. Muchísimas gracias. Al Dr. Juan Francisco Martín, por su interés en mi trabajo y por sus consejos. A los dos, por ser mi referente y mi inspiración.

A la Dra. Rosario Pérez Redondo, por la codirección de este trabajo, por su entrega, sobre todo al comienzo y al final de este viaje. Al Dr. Antonio Rodríguez García, por su serenidad y su dedicación incondicional. A los dos, por tanto como me habéis transmitido y porque gran parte de este trabajo os lo debo a vosotros.

Al Dr. Kristian Apel, por su orientación en la expresión heteróloga. Al Dr. Alfredo F. Braña por su colaboración en la identificación de la cefamicina C y al Dr. Jose R. Tormo y Jesús Martín en la del compuesto antifúngico. A los Dres. Jesús F. Aparicio y Javier Santos Aberturas, por su apoyo en los estudios de la expresión heteróloga de *pimM*.

A los técnicos y el personal de servicios, por vuestra disposición y dedicación gracias a la cual este trabajo ha sido posible, en particular a Andrea, Alcira y Cristina. A los miembros del LTI, especialmente a Virginia y Esther, por su inestimable ayuda con los equipos de cromatografía y cromatogramas, por su entrega y empatía.

A los compañeros del Área de Microbiología y de INBIOTEC. Gracias por hacer de estos años una experiencia tan enriquecedora a nivel profesional y personal. Por vuestro apoyo y

predisposición para ayudar tanto en lo científico como en lo administrativo, creando un buen ambiente de trabajo. Gracias en particular a Rubén, Maite, Coral, Marta, Ana, Almudena, Gema, Brandán, Elisa, María, Jose, Eva, Antonio, Javi, Claudia, María, Fernando, Seomara, Elena, Katarina, Sandra y Jenny.

A Vicky, por haberme enriquecido tanto como persona, aconsejarme tan acertadamente y animarme a seguir mis sueños. Por tu amistad.

Al Dr. Andreas Bechthold por acogerme en su laboratorio y a todo su grupo por su apoyo y por aceptar el reto de mi alemán. Especialmente a Theresa, porque sin ella no habría sido posible, a Irene, por cuidarme y por su amistad, y a los chicos de *Bioinformatics*, por tan buenos momentos. A mis compañeras de WG, por integrarme en su “familia” y por su amistad.

A mis amigos, algunos compañeros de carrera y doctorado, por su inestimable apoyo y empatía en este camino, por todo lo compartido y que tan fuerte nos ha unido. Gracias a cada uno de vosotros. Al “Grupete”, por los “Objetivos” conseguidos y los que nos quedan, por ser los culpables de que haya superado límites que en realidad nunca existieron. Al grupo “Kino für alles & Patricia”, por la aventura de aprender un idioma *einfach*, por vuestro ánimo.

A mi familia. A mi padre, a mi madre y a mi hermana, por ser mi referente en la vida. Por habérmelo dado todo sin pedir nada a cambio y hacerme sentir inmensamente orgullosa. Por vuestro interés en mi trabajo y mis proyectos, sin importar la complejidad del tema. Me gustaría agradecerlos de todo corazón, pero para vosotros, mi corazón no tiene fondo.

Muchas Gracias A Todos

Abreviaturas y acrónimos

ABC: transportador proteico, *ATP-binding cassette transporter*

aac, *aac(3)IV*: *aminoglycoside acetyltransferase* (apramicina)

ACP: proteína transportadora de grupos acilo

ADNasa: desoxirribonucleasa

ADNc: ADN complementario

ADNdc: ADN de doble cadena

ADNsc: ADN de cadena sencilla

ADNt: ADN total o genómico

amp: ampicilina

AMP: adenosín monofosfato

aph: *aminoglycoside phosphotransferase* (kanamicina)

apr: apramicina

ARNasa: ribonucleasa

ARNnc: ARN no codificante

ARNr: ARN ribosomal

ARNt: ARN de transferencia

ARNtm: ARN transferente-mensajero

AT: aciltransferasa

ATCC: *American Type Culture Collection*

CDS: secuencia de ADN codificante

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo

CIA: cloroformo-alcohol isoamílico

CoA: coenzima A

col.: colaboradores

Ct: ciclo umbral, *threshold Cycle*

Cy3, Cy5: cianina 3, cianina 5

Da: Dalton

ddNTP(s): didesoxinucleótido(s) trifosfato

DH: deshidratasa

DIG: digoxigenina

dNTPs: desoxinucleótido(s) trifosfato

DMSO: dimetilsulfóxido

DO: densidad óptica

DO₆₀₀: densidad óptica a 600 nm de longitud de onda

DSMZ: *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*

DTT: ditiotreitolo

ed(s): editor(es)

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EMSA: ensayo de retraso en gel

ER: enoilreductasa

FAD_{red}: flavín adenín dinucleótido reducido

FMN: flavín mononucleótido

HPQ: hexahidroxiperilenequinona

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución, *High Performance Liquid Chromatography*

hpt: *hygromycin phosphotransferase* (higromicina)

HTH: hélice-vuelta-hélice

kb: kilopares de bases

kDa: kilodaltons

KR: cetorreductasa

KS: cetosintasa

LAL: proteína de gran tamaño de unión a ATP de la familia LuxR

M: molar

Mb: megapares de bases

MCS: sitio de clonación múltiple

MFS: transportador proteico, *Major Facilitator Superfamily*

MOPS: ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico

MS: espectrometría de masas

MSH: micotiol

Mr: masa molecular

mV: milivoltios

m/z: relación masa carga

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida

NCTC: Colección Nacional de Cultivos Tipo

neo: neomicina

nm: nanómetro

NRPS: sintetasa de péptidos no ribosomales

NRRL: *Agricultural Research Service Culture Collection*

nt: nucleótido

orf: marco de lectura abierto

PAS: dominio propio de las proteínas Per, ARTN, y Sim

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PK-NRP: policétido-péptido no ribosomal

PKS(s): policétido(s) sintasa(s)

PKS-NRPS: policétido sintasa-sintetasa de péptido no ribosomal

p/v: relación peso/volumen

RIN: número de integridad del ARN

rpm: revoluciones por minuto

RT-qPCR: PCR cuantitativa acoplada a retrotranscripción

RT-PCR: PCR acoplada a retrotranscripción

SapB: proteína B asociada a la espora

SARP: proteína reguladora de la producción de antibióticos en Streptomyces

SDS: dodecilsulfato sódico

SMC: agrupación génica de metabolito secundario

TAE: tris-acetato-EDTA

TE: tioesterasa

TEMED: N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina

tet: tetraciclina

TFA: ácido trifluoro acético

Tm: temperatura de fusión

Tris: tris-hidroximetil-aminometano

tsr: tiostreptona

U: unidades de actividad enzimática

UFC: unidad formadora de colonia

UV: luz ultravioleta

vol: volumen

vs: *versus*

v/v: relación volumen/volumen

16S: 16 unidades Svedberg

23S: 23 unidades Svedberg

Índice

Abreviaturas y acrónimos.....	15
1. Introducción	27
1.1. Características del género <i>Streptomyces</i>	29
1.1.1. Descubrimiento de los actinomicetos	29
1.1.2. Taxonomía y filogenia del género <i>Streptomyces</i>	30
1.1.3. Biología general	33
1.1.3.1. Ciclo de vida	34
1.1.3.2. Regulación del desarrollo y diferenciación morfológica	38
1.1.3.3. Organización genómica.....	41
1.1.3.3.1. Cromosoma.....	41
1.1.3.3.2. Elementos genéticos extracromosomales	43
1.1.3.4. Inestabilidad genética	45
1.1.4. Metabolismo secundario.....	46
1.1.5. Regulación del metabolismo secundario.....	49
1.1.5.1. Reguladores específicos de ruta	50
1.1.5.1.1. Otros tipos de reguladores específicos de ruta: LAL y reguladores de tipo LysR	51
1.1.5.2. Reguladores globales o pleiotrópicos	52
1.1.5.2.1. Sistemas de dos componentes	53
1.1.5.2.2. Sistemas de serina-treonina quinasas	54
1.1.5.2.3. Otros reguladores pleiotrópicos	55
1.1.6. Agrupaciones biosintéticas silenciosas y/o crípticas de metabolitos secundarios.....	55
1.1.6.1. Condiciones de fermentación	56
1.1.6.2. Cocultivo con otros microorganismos.....	56
1.1.6.3. Ingeniería ribosómica y otras estrategias relacionadas	57
1.1.6.4. Uso de nuevas moléculas de señalización y compuestos remodelantes de antibióticos.....	58
1.1.6.5. Manipulación genética de reguladores.....	58
1.1.6.6. Expresión heteróloga de agrupaciones biosintéticas.....	59
1.2. Características de la especie <i>Streptomyces clavuligerus</i>	60
1.2.1. Organización genómica	61
1.2.1.1. Escenarios hipotéticos de la evolución del megaplásmido pSCL4	63
1.2.1.2. Regulación entre el megaplásmido pSCL4 y el cromosoma.....	64
1.2.1.3. Agrupaciones génicas de metabolismo secundario	65

1.2.2. Biosíntesis de compuestos β -lactámicos	66
1.2.2.1. Ruta biosintética y agrupación de la cefamicina C.....	67
1.2.2.2. Ruta biosintética y agrupación del ácido clavulánico y las clavamas.....	70
1.2.2.3. Regulación coordinada de la biosíntesis de cefamicina C y ácido clavulánico.....	74
1.2.2.3.1. Regulación específica.....	74
1.2.2.3.2. Regulación pleiotrópica de orden superior	75
1.2.3. Biosíntesis de la holomicina	78
1.2.3.1. Ruta biosintética y agrupación de la holomicina	79
1.2.3.2. Regulación de la biosíntesis de la holomicina.....	81
1.2.4. Otros metabolitos secundarios: el potencial de <i>S. clavuligerus</i>	83
1.2.4.1. Tunicamicina	83
1.2.4.2. Naringenina.....	84
1.2.4.3. Policétidos.....	84
1.2.4.3.1. Diversidad química de policétidos	85
➤ Características estructurales de los macrólidos poliénicos	86
1.2.4.3.2. Biosíntesis de los policétidos: mecanismo de las PKSs	88
1.2.4.3.3. Diversidad de las PKSs.....	90
1.2.4.4. Péptidos no ribosomales.....	91
1.2.4.5. Lantibióticos.....	93
2. Objetivos.....	95
3. Materiales y métodos.....	99
3.1. Microorganismos utilizados.....	101
3.1.1. Cepas de <i>Escherichia coli</i>	101
3.1.2. Cepas de <i>Streptomyces</i>	102
3.1.3. Otros microorganismos	105
3.2. Medios de cultivo.....	105
3.2.1. Medios de cultivo para <i>E. coli</i>	105
3.2.2. Medios de cultivo para <i>Streptomyces</i>	106
3.2.3. Otros medios	107
3.2.4. Antibióticos de los medios de cultivo.....	108
3.3. Cultivo y conservación de los microorganismos	108
3.3.1. Cultivo y medida del crecimiento	108

3.3.2. Conservación de las cepas y obtención de esporas.....	109
3.4. Vectores plasmídicos.....	110
3.4.1. Plásmidos de <i>E. coli</i>	110
3.4.2. Plásmidos con origen de replicación en <i>Streptomyces</i>	111
3.5. Métodos relacionados con la manipulación y análisis de ADN.....	112
3.5.1. Aislamiento de ADN plasmídico en <i>E. coli</i>	112
3.5.1.1 Minipreparaciones de ADN plasmídico.....	112
3.5.1.2. Lisis alcalina.....	112
3.5.2. Aislamiento de ADN total de <i>Streptomyces</i>	114
3.5.3. Limpieza y precipitación del ADN	114
3.5.4. Evaluación de la concentración y pureza de los ácidos nucleicos	115
3.5.5. Manipulación enzimática del ADN	116
3.5.5.1. Hidrólisis con endonucleasas de restricción	116
3.5.5.2. Modificación enzimática de los extremos de ADN	116
3.5.5.3. Ligación de fragmentos de ADN.....	116
3.5.6. Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR.....	117
3.5.7. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	119
3.5.8. Recuperación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa	120
3.5.8.1. Método de congelación rápida (<i>Freeze and Squeeze</i>)	121
3.5.8.2. Método de purificación en columnas <i>GFX</i>	121
3.5.9. Hibridación de ADN	122
3.5.9.1. Transferencia <i>in situ</i> de ADN de colonias.....	122
3.5.9.2. Marcaje de sondas no radiactivo	123
3.5.9.3. Hibridación y detección del ADN	124
3.5.10. Secuenciación de ADN.....	125
3.6. Introducción de ADN en <i>E. coli</i>.....	126
3.6.1. Inducción del estado de competencia.....	126
3.6.2. Transformación por choque térmico.....	127
3.6.3. Electroporación	128
3.7. Introducción de ADN en <i>Streptomyces</i>.....	128
3.8. Obtención de mutantes mediante ReDirect®	129
3.8.1. Purificación del molde para la obtención del producto de PCR	130
3.8.2. Diseño de los cebadores para la obtención del producto de PCR.....	131

3.8.3. Amplificación por PCR del casete de resistencia	131
3.8.4. Introducción por electroporación en <i>E. coli</i> BW25113/pIJ790 del cósmido portador del gen a sustituir	132
3.8.5. Sustitución del gen de interés por el casete de resistencia	132
3.8.6. Transferencia del cósmido recombinante a <i>Streptomyces</i>	133
3.9. Detección, cuantificación e identificación de metabolitos secundarios	133
3.9.1. Desarrollo de las fermentaciones y toma de las muestras	133
3.9.2. Determinación del contenido de ADN.....	134
3.9.3. Detección y cuantificación de compuestos antimicrobianos por bioensayo	135
3.9.3.1. Cuantificación de ácido clavulánico	135
3.9.3.2. Cuantificación de cefamicina C	136
3.9.3.3. Cuantificación de holomicina	137
3.9.3.4. Detección de un compuesto antifúngico	137
3.9.3.4.1. Detección en cultivo sólido.....	137
3.9.3.4.2. Detección en extractos concentrados procedentes de cultivo sólido	138
3.9.3.4.3. Detección en extractos concentrados procedentes de cultivo líquido.....	138
3.9.4. Identificación de compuestos antimicrobianos	139
3.9.4.1. Análisis de cefamicina C por HPLC-MS.....	139
3.9.4.2. Análisis de ácido clavamínico y clavulánico por HPLC.....	139
3.9.4.3. Análisis de nocardamina por HPLC.....	140
3.9.4.4. Análisis de tunicamicina por LC-MS	140
3.9.4.4.1. Análisis de los perfiles y cuantificación de los iones específicos mediante HPLC- LRMS	140
3.9.4.4.2. Búsqueda en bases de datos de metabolitos y antibióticos conocidos.....	141
3.9.4.5. Detección y análisis de un compuesto antifúngico	141
3.10. Métodos relacionados con la manipulación y análisis de ARN	142
3.10.1. Aislamiento de ARN total de <i>Streptomyces</i>	143
3.10.1.1. Estabilización del patrón transcripcional	143
3.10.1.2. Lisis enzimática y mecánica del micelio de <i>Streptomyces</i>	143
3.10.1.3. Purificación del ARN con minicolumnas del sistema <i>RNeasy® Mini Kit</i>	144
3.10.1.4. Tratamiento con ADNasa I en solución	145
3.10.2. Valoración de la concentración, pureza e integridad del ARN	146
3.10.2.1. Electroforesis de ARN en gel de agarosa	146
3.10.2.2. Electroforesis capilar de ARN.....	146
3.10.3. Análisis por PCR cuantitativa a tiempo real.....	147

3.10.3.1. Establecimiento de las condiciones de amplificación de las parejas de cebadores para la qPCR.....	149
3.10.3.2. Retrotranscripción	149
3.10.3.3. PCR cuantitativa a tiempo real.....	150
3.10.3.4. Cuantificación del amplicón obtenido por qPCR.....	151
3.10.4. Análisis transcriptómico mediante micromatrices de ADN.....	152
3.10.4.1. Diseño de las micromatrices de <i>S. clavuligerus</i>	153
3.10.4.2. Obtención de los ácidos nucleicos para la hibridación	154
3.10.4.3. Síntesis y marcaje del ADNc con Cy3-dCTP a partir de ARN total	154
3.10.4.4. Marcaje del ADN genómico con Cy5-dCTP	155
3.10.4.5. Purificación de los ácidos nucleicos marcados con Cy3 y Cy5	156
3.10.4.6. Cuantificación de los ácidos nucleicos marcados con Cy3 y Cy5	157
3.10.4.7. Hibridación de las micromatrices 8x15K.....	158
3.10.4.7.1. Preparación de las mezclas de marcajes para la hibridación.....	158
3.10.4.7.2. Montaje e incubación de las hibridaciones	159
3.10.4.8. Lavados de la hibridación.....	160
3.10.4.9. Lectura de la fluorescencia	161
3.10.4.10. Procesado de las señales fluorescentes de hibridación	161
3.11. Recursos informáticos	162
4. Resultados y discusión.....	165
Capítulo 4.1: Expresión heteróloga de la agrupación génica de la cefamicina C de <i>S. clavuligerus</i>	
ATCC 27064.....	167
4.1.1. Introducción	169
4.1.2. Obtención del cósmido portador de la agrupación génica de la cefamicina C	171
4.1.2.1. Aislamiento del clon portador de la agrupación génica de la cefamicina C.....	171
4.1.2.2. Caracterización del cósmido G6_15.....	172
4.1.3. Construcción de un plásmido para la integración y expresión constitutiva del gen regulador <i>ccaR</i>	174
4.1.4. Construcción de un plásmido para la integración de la agrupación de la cefamicina C.....	176
4.1.5. Obtención de las cepas de expresión heteróloga: integración de P_{fur} - <i>ccaR</i> y de la agrupación génica de la cefamicina C	178
4.1.5.1. Elección de las cepas hospedadoras para la expresión heteróloga	178
4.1.5.2. Integración del gen regulador <i>ccaR</i> en el genoma de los hospedadores.....	180

4.1.5.3. Integración de la agrupación génica de la cefamicina C en el genoma de los hospedadores	180
4.1.6. Caracterización de las cepas de expresión heteróloga.....	182
4.1.6.1. Análisis de la producción de cefamicina C	182
4.1.6.2. Validación por HPLC-MS de la producción de cefamicina C por <i>S. flavogriseus</i> ::[SCos-CF]	186
4.1.6.3. Caracterización del nivel de resistencia a antibióticos β -lactámicos	187
4.1.6.4. Análisis de la expresión heteróloga de los genes integrados.....	189
Capítulo 4.2: El regulador específico de ruta ClaR de <i>S. clavuligerus</i>: efecto global en la expresión de genes del metabolismo secundario y la diferenciación morfológica.....	193
4.2.1. Introducción	195
4.2.2. Obtención del mutante <i>S. clavuligerus</i> Δ <i>claR</i> :: <i>aac</i>	197
4.2.3. Estimación del número de copias de los plásmidos pSCL1, pSCL2 y pSCL4 en <i>S. clavuligerus</i> Δ <i>claR</i> :: <i>aac</i>	198
4.2.4. Construcción de un plásmido para la complementación de <i>S. clavuligerus</i> Δ <i>claR</i> :: <i>aac</i>	199
4.2.5. Análisis de la producción de antibióticos en <i>S. clavuligerus</i> Δ <i>claR</i> :: <i>aac</i> y en la cepa complementada	199
4.2.6. Análisis de la expresión global en <i>S. clavuligerus</i> Δ <i>claR</i> :: <i>aac</i> mediante micromatrices en comparación con la cepa silvestre	200
4.2.6.1. Transcripción diferencial de las agrupaciones génicas de ácido clavulánico, clavamas y SMCp25	202
4.2.6.2. Transcripción diferencial de la agrupación génica de la cefamicina C.....	206
4.2.6.3. Transcripción diferencial de la agrupación génica de la holomicina.....	208
4.2.6.4. Otras agrupaciones génicas de metabolitos secundarios afectadas por la pérdida de ClaR.....	209
4.2.6.4.1. Agrupación SMCp20	210
4.2.6.4.2. Agrupación SMCp22	211
4.2.6.4.3. Agrupación SMCp24	212
4.2.6.4.4. Agrupación SMC6	213
4.2.6.5. Otros genes afectados en <i>S. clavuligerus</i> Δ <i>claR</i> :: <i>aac</i>	214
4.2.6.5.1. Genes reguladores	214
➤ Respuesta al estrés oxidativo: el regulón RpoE	214
➤ Agrupación de biosíntesis de la estaurosporina	215
➤ Diferenciación celular: el operón <i>amfTSBAR</i>	216
➤ Sistema de dos componentes CutR-CutS.....	221
4.2.6.5.2. Genes con funciones diversas en la célula.....	221

4.2.6.6. Validación de los datos transcriptómicos	223
Capítulo 4.3: El megaplásmido pSCL4 de <i>S. clavuligerus</i>: efecto global en la expresión de genes del metabolismo secundario y la diferenciación	225
4.3.1. Introducción	227
4.3.2. Obtención del mutante <i>S. clavuligerus</i> pSCL4 ⁻	227
4.3.3. Análisis de la producción de antibióticos en <i>S. clavuligerus</i> pSCL4 ⁻	227
4.3.4. Análisis de la expresión global en <i>S. clavuligerus</i> pSCL4 ⁻ mediante micromatrices en comparación con la cepa silvestre	228
4.3.4.1. Transcripción diferencial de las agrupaciones génicas de ácido clavulánico y clavamas	230
4.3.4.2. Transcripción diferencial de la agrupación génica de la cefamicina C	231
4.3.4.3. Transcripción diferencial de la agrupación génica de la holomicina	232
4.3.4.4. Otras agrupaciones génicas de metabolitos secundarios afectadas por la eliminación de pSCL4	233
4.3.4.4.1. Agrupación SMC1	235
4.3.4.4.2. Agrupación SMC2	236
4.3.4.4.3. Agrupación SMC3	237
4.3.4.4.4. Agrupación SMC4	238
4.3.4.4.5. Agrupación SMC5	238
4.3.4.4.6. Agrupación SMC6	240
4.3.4.4.7. Agrupación SMC7	240
4.3.4.4.8. Agrupación SMC8	241
4.3.4.4.9. Agrupación de la tunicamicina	243
4.3.4.4.10. Agrupación SMC12	244
4.3.4.4.11. Agrupación SMC13	245
4.3.4.4.12. Agrupación SMC19	246
4.3.4.4.13. Agrupación SMC20	247
4.3.4.4.14. Agrupación SMC21	248
4.3.4.4.15. Agrupación SMC22	249
4.3.4.4.16. Agrupación SMC23	250
4.3.4.5. Agrupaciones génicas cromosómicas de metabolitos secundarios: visión general	250
4.3.4.6. Otros genes afectados en <i>S. clavuligerus</i> pSCL4 ⁻	251
4.3.4.6.1. Genes reguladores	251
➤ Estrés: envolturas celulares	252
➤ Estrés oxidativo	254
➤ AtrA	256

➤ Factores sigma B y sigma Q	257
4.3.4.6.2. Genes con funciones diversas en la célula.....	257
➤ Diferenciación morfológica.....	258
4.3.4.7. Visión general del análisis transcriptómico en <i>S. clavuligerus</i> pSCL4 ⁻	262
4.3.4.8. Validación de los datos transcriptómicos	265
Capítulo 4.4: Efecto del regulador PimM sobre el metabolismo secundario de <i>S. clavuligerus</i>:	
activación de agrupaciones génicas silenciosas.....	267
4.4.1. Introducción	269
4.4.2. Búsqueda <i>in silico</i> de reguladores PAS-LuxR en <i>S. clavuligerus</i>	271
4.4.3. Obtención de <i>S. clavuligerus::pimM</i>	274
4.4.4. Comprobación de la expresión heteróloga de <i>pimM</i> en <i>S. clavuligerus::pimM</i>	274
4.4.5. Estimación del número de copias de los plásmidos pSCL1, pSCL2 y pSCL4 en <i>S. clavuligerus::pimM</i>	276
4.4.6. Análisis de la producción de nuevos metabolitos secundarios en <i>S. clavuligerus::pimM</i>	277
4.4.6.1. Detección de nuevos metabolitos producidos en medio sólido.....	277
4.4.6.2. Detección de nuevos metabolitos producidos en medio líquido.....	280
4.4.6.3. Análisis mediante HPLC del compuesto antifúngico producido por <i>S. clavuligerus::pimM</i>	281
4.4.7. Análisis de la producción de ácido clavulánico y cefamicina C en <i>S. clavuligerus::pimM</i>	284
4.4.8. Análisis transcriptómico del efecto de PimM sobre el genoma de <i>S. clavuligerus</i>	285
4.4.8.1. Transcripción diferencial de las agrupaciones génicas de ácido clavulánico, clavamas y SMCp25	287
4.4.8.2. Transcripción diferencial de la agrupación génica de la cefamicina C.....	289
4.4.8.3. Otras agrupaciones génicas de metabolitos secundarios afectadas por la presencia de PimM	291
4.4.8.3.1. Agrupaciones génicas activadas	291
➤ Agrupación SMC6	291
➤ Agrupación SMC13	293
➤ Agrupación SMCp5	295
➤ Agrupación SMC14	296
4.4.8.3.2. Agrupaciones génicas reprimidas	297
4.4.8.4. Otros genes afectados por el regulador PimM	298
4.4.8.4.1. Genes reguladores.....	298
➤ Factor sigma U	299
4.4.8.4.2. Genes con funciones diversas en la célula.....	299
4.4.8.5. Validación de los datos transcriptómicos	301

4.4.9. Posibles agrupaciones responsables de la biosíntesis del compuesto antifúngico en <i>S. clavuligerus::pimM</i>	301
5. Visión global	303
6. Conclusiones.....	313
7. Bibliografía.....	317
8. Anexo	361
9. Publicaciones	435

1. Introducción

1.1. Características del género *Streptomyces*

1.1.1. Descubrimiento de los actinomicetos

El género *Streptomyces* se originó hace unos 440 millones de años tras la colonización de la tierra por las plantas verdes y el aumento del oxígeno en la atmósfera (Chater y Chandra, 2006). Este género está constituido por microorganismos que pertenecen al grupo de los actinomicetos. Los actinomicetos fueron descubiertos a finales del siglo XIX como agentes etiológicos de enfermedades mortales como la lepra o la tuberculosis (Hansen, 1874; Koch, 1882; Hopwood, 2007). En las siguientes décadas se describieron otros muchos microorganismos, especialmente habitantes del suelo, con características morfológicas semejantes. El grupo se reconoció oficialmente en 1916 con el nombre latino de *Actinomycetales* (Buchanan, 1916; Hopwood, 2007). El primer microorganismo del género *Streptomyces* fue descrito en 1875 (Cohn, 1875; Hopwood, 2007). Este microorganismo, que presentaba una morfología de células interconectadas y ramificadas, fue denominado *Streptothrix*. Posteriormente, tras la clasificación de Waksman y Henrici en 1943, dada su capacidad para formar esporas en cadenas, el nombre de *Streptothrix* fue cambiado por el de *Streptomyces* (Hopwood, 2007).

Tras el descubrimiento de la penicilina en 1928 por Alexander Fleming, y debido a la gran efectividad que este antibiótico presentaba frente a bacterias Gram positivas, Selman Waksman centró su trabajo en la búsqueda de nuevos antibióticos activos frente a las bacterias Gram negativas. El grupo de Waksman estudió el potencial clínico de tres grupos de microorganismos del suelo, bacterias, hongos y actinomicetos, y observó que el grupo de los actinomicetos era el que presentaba mayor potencial productor de sustancias antimicrobianas. En 1943, en el grupo de Waksman, Albert Schatz descubrió la producción de estreptomina por *Streptomyces griseus*. Este antibiótico era eficaz no solamente frente a bacterias Gram negativas, sino también frente al bacilo de la tuberculosis, por lo que rápidamente comenzó su producción industrial. En las siguientes décadas, especialmente entre los años 50 y 70, se descubrió un gran número de nuevos antibióticos en este grupo de bacterias. De este modo, los actinomicetos se convirtieron en el grupo de microorganismos de mayor interés en la industria farmacéutica (Hopwood, 2007).

1.1.2. Taxonomía y filogenia del género *Streptomyces*

Hasta el siglo XX, las características más estudiadas de los microorganismos, especialmente en los patógenos y en los productores de compuestos de interés clínico, eran caracteres fenotípicos, principalmente morfológicos. En 1943, Waksman y Henrici desarrollaron un sistema de clasificación de los actinomicetos (figura 1.1). La capacidad para formar células ramificadas fue propuesta como característica distintiva del grupo y el grado de ramificación permitió diferenciar tres grupos, dos de los cuales se subdividían, dando lugar a un total de cinco géneros.

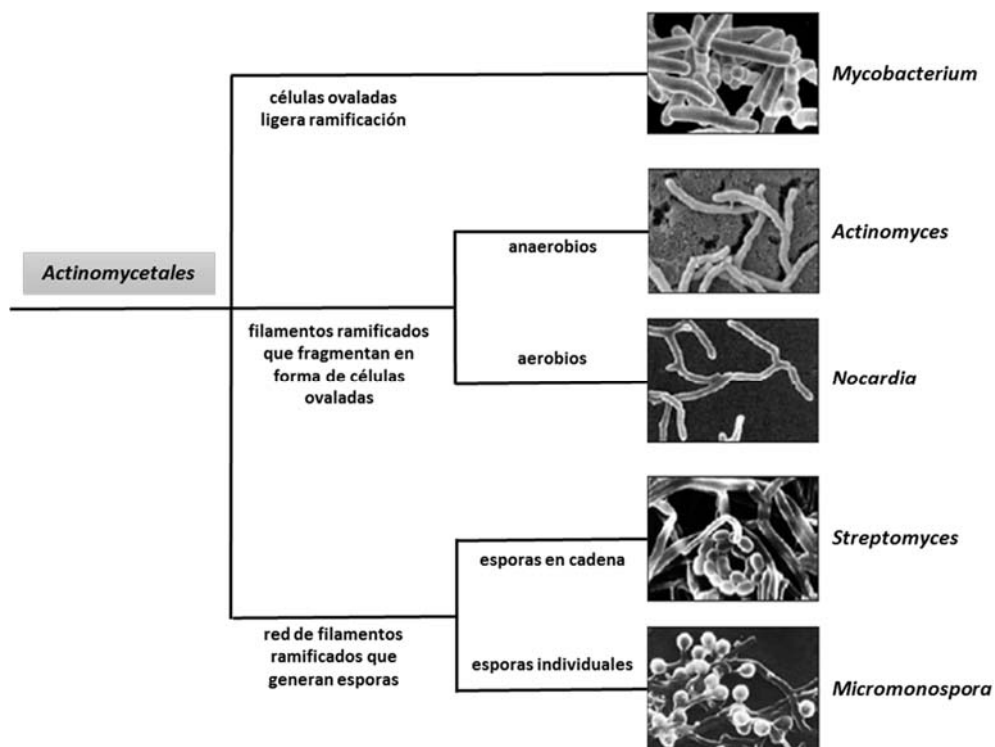


Figura 1.1. Clasificación del orden *Actinomycetales* según Waksman y Henrici basado en caracteres morfológicos. (Modificado de Hopwood, 2007).

El primer género, *Mycobacterium*, incluía bacilos con una ligera ramificación, como los bacilos de la lepra y la tuberculosis. Un segundo grupo contenía organismos que formaban una masa de filamentos ramificados que con el tiempo se fragmentaban formando células ovaladas. En función de su capacidad para crecer en condiciones anaerobias o aerobias, fueron clasificados en dos géneros, *Actinomyces* y *Nocardia*, respectivamente. El tercer grupo se caracterizaba por la formación de una densa red de hifas ramificadas e interconectadas que daban lugar a esporas. Este último grupo se dividía, a su vez, en dos géneros: *Streptomyces*, que producía esporas en cadena, y *Micromonospora*, en el que aparecían esporas individuales.

El descubrimiento de los antibióticos producidos por el género *Streptomyces* en los años 40 llevó a una búsqueda extensiva de nuevos compuestos bioactivos. Seguidamente, la necesidad de patentar desencadenó la aparición de un gran número de especies, lo que resultó en la sobreclasificación del género. En 1964, con el objetivo de definir nuevos criterios para la caracterización de las especies, se creó el *International Streptomyces Project* (ISP) (Shirling y Gottlieb, 1966; 1972). Más de 450 especies de *Streptomyces* fueron reclasificadas y, junto con las cepas tipo seleccionadas, se depositaron en colecciones de cultivos tipo reconocidas internacionalmente (Anderson y Wellington, 2001).

La introducción de nuevos criterios fenotípicos en la clasificación y el análisis matemático de los mismos, conocido como taxonomía numérica, permitió resolver las relaciones intergenéricas dentro de la familia *Streptomycetaceae* (Williams y col., 1983). Con la aparición de nuevos métodos de biología molecular, como la secuenciación y comparación de secuencia del ARNr 16S, se consiguió determinar relaciones a nivel de género, especie y cepa. Estos nuevos sistemas analíticos, junto con la integración de la información genotípica, fenotípica y filogenética (Vandamme y col., 1996), lo que hoy se conoce como taxonomía polifásica, ha permitido identificar nuevas cepas de especies ya existentes, problema que persistía dentro de la taxonomía de los estreptomicetos (Anderson y Wellington, 2001).

La mayoría de los estudios taxonómicos realizados en el grupo de los *Actinomycetales*, se basan en la secuencia del ARNr 16S o de otros genes individuales que están sujetos a posible transferencia horizontal, tasas variables de mutación y de recombinación, por lo que no reflejan adecuadamente la relación filogenética (Rokas y col., 2003). La secuenciación de genomas completos ha permitido desarrollar filogenias con mayor resolución y fiabilidad (Ventura y col., 2007; Alam y col., 2010).

La segunda edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, publicada en el año 2012, dedica su quinto volumen al grupo *Actinobacteria*. En este nuevo volumen, partiendo de la última clasificación basada en la secuenciación del ARN ribosomal de las subunidades 16S y 23S, la presencia de inserciones y deleciones en determinadas proteínas y las reorganizaciones génicas características (Goodfellow y Fiedler, 2010), los taxones subclase y suborden son elevados a la categoría de clase y orden, respectivamente, con el objetivo de hacer más consistente este grupo grande y complejo, facilitando así la comparación entre filos. De este modo, el filo *Actinobacteria* queda constituido por 6 clases, 22 órdenes, 53 familias y 222 géneros (Ludwig y col., 2012a, b) (figura 1.2).

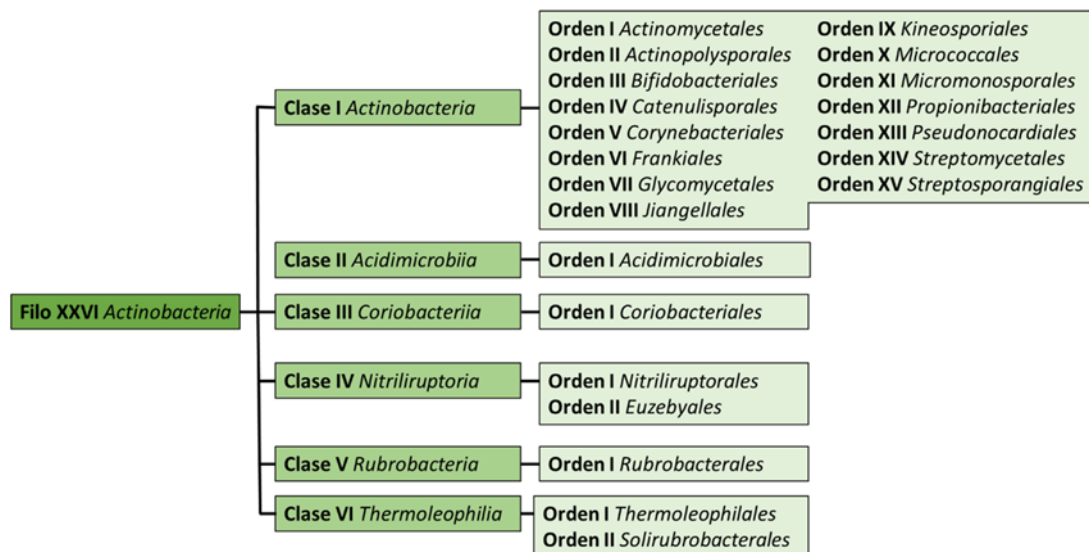


Figura 1.2. Clasificación taxonómica propuesta para el grupo *Actinobacteria* en la última edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. (Modificado de Gao y Gupta, 2012).

El filo *Actinobacteria* está compuesto por bacterias Gram positivas con alto contenido en G+C en su genoma, desde valores del 41,5 % en *Gardnerella vaginalis* hasta valores superiores al 70 % en algunos *Streptomyces* (Gao y Gupta, 2012; Goodfellow, 2012a). Dentro de este filo se incluye la clase *Actinobacteria*, grupo que presenta una amplia variabilidad morfológica, incluyendo desde cocos en el género *Micrococcus* hasta el micelio ramificado estable que forma micelio aéreo y se diferencia en cadenas de esporas, como es el caso de *Streptomyces*. Los miembros de este filo presentan una amplia distribución tanto en ambientes terrestres como acuáticos, incluyendo hábitats extremos como los sedimentos de los fondos marinos y los suelos desérticos. Son particularmente abundantes en el suelo, donde desempeñan un papel muy importante en la degradación de la materia orgánica. Algunos son patógenos de animales o plantas, comensales de plantas, simbioses fijadores del nitrógeno o habitantes del tracto gastrointestinal (Ventura y col., 2007; Goodfellow, 2012b).

El orden *Streptomycetales* ha sido creado por elevación del suborden *Streptomycineae* (Stackebrandt y col., 1997; Zhi y col., 2009) y presenta las mismas características que las de la familia *Streptomycetaceae* (Kämpfer, 2012a). La familia *Streptomycetaceae* está constituida por el género *Streptomyces* y otros dos géneros clasificados como *incertae sedis*, por ello, las características de esta familia son prácticamente idénticas a las descritas a continuación para el género *Streptomyces* (Goodfellow, 2012a; Kämpfer, 2012b).

La clasificación taxonómica actual del género *Streptomyces* es la siguiente (Ludwig y col., 2012a, b):

Dominio *Bacteria*

Filo XXVI. *Actinobacteria*

Clase I. *Actinobacteria*

Orden XIV. *Streptomyetales*

Familia I. *Streptomycetaceae*

Género I. *Streptomyces*

El género *Streptomyces* es uno de los grupos más numerosos y diversos de bacterias. Hasta el momento se han descrito más de 800 especies y subespecies (Euzéby, 1997) las cuales aparecen reflejadas y se van actualizando en la página web: <http://www.bacterio.net/index.html>. Además, continuamente están apareciendo nuevas especies, lo que nos indica que todavía queda mucho por descubrir de este género de microorganismos.

1.1.3. Biología general

El género *Streptomyces* está constituido por bacterias aerobias, Gram positivas, con alto contenido en G+C en su genoma, entre el 66 y el 78 %. Presenta un complejo ciclo de vida que comprende la formación de micelio substrato y aéreo ampliamente ramificado que culmina con la formación de esporas. Muchas especies producen compuestos con actividad antibiótica. Se caracterizan por su pared celular de Tipo I que presenta ácido LL-diaminopimélico y glicina, y carece de azúcares característicos, constituyendo el peptidoglicano de tipo A3 γ (Lechevalier y Lechevalier, 1970), y por su membrana celular que presenta fosfatidiletanolamina como fosfolípido característico (Lechevalier, 1977; Lechevalier y col., 1981). Las bacterias de este género son las más numerosas y ubicuas en el suelo, pudiendo encontrarse también en ambientes marinos y como patógenos de animales, humanos y plantas. Su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre los 25-35 °C y su pH óptimo entre 6,5 y 8 (Hodgson, 2000; Kämpfer, 2012c).

Generalmente saprófitos, tienen como principal fuente de nutrientes los productos de la descomposición de restos procedentes de vegetales y otros organismos. Por ello, presentan un

gran número de enzimas hidrolíticas extracelulares, como amilasas, quitinasas, celulasas, xilanasas, lipasas, nucleasas, proteasas, entre muchas otras, que les confieren gran versatilidad nutricional (Chater y col., 2010) y les permiten emplear diferentes fuentes de carbono como azúcares, polisacáridos, alcoholes, ácidos orgánicos, aminoácidos y compuestos aromáticos, para la obtención de energía (Williams y col., 1983).

1.1.3.1. Ciclo de vida

El género *Streptomyces* presenta un complejo ciclo de vida que se asemeja al de los hongos filamentosos ya que ambos forman hifas ramificadas que constituyen una estructura micelial. Forman también exsporas inmóviles, pigmentadas e hidrófobas, resistentes a la sequedad y a condiciones de cierta acidez, pero no a las altas temperaturas. Estas estructuras de resistencia se dispersan con gran facilidad y están presentes en el suelo de manera habitual. Cuando las condiciones de humedad y nutrientes son favorables, la espora germina cerrando este ciclo vital (figura 1.3) (Chater y Chandra, 2006; Flårdh y Buttner, 2009).

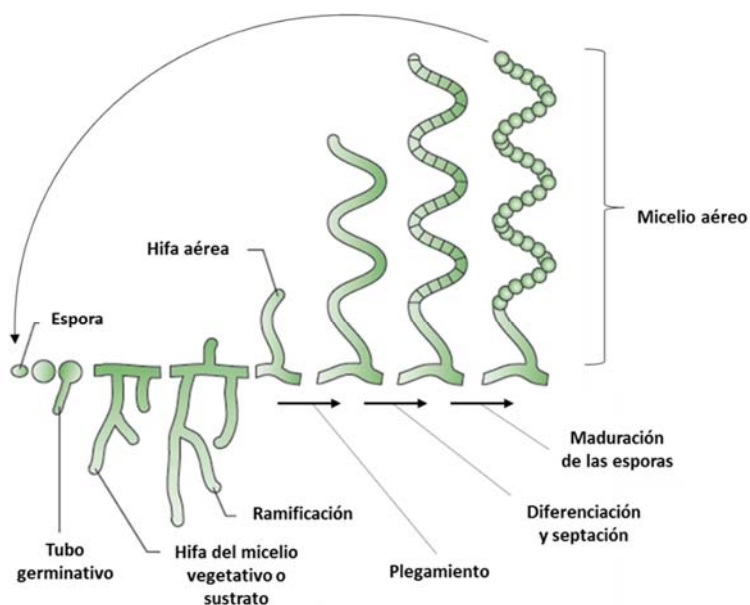


Figura 1.3. Esquema de la diferenciación morfológica en el ciclo de vida de *Streptomyces*. (Modificado de Flårdh y Buttner, 2009).

En los últimos años se ha profundizado en el estudio del desarrollo del micelio y se ha propuesto un nuevo modelo de ciclo celular en el proceso de diferenciación morfológica de *Streptomyces* (figura 1.4) (Manteca y Sanchez, 2009).

La germinación de la espora constituye la primera etapa del desarrollo y comprende, a su vez, tres etapas: el oscurecimiento, que requiere cationes divalentes exógenos (Ca^{2+} , Mg^{2+} o Fe^{2+}) (Eaton y Ensign, 1980; Salas y col., 1983) y reservas energéticas de la espora en forma del disacárido trehalosa (McBride y Ensign, 1987); el aumento de tamaño, que consume fuentes de carbono exógenas; y la emisión del tubo germinativo, que emplea fuentes de carbono y nitrógeno adicionales (Hardisson y col., 1978), así como hidrolasas de la pared celular (Haiser y col., 2009).

El tubo germinativo crece mediante la síntesis de pared celular apical dirigida por la proteína DivIVA y, posteriormente, se ramifica dando lugar a un micelio primario compartimentalizado (MI) (Manteca y col., 2005; Flärdh y Buttner, 2009). Las membranas de los septos del MI presentan generalmente paredes celulares finas (Manteca y col., 2005; Manteca y Sanchez, 2009) que podrían facilitar la comunicación celular dentro de las hifas de *Streptomyces* (Yagüe y col., 2013a). Este micelio (MI) parece ser el verdadero micelio vegetativo en la naturaleza como se ha observado tras el análisis del desarrollo de *Streptomyces* en el suelo (Manteca y Sanchez, 2009).

El MI experimenta una ronda de muerte celular programada (PCD, del inglés *programmed cell death*) (Miguélez y col., 1999; Fernández y Sánchez, 2002; Manteca y col., 2006b), probablemente, como respuesta al estrés por escasez de nutrientes, disponibilidad de oxígeno y concentración de radicales libres (Kelemen y col., 2001; Hahn y col., 2002; Van Keule y col., 2003; Manteca y col., 2005), con la consecuente desorganización de la estructura de las hifas, degradación del cromosoma y liberación de los constituyentes de la pared celular al medio (Manteca y col., 2006a). Seguidamente, los segmentos miceliales viables se diferencian formando hifas multinucleadas que constituyen el segundo micelio (MII) (Manteca y col., 2006a, b). El crecimiento del MII es viable tanto en la superficie como en el interior del agar (micelio sustrato o temprano) hasta que se lleve a cabo una segunda ronda de PCD (Wildermuth, 1970; Méndez y col., 1985; Miguélez y col., 1999; Manteca y col., 2006a).

Tras la segunda ronda de muerte celular programada, las hifas lisadas del MII liberan nutrientes que el MII viable reutiliza formando la cubierta hidrofóbica y creciendo hacia el aire para formar el micelio aéreo o tardío (Méndez y col., 1985; Claessen y col., 2006). En la formación de esta cubierta participan tres tipos de proteínas: el péptido surfactante de tipo lantibiótico SapB (del inglés, *spore-associated protein B*) (*operón ramCSABR*) (Keijse y col., 2002; O'Connor y col., 2002), las chaplinas (genes *chpA-H*) (Elliot y col., 2003) y las proteínas accesorias

rodlinas (genes *rdIA* y *rdIB*) (Claessen y col., 2004), permitiendo a las hifas aéreas romper la tensión superficial del medio acuoso y crecer hacia el aire (Claessen y col., 2006; Flärdh y Buttner, 2009). El micelio sustrato es considerado micelio vegetativo y las hifas del micelio aéreo son consideradas hifas especializadas destinadas a esporular (Chater, 1984), sin embargo, ambos podrían estar produciendo antibióticos para prevenir la competición con otros microorganismos durante la esporulación (Yagüe y col., 2013a).

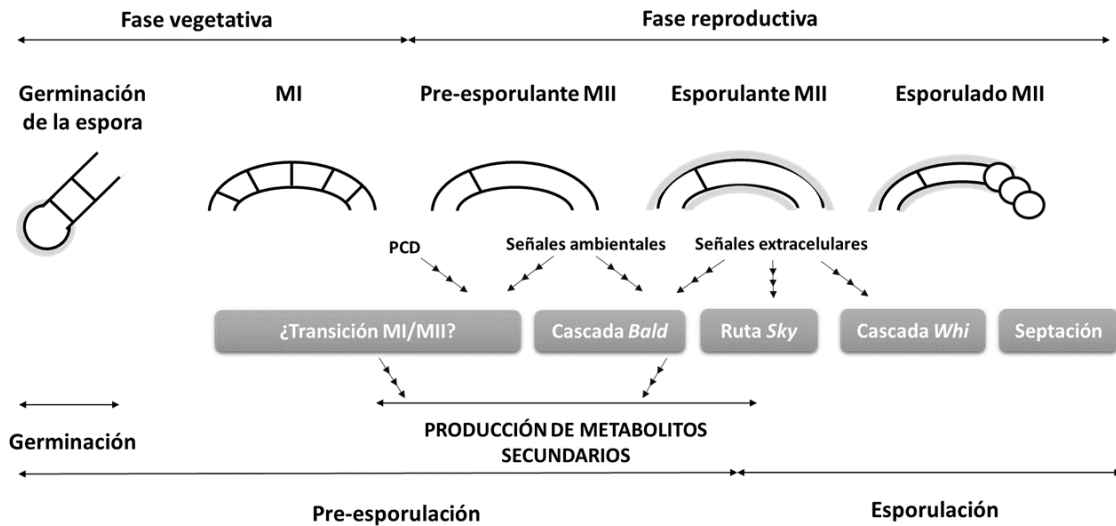


Figura 1.4. Etapas del ciclo de vida y rutas de regulación de la diferenciación de *Streptomyces*. (Modificado de Yagüe y col., 2013a).

La última etapa del desarrollo de *Streptomyces* en cultivo sólido es la esporulación. La formación de las esporas implica la formación de la célula esporogénica, la segregación de los cromosomas, el ensamblaje de la pared celular y la división celular (Flärdh y Buttner, 2009). En la segregación de los cromosomas intervienen las proteínas SsgA, SsgB, ParA, ParB y FtsK (figura 1.5) (Flärdh y Buttner, 2009; Jakimowicz y Van Wezel, 2012). En la hifa aérea joven, las proteínas SsgA se localizan en la zona apical y en torno al ADN, y las ATPasa ParA se localiza en el extremo apical. Posteriormente, SsgA y SsgB se colocan temporalmente en lados alternos de la hifa aérea, mientras que ParA forma unos filamentos helicoidales a lo largo de la célula esporogénica. A continuación, estos filamentos helicoidales dirigen el ensamblaje de ParB a la región *oriC* de los cromosomas (Jakimowicz y col., 2007). La translocasa FtsK se ensambla formando un filamento en espiral a lo largo de la hifa y se sitúa, colocalizada con SsgB, en los septos de división formados por encima del material genético no segregado (Grantcharova y col., 2005; Willemse y col., 2011). Finalmente, las proteínas SsgB fijan las proteínas FtsZ a la membrana formando el

anillo Z, produciéndose la condensación y segregación de los cromosomas, seguida de la formación del septo de esporulación (Flärdh, 2003a).

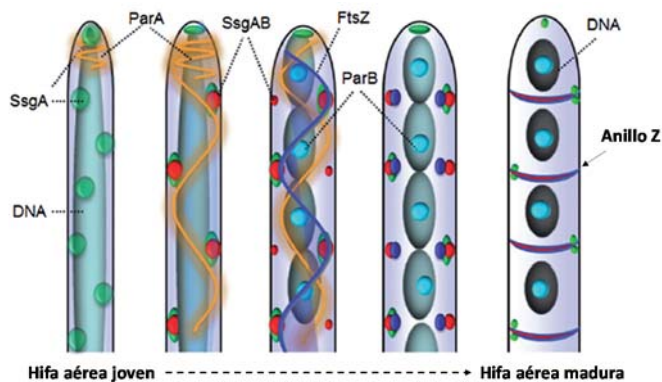


Figura 1.5. Segregación de los cromosomas durante la diferenciación de hifa aérea joven a hifa aérea madura previa a la esporulación. Modelo para el control de la formación del anillo Z en *Streptomyces*. (Modificado de Jakimowicz y Van Wezel, 2012).

En cuanto a la coordinación del ensamblaje de la pared celular y la división celular, la proteína DivIVA dirige el crecimiento apical de las hifas de micelio aéreo (Flärdh, 2003b). A continuación, el crecimiento se detiene y se forma la célula esporogénica en el ápice de las hifas aéreas. Tras la segregación de los cromosomas, se constituye el septo de cierre y la proteína MreB forma unas paredes gruesas a lo largo del mismo distribuyéndose, finalmente, alrededor de la spora en desarrollo (Mazza y col., 2006) que, tras madurar y adquirir su pigmentación característica, es liberada mediante un proceso de rotura autolítica (Yagüe y col., 2012).

La mayoría de las especies del género *Streptomyces* no esporulan en medio líquido y la formación de metabolitos secundarios tendría lugar en el micelio sustrato en la fase estacionaria tras una parada transitoria del crecimiento (Yagüe y col., 2013a). A pesar de esto, se ha visto esporulación en medio líquido en varias especies de estreptomicetos como *Streptomyces venezuelae* (Glazebrook y col., 1990) o *S. griseus* (Kendrick y Ensign, 1983). Además, en cultivos líquidos de *Streptomyces coelicolor* con un preinóculo diluido, la parada del crecimiento, la aparición del MII y la producción de antibióticos se retrasan, lo que demuestra que la producción de antibióticos está asociada al MII, lo que relaciona la diferenciación morfológica con la producción de metabolitos secundarios en medio líquido (Manteca y col., 2008).

Análisis proteómicos (Manteca y col., 2010a, b) y transcriptómicos (Yagüe y col., 2013b) demuestran que, tanto en medio sólido como líquido, MI está asociado al metabolismo primario, y MII a la producción de metabolitos secundarios. La mayor diferencia entre el MII en sólido y en líquido son las proteínas implicadas en la formación de la cubierta hidrofóbica y la esporulación (Manteca y col., 2008; 2010b). Sin embargo, la diferenciación del MII tras el paro

del crecimiento micelial no es suficiente para garantizar la producción de metabolitos secundarios ya que puede también estar regulado por señales ambientales, incluyendo componentes del medio de cultivo como carbono (Sánchez y col., 2010), nitrógeno (Aharonowitz, 1980) y fostato (Chouayekh y Virolle, 2002; Martín, 2004).

Las fases MI, MII y PCD han sido descritas en *Streptomyces antibioticus* ATCC 11891 (Miguélez y col., 1999; Manteca y col., 2005) o *Streptomyces coelicolor* M145 (Manteca y col., 2007). Sin embargo, la existencia de estos estados de desarrollo pueden ser considerados generales para el género *Streptomyces* tras el análisis de cientos de cepas (Manteca y col., 2008; Yagüe y col., 2013a).

1.1.3.2. Regulación del desarrollo y diferenciación morfológica

A lo largo del complejo ciclo de vida de los *Streptomyces* se producen importantes cambios morfológicos y fisiológicos en respuesta a diversas señales ambientales. Ambos procesos de diferenciación se encuentran bajo un estrecho control dado que en la mayoría de los estreptomicetos la producción de metabolitos secundarios se produce de manera coordinada con la diferenciación morfológica (Flärdh y Buttner, 2009; McCormick y Flärdh, 2012). La regulación de la diferenciación morfológica en *Streptomyces* se ha estudiado de manera clásica mediante la obtención de mutantes defectivos en el desarrollo. Estos se han clasificado en dos principales categorías fenotípicas: los mutantes *bald* (calvos) y los mutantes *white* (blancos) (Claessen y col., 2006; Hopwood, 2007; McCormick y Flärdh, 2012).

La mayoría de los genes identificados como importantes en la formación de micelio aéreo son los *bld*. Los mutantes *bald* o calvos son incapaces de formar micelio aéreo y, concretamente, en los mutantes *bldA*, *bldB*, *bldC*, *bldD*, *bldG*, *bldH* y *bldJ* disminuye la producción de antibióticos (Elliot y col., 2008). Estos genes codifican proteínas reguladoras que desempeñan su función en la recepción y/o transducción de señales interaccionando en una cascada que culmina con la producción de dos clases de moléculas estructurales necesarias para el desarrollo del micelio aéreo, el péptido surfactante SapB (codificado por la agrupación génica *ram*) y las chaplinas (genes *chpA* a *chpH*), etapa clave en la iniciación de la diferenciación celular en *S. coelicolor* (Kodani y col., 2004; Di Berardo y col., 2008; Elliot y col., 2008; Flärdh y Buttner, 2009). Otros genes importantes en este estado de desarrollo son: *bldK*, *bldL*, *bldM*, *bldN*, *citA*, *acoA*, *cya*, *cplP1*, *catB*, *dasR* y *brgA* (Elliot y col., 2008).

Un importante mecanismo regulador del desarrollo a través del control de la expresión génica en *Streptomyces* es el gen *bldA*. Este codifica el único ARNt que permite la eficiente transcripción de los genes que contienen el codón TTA para leucina. Únicamente entre el 2-3 % de los genes de las especies de *Streptomyces* contienen este codón. Los codones TTA no aparecen en los genes que se expresan durante el crecimiento vegetativo, ni en los genes estructurales de la diferenciación morfológica o la producción de antibióticos; pero en cambio, sí aparecen en genes implicados en esporulación o regulación de producción de antibióticos (Leskiw y col., 1991; Chater y Chandra, 2008). Uno de estos genes con codón TTA es *adpA*, con un importante papel regulador en el desarrollo, que a su vez regula al propio *bldA* a nivel transcripcional (Higo y col., 2011).

Los mutantes *white* o blancos se encuentran bloqueados en diferentes etapas de la formación de esporas maduras con pigmentación, generalmente gris, si bien, en algunos casos, presentan solo incapacidad para la pigmentación (Hopwood y col., 1970; Chater, 2011; McCormick y Flärdh, 2012). La mayoría de los genes implicados de manera específica en la esporulación de las hifas aéreas en *S. coelicolor* han sido denominados *whi*: *whiA*, *whiB*, *whiD*, *whiE*, *whiG*, *whiH*, *whiI*, *whiJ*, *whiL*, *whiM*, *whiO*, *sigF*, *ssgA*, *ssgB* y *ssgR* (Elliot y col., 2008).

El estudio de estos mutantes, *bld* y *whi*, ha permitido la identificación de otros genes, muchos de ellos reguladores del desarrollo, implicados en las diferentes etapas desde el desarrollo del micelio aéreo hasta la maduración de las esporas (McCormick y Flärdh, 2012).

Estudios en *S. griseus* han identificado a AdpA como uno de los principales reguladores tanto del metabolismo secundario como de la diferenciación morfológica (figura 1.6) (Horinouchi, 2007). Esta proteína de la familia AraC/XylS interviene en la regulación de la respuesta de la molécula señal de tipo γ -butirolactona (factor A). El receptor específico del factor A (ArpA), que tiene una única diana específica en *S. griseus*, reprime el promotor de *adpA* (Ohnishi y col., 2005). En presencia de factor A, ArpA se disocia del ADN permitiendo la expresión de *adpA*. La proteína AdpA entonces activa transcripcionalmente un gran regulón de genes implicados en la esporulación o producción de antibióticos, incluyendo: 1) los genes reguladores específicos de la ruta de la biosíntesis de estreptomicina (*strR*), glixazona (*gliR*) y policétidos HPQ (*orf1*), 2) *amfR*, el gen regulador del operón *amfTSBA* responsable de la síntesis del péptido surfactante SapB, 3) *adsA* que codifica el factor sigma AdsA de la ARN polimerasa, 4) *ssgA*, requerido para el control de la septación en la esporulación, 5) *sgiA* que codifica un inhibidor de proteasa y 6)

varios genes para proteasas secretadas y otras proteínas extracelulares como la metaloendopeptidasa SgmA (Horinouchi, 2007; McCormick y Flärdh, 2012).

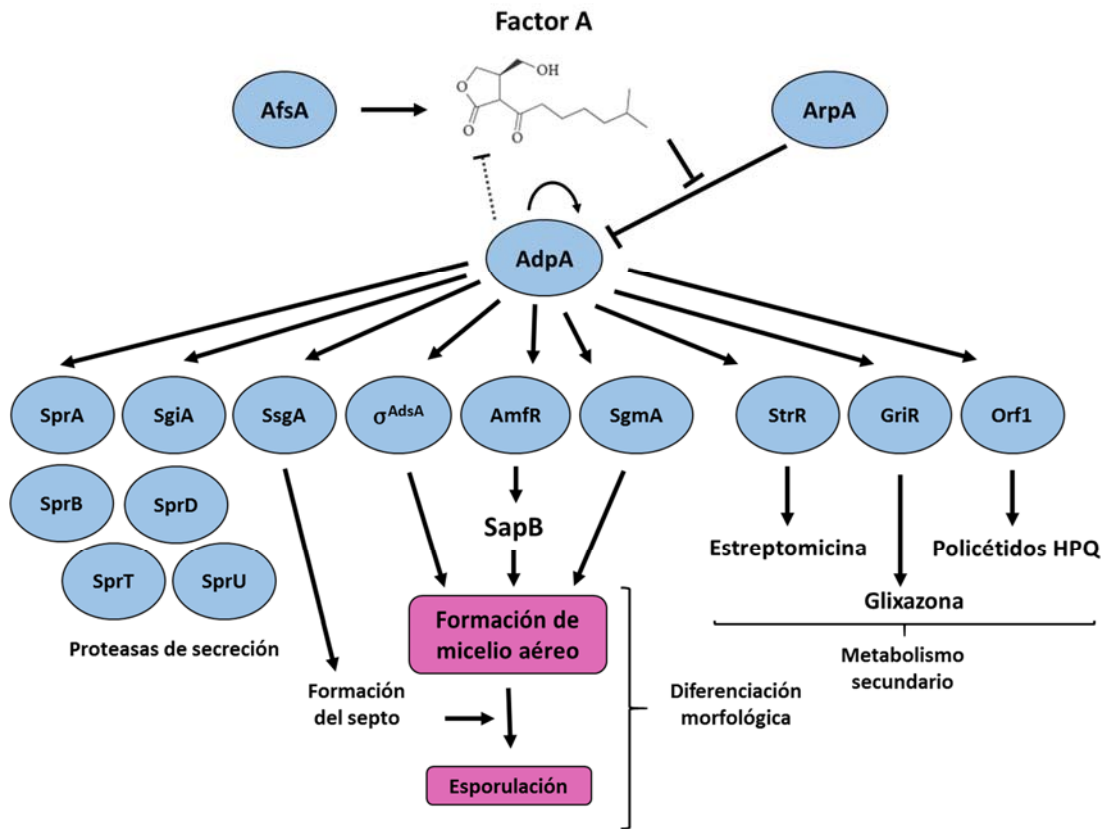


Figura 1.6. Papel de AdpA en la diferenciación morfológica y el metabolismo secundario en *S. griseus*. Las líneas de extremos apuntados indican activación y las romas, represión. Las líneas continuas representan interacción directa y las discontinuas un efecto indirecto. (Modificado de Ohnishi y Horinouchi, 2005).

Otra ruta reguladora de desarrollo y diferenciación morfológica, la ruta *sky*, opera una vez que las hifas aéreas empiezan a crecer en el aire. Esta ruta controla la expresión de los genes de chaplinas y rodlinas, que codifican proteínas que se ensamblan disponiéndose en capas de barras proporcionando una superficie hidrofóbica a la hifa aérea y a las esporas (Claessen y col., 2006). Además, se han descrito en *S. coelicolor* un gran número de genes que codifican factores sigma de la ARN polimerasa que permiten la respuesta celular a situaciones de estrés a lo largo de los diferentes estados de desarrollo y crecimiento; entre estos factores, mediante el estudio de mutantes de *S. coelicolor* se ha descrito que la actividad de σ^B , σ^L , σ^N , σ^M , σ^F , σ^K y σ^G afecta a su desarrollo (Chater, 2011).

1.1.3.3. Organización genómica

1.1.3.3.1. Cromosoma

El cromosoma de las especies del género *Streptomyces* presenta una estructura lineal. A principios de los años noventa, se describió el primer cromosoma lineal dentro del grupo en *Streptomyces lividans* 66 empleando la técnica de electroforesis en campo pulsante. Posteriormente, se analizó el cromosoma de otras seis especies de *Streptomyces*, entre ellas *S. coelicolor* A3(2), observándose la misma disposición lineal (Lin y col., 1993), lo que sugiere que la linealidad del cromosoma es una característica común en todas las especies del género (Lin y col., 1993; Kirby, 2011).

El tamaño del cromosoma oscila entre las 6,2 y 11,9 Mb, correspondientes a *Streptomyces cattleya* (Barbe y col., 2011) y *Streptomyces bingchenggensis* (Wang y col., 2010), respectivamente, siendo este último de los más grandes dentro del reino *Bacteria*. En relación a la composición nucleotídica del genoma de *Streptomyces*, se observa un alto contenido en G+C que oscila entre el 66 % y el 78 % (Kämpfer, 2012c), porcentajes muy cercanos al límite superior encontrado en la naturaleza. Esta abundancia de G+C determina el uso preferente de codones con guanina (G) o citosina (C) en la tercera posición, lo que convierte en raros a los codones TTA, CTA (ambos para leucina) y TTT (fenilalanina) (Wright y Bibb, 1992), que están ausentes en los genes relacionados con el crecimiento vegetativo y presentes en genes relacionados con la resistencia a antibióticos, la regulación y la diferenciación celular. En el inicio de la traducción el codón utilizado mayoritariamente es AUG (metionina) pero también se puede encontrar GUG (valina) y CUG (leucina) (Chater y col., 1982).

El genoma de *S. coelicolor* fue el primero en ser secuenciado, encontrándose por primera vez una bacteria con mayor número de genes (7825) que en organismos eucariotas sencillos, como *Saccharomyces cerevisiae* (Bentley y col., 2002). La secuenciación completa del genoma del *Streptomyces* modelo reveló la estructura del cromosoma de los miembros de este género. El cromosoma consta de una región central de 5 a 6 Mb y dos brazos terminales de aproximadamente 2 Mb (Bentley y col., 2002; Hopwood, 2006). Esta estructura se confirmó con la secuenciación del genoma de *Streptomyces avermitilis*, *S. griseus*, *Streptomyces clavuligerus* y *Streptomyces tsukubaensis* (Ikeda y col., 2003; Ohnishi y col., 2008; Medema y col., 2010; Barreiro y col., 2012). En el núcleo central se localizan los genes esenciales implicados en: 1) división celular, replicación del ADN, transcripción y traducción y 2) metabolismo primario. En

los brazos, sin embargo, se disponen genes no esenciales en condiciones de laboratorio, relacionados con el metabolismo secundario, enzimas hidrolíticas, así como otros operones conservados para respuestas adaptativas y genes característicos de cada especie (Bentley y col., 2002; Hopwood, 2006). En las proximidades de estos brazos aparecen numerosas repeticiones directas, inserciones y elementos transponibles, elementos estructurales considerados posibles causantes de la elevada inestabilidad que caracteriza a los cromosomas de algunas especies del género (Huang y col., 1998; Volff y Altenbuchner, 2000). Entre la región central y los brazos hay dos regiones distintas, una a la izquierda y otra a la derecha de la región central. La primera presenta un mayor grado de conservación en *Streptomyces* comparado con la región derecha y esta conservación de la sintenia está presente también en muchos *Actinomycetales*. Sin embargo, la región derecha está bastante bien conservada en *Streptomyces*, pero no en otros *Actinomycetales* (Kirby, 2011).

La replicación del cromosoma comienza en una región central *oriC* y se extiende bidireccionalmente hacia los telómeros (Zakrzewska-Czerwińska y Schrempf, 1992; Musialowski y col., 1994; Chang y Cohen, 1994), al final de los cuales se encuentran unas regiones repetidas invertidas (TIR, del inglés *terminal inverted repeat*) con tamaños desde las 24 hasta las 550 Kb, según la especie (Volff y Altenbuchner, 1998). En estas regiones TIR se encuentran unidas covalentemente las proteínas Tap (del inglés, *telomere-associated protein*) (Bao y Cohen, 2003) interaccionando con los extremos 3' protuberantes de los telómeros del intermediario de replicación. Esta interacción, que se produce a través de unas secuencias palindrómicas de 200-300 pb que forman estructuras secundarias, permite reclutar las proteínas Tpg (proteína terminal protectora del telómero). Estas proteínas (Tpg) protegen el extremo 5' de la acción de las exonucleasas y se encargan de cebar a la ADN polimerasa permitiendo la síntesis de los últimos fragmentos de Okazaki para completar la replicación de la hebra retardada (Chen, 1996; Huang y col., 1998; Bao y Cohen, 2001; Yang y col., 2015).

El cromosoma circular de los patógenos *Mycobacterium tuberculosis* (Cole y col., 1998) y *Corynebacterium diphtheriae* (Cerdeño-Tárraga y col., 2003) mantienen una sintenia con el núcleo central de *S. coelicolor* y otros *Streptomyces* (Bentley y col., 2002), lo que sugiere que este género ha evolucionado a partir de un ancestro común a otros actinomicetos. Este ancestro poseería un cromosoma circular de aproximadamente 4 Mb, que pudo linealizarse por recombinación homóloga con un plásmido lineal (Volff y Altenbuchner, 2000), adquiriendo los brazos laterales a través de una transferencia horizontal de nuevos grupos de genes, lo cual

también se explica por la abundancia de transposones en los extremos del cromosoma. Además, varias evidencias indirectas refuerzan el modelo de linealización cromosómica en *Streptomyces*: los análisis filogenéticos; la habilidad críptica de los cromosomas para replicarse y segregarse como moléculas circulares; la presencia de topoisomerasa IV, implicada en la resolución de moléculas circulares; la presencia en las zonas teloméricas de alta densidad de elementos transponibles y secuencias con genes funcionales en plásmidos; y la distribución asimétrica de genes esenciales y secuencias transferidas lateralmente en el cromosoma de *S. coelicolor* (Chen y col., 2002).

Los cromosomas de *Streptomyces* ocasionalmente sufren pérdidas espontáneas de sus extremos, tras lo cual son capaces de unirse y formar cromosoma circulares que se replican como los del resto de las bacterias. La transmisión horizontal de ADN en los extremos del cromosoma junto con la integración de plásmidos lineales pudo provocar la expansión del cromosoma de *Streptomyces* durante la evolución reciente (Chen y col., 2002).

1.1.3.3.2. Elementos genéticos extracromosomales

En las especies del género *Streptomyces* son muy frecuentes los elementos extracromosomales, siendo los plásmidos los más usuales. Se trata de plásmidos con un contenido en G+C similar al del cromosoma, y un tamaño entre 10 kb y 1,8 Mb (Kieser y col., 2000; Medema y col., 2010). Pueden ser lineales o circulares, de alto o bajo número de copia, o incluso integrativos. Tanto los plásmidos lineales como los circulares son generalmente conjugativos, pero raramente poseen genes que confieran resistencia a compuestos tóxicos o cualquier otra ventaja selectiva (Hopwood y Kieser, 1993). Sin embargo, algunos de ellos contienen agrupaciones de genes para la biosíntesis de metabolitos secundarios, como SCP1 (Kirby y Hopwood., 1977) o pSCL4 (Medema y col., 2010).

Los plásmidos lineales, como el plásmido SCP1 de *S. coelicolor* (Kirby y Hopwood, 1977), pSLA2-L de *Streptomyces rochei* (Mochizuki y col., 2003; Arakawa, 2014) y el pSCL4 de *S. clavuligerus* (Medema y col., 2010), entre otros (Kinashi, 2011), acomodan, principalmente, genes del metabolismo secundario o genes no esenciales para el crecimiento. Disponen de autonomía replicativa con su *oriC* reconocido por la propia maquinaria de replicación plasmídica y, en la mayoría de los casos, presentan también maquinaria que les proporciona autonomía para la conjugación intra o interespecífica (Kieser y col., 2000).

La estructura de los plásmidos lineales es muy similar a la descrita en el cromosoma lineal. Su replicación es independiente a la del cromosoma pero se asemeja a la de este elemento genómico. Comienza en su propio *oriC* hacia los extremos del plásmido donde se localizan una secuencias repetidas invertidas a las que se unen unas proteínas terminales similares a las Tpg cromosómicas (Tsai y col., 2011). Aunque se pensaba que en estos plásmidos el origen de replicación era único, estudios recientes han revelado la existencia de tres orígenes distintos en el plásmido lineal SCP1 de *S. coelicolor*, donde se ha descrito que las proteínas de un extremo interaccionan con las del otro formando una estructura circular superenrollada, fenómeno que se produce también en el cromosoma (Peng y col., 2013).

La dinámica transferencia de información genética que existe entre el cromosoma de *Streptomyces* y los plásmidos lineales puede haber favorecido la diversidad e inestabilidad observada en los extremos del cromosoma, facilitando la rápida evolución de su metabolismo secundario (Medema y col., 2010; Kinashi, 2011). Además, los plásmidos lineales pueden actuar como vectores mediando la transferencia horizontal de genes entre diferentes especies de *Streptomyces* (Ravel y col., 2000). En *S. clavuligerus*, el pequeño tamaño de su cromosoma (6,7 kb), menor que el descrito para otras especies de *Streptomyces*, y la similitud funcional entre los brazos del megaplásmido pSCL4 y el cromosoma, sugieren que dicho megaplásmido se originó por doble recombinación entre el cromosoma y un plásmido pequeño (Medema y col., 2010).

Algunos plásmidos circulares, como SLP1 de *S. lividans*, pueden integrarse en sitios específicos del cromosoma del hospedador (*attB*) por recombinación con el sitio de integración del plásmido (*attP*). En este caso, el plásmido se replica junto con el cromosoma aunque sin perder la capacidad de transferirse independientemente mediante conjugación a otras especies donde se circulariza y permanece replicándose autónomamente (Bibb y col., 1981). En plásmidos circulares no integrativos la replicación tiene lugar mediante el mecanismo del círculo rodante, lo que les permite estar presentes en un alto número de copias.

Los miembros de este género pueden ser hospedadores de fagos de doble cadena de ADN, los cuales pueden integrarse en el genoma o mantenerse libres. Dos de los actinofagos más conocidos son los fagos temperados Φ C31 y Φ BT1 (Gregory y Smith, 2003). Se trata de fagos de amplio rango de huéspedes, a partir de los cuales se han construido numerosos plásmidos integrativos con sistemas de recombinación fágicos para *Streptomyces*.

Un elementos con características intermedias entre plásmido y bacteriófago, es el AICE (del inglés, *Actinomycete integrative and conjugative element*). Estos elementos se integran en

genes que codifican un ARNt (Mazodier y col., 1990) y suelen persistir a lo largo de las generaciones en el cromosoma del hospedador hasta que se transfieren mediante conjugación a otro hospedador diferente, pudiéndose comportar en él como plásmidos replicativos. Actúan como moduladores de la diversidad del genoma del hospedador y están implicados en la adquisición de agrupaciones de metabolitos secundarios u otro ADN vía transferencia horizontal (te Poele y col., 2008).

Numerosos transposones han sido descubiertos en *Streptomyces*, existiendo ejemplos de elementos integrativos específicos de sitio como el transposón IS117 de *S. coelicolor* (Henderson y col., 1990) y de elementos capaces de integrarse al azar en el genoma como los transposones IS493 de *S. lividans* 66 (Solenberg y Burgett, 1989) y Tn4556 de *Streptomyces fradiae* (Chung, 1987). Al igual que los actinofagos, estos elementos transponibles se utilizan en estudios de biología molecular como vectores integrativos o para mutagénesis aleatoria (Kieser y col., 2000) permitiendo la manipulación genética de los *Streptomyces*.

1.1.3.4. Inestabilidad genética

El cromosoma de *Streptomyces* es uno de los que presentan mayor inestabilidad genética entre los procariontes (Volf y Altenbuchner, 1998). Los procesos de recombinación en las regiones terminales poco conservadas dan lugar a amplificaciones o deleciones espontáneas en los extremos con frecuencias de 0,1 a 1 %, pudiendo originarse la eliminación de uno o ambos telómeros y, por tanto, la circularización del cromosoma. Esta inestabilidad afecta a diferentes características fenotípicas, con frecuencia de manera pleiotrópica, como la diferenciación celular, la producción de metabolitos secundarios, la resistencia a antibióticos, la secreción de enzimas extracelulares y, algunas veces, al metabolismo primario cuando los genes están en el extremo del genoma, como sucede con *argG* de la biosíntesis de la arginina en *S. coelicolor* (Redenbach y col., 1996). Así, en la industria es frecuente observar variabilidad en la producción en distintos clones dentro de una misma cepa.

En un principio se pensó que la inestabilidad del cromosoma se debía a su condición de linealidad, pero se ha comprobado que mutantes con cromosoma circular son más inestables. La ausencia de genes esenciales en las regiones terminales permite a este género no comprometer su viabilidad, al menos en condiciones del laboratorio, tras experimentar grandes deleciones en estas zonas (Volf y Altenbuchner, 2000). Aunque muchas de las reorganizaciones que se producen en el genoma del género *Streptomyces* son neutras o desfavorables, la

inestabilidad genética junto a la interacción cromosoma-plásmidos lineales puede explicar 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, como parece ser el caso de *S. clavuligerus* (Medema y col., 2010). Al ser *Streptomyces* un género que principalmente se encuentra localizado en el suelo, la inestabilidad genética le confiere un enorme potencial en la adaptación a los numerosos y frecuentes cambios que se dan en la naturaleza (Volf y Altenbuchner, 1998).

El gran interés industrial por *Streptomyces*, junto al desarrollo de potentes herramientas para la secuenciación de genomas como la pirosecuenciación (Metzker, 2010; Buermans y den Dunnen, 2014), ha permitido la publicación del genoma completo de un gran número de especies del género, las cuales aparecen reflejadas y se van actualizando en la base de datos GOLD (*Genomes OnLine Database*) (Reddy y col., 2015). Según esta base de datos, en 2015 existen aproximadamente 197 especies del género *Streptomyces* secuenciadas o en proceso de secuenciación. *S. clavuligerus*, especie de estudio en la presente tesis doctoral y cuyo genoma ha sido secuenciado y publicado por tres grupos de investigación independientes (*Broad Institute*; Medema y col., 2010; Song y col., 2010), representa un claro ejemplo del interés de la secuenciación de los genomas de las especies con aplicación industrial.

1.1.4. Metabolismo secundario

A lo largo del ciclo biológico del género *Streptomyces* se pueden diferenciar dos tipos de metabolismo, el primario y el secundario. El metabolismo primario es un conjunto de reacciones catabólicas y anabólicas implicadas en el crecimiento, desarrollo y reproducción del microorganismo (Turner, 1973; Demain, 1981; Hodgson, 2000). El metabolismo secundario, que tiene lugar tras la fase más activa del crecimiento vegetativo (Demain y Fang, 2000), se ha descrito como el conjunto de reacciones bioquímicas que dan lugar a compuestos, que sin ser dispensables para la célula, le confieren ventajas ecológicas (Challis y Hopwood, 2003).

Los metabolitos secundarios son compuestos no esenciales para el crecimiento del microorganismo productor, al menos en condiciones de laboratorio, y característicos de un reducido grupo taxonómico. Comprenden una amplia variedad de estructuras químicas generalmente complejas y poco frecuentes, como por ejemplo péptidos no ribosomales, péptidos condensados, policétidos, polienos, pirroles, terpenoides, aminoglicósidos, quinonas,

entre otros. Presentan un amplio rango de actividades biológicas entre las que se encuentran las actividades antibióticas, antifúngicas, antivíricas, antitumorales, inmunomoduladoras, insecticidas, y utilidad como pigmentos, alcaloides, inhibidores enzimáticos y sideróforos (Davies, 2007; Yim y col., 2007; Demain, 2009; Martín y Liras, 2012). Algunos presentan un papel similar al de las hormonas en la diferenciación celular y otros participan en el transporte de metales (Challis y Hopwood, 2003) (tabla 1.1).

Metabolito	<i>Streptomyces</i> productor	Diana bioquímica	Aplicación
Actinomicina	<i>S. antibioticus</i>	Transcripción	Antitumoral
Anfotericina	<i>S. natalensis</i>	Esteroles de membrana	Antifúngico
Avermectina	<i>S. avermitilis</i>	Neurotransmisión invertebrados	Antiparasitario
Bialafos	<i>S. hygrosopicus</i>	Metabolismo del nitrógeno	Herbicida
Bleomicina	<i>S. verticillus</i>	Replicación del ADN	Antitumoral
Candidina	<i>S. griseus</i>	Esteroles de membrana	Antifúngico
Cloranfenicol	<i>S. venezuelae</i>	Ribosomas bacterianos	Antibacteriano
Clorotetraciclina	<i>S. aureofaciens</i>	Ribosomas bacterianos	Antibacteriano
Ácido clavulánico	<i>S. clavuligerus</i>	Inhibidor de betalactamasas	Antibacteriano
Fosfomicina	<i>S. wedmorensis</i>	Pared celular bacteriana	Antibacteriano
Kanamicina	<i>S. kanamyceticus</i>	Ribosomas bacterianos	Antibacteriano
Kasugamicina	<i>S. kasugaensis</i>	Síntesis de proteína	Antifúngico
Monensina	<i>S. cinnamonensis</i>	Membrana celular	Crecimiento de animales
Neomicina	<i>S. fradiae</i>	Ribosomas bacterianos	Antibacteriano
Novobiocina	<i>S. niveus</i>	Replicación ADN bacteriano	Antibacteriano
Nistatina	<i>S. noursei</i>	Esteroles de membrana	Antifúngico
Oxitetraciclina	<i>S. rimosus</i>	Ribosomas bacterianos	Antibacteriano
Estreptomycin	<i>S. griseus</i>	Ribosomas bacterianos	Antibacteriano
Tacrolimus	<i>S. hygrosopicus</i>	Linfocitos	Inmunosupresor
Tienamicina	<i>S. cattleya</i>	Pared celular bacteriana	Antibacteriano

Tabla 1.1. Compuestos bioactivos producidos por especies del género *Streptomyces* y sus aplicaciones. (Modificado de Hopwood, 2007).

Los metabolitos secundarios presentan un amplio rango de actividades biológicas que han sido aplicadas en la industria farmacéutica, agrícola y alimentaria, entre otras. Sin embargo, la mayoría de los compuestos orgánicos de bajo peso molecular producidos y secretados por los microorganismos desempeñan un papel de señalización celular en el ambiente. La mayoría de los metabolitos microbianos modulan la transcripción génica a bajas concentraciones y el mantenimiento de las comunidades microbianas en el medio ambiente parece ser su función primaria. Por esto, los metabolitos microbianos constituyen una gran grupo de moléculas de señalización celular que regulan la expresión génica en las poblaciones microbianas y posiblemente las interacciones de estas poblaciones con los organismos que les rodean (Yim y col., 2007). Sin embargo, existen compuestos cuya actividad biológica no ha sido aún

demostrada o no se ha relacionado con ninguna ventaja competitiva para el microorganismo productor (Challis y Hopwood, 2003).

Los precursores del metabolismo secundario son metabolitos primarios, existiendo una regulación coordinada de ambos tipos de metabolismo. De este modo, en *S. clavuligerus*, la producción de ácido clavulánico aumenta mediante la delección del gen *gap1*. La gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa codificada por este gen, cataliza la transformación del gliceraldehído-3-fosfato (GAP) en 1,3 bisfosfoglicerato. Dicha delección incrementa el suministro de GAP, uno de los precursores requeridos en la producción de ácido clavulánico (Li y Townsend, 2006). En *S. coelicolor*, el malonil-CoA es usado como precursor de la biosíntesis de actinorrodina. La sobreexpresión del gen *acc*, que codifica la acetil-CoA carboxilasa, mejora el rendimiento en la producción de actinorrodina (Ryu y col., 2006).

Los genes biosintéticos de los metabolitos secundarios se disponen en el cromosoma o en plásmidos constituyendo agrupaciones, desde aproximadamente 15 kb hasta más de 100 kb, junto con genes implicados en transporte, resistencia y reguladores relacionados con estos compuestos (Bibb y Hesketh, 2009). La expresión de estos genes está regulada por complejos mecanismos reguladores específicos y globales que conectan el metabolismo primario con el secundario.

Los estudios genómicos han revelado al menos 29 agrupaciones de posibles genes biosintéticos para metabolitos secundarios en el organismo modelo *S. coelicolor* A3(2), 37 en el organismo industrial *S. avermitilis* o 49 (24 cromosomales y 25 en el megaplásmido pSCL4) en *S. clavuligerus* (Bentley y col., 2002; Ikeda y col., 2003; Medema y col., 2010; Chen y col., 2010). Asimismo, la secuenciación de otros genomas de *Streptomyces* reveló la misma tendencia mostrando que la mayoría de las agrupaciones son específicas de especie. Algunas de las agrupaciones conservadas determinan la producción de metabolitos con papeles en la fisiología y desarrollo del huésped, incluyendo sideróforos, pigmentos de esporas y compuestos volátiles como la geosmina.

El estudio de la regulación de la biosíntesis de metabolitos secundarios a nivel molecular permite esclarecer la compleja interacción desarrollada entre esta producción y la diferenciación morfológica en esta bacteria formadora de micelio y capacidad para esporular. Estos estudios permiten proponer formas de aumentar los niveles de producción y la caracterización de nuevos productos, proporcionando rutas de activación de grupos de genes silenciados que han sido revelados tras la secuenciación del genoma.

1.1.5. Regulación del metabolismo secundario

El género *Streptomyces* presenta una fase de crecimiento rápido exponencial en la que se da el metabolismo primario, seguida de una fase estacionaria en la que se produce el metabolismo secundario. En la transición entre ambas fases, debido a la escasez de nutrientes y a señales de estrés ambiental, se inicia el metabolismo secundario coincidiendo con la diferenciación morfológica. Por ello, la regulación del metabolismo secundario y la diferenciación bioquímica y morfológica están estrechamente relacionadas (Martín y Liras, 2012).

La regulación se da principalmente a nivel transcriptómico, sin embargo, también se han descrito mecanismos de regulación a nivel traduccional y postraduccional. Los genes de una misma agrupación presentan una regulación por reguladores específicos que se encuentran en la propia agrupación (CSR, del inglés *cluster-specific regulator*). Los reguladores pleiotrópicos regulan varios reguladores o agrupaciones. Estos últimos están implicados en el metabolismo secundario y la diferenciación morfológica, y algunos de ellos conectan metabolismo secundario y metabolismo primario (Martín y Liras, 2012). El sistema de autorreguladores, como las γ -butirolactonas, está implicados en el metabolismo secundario y diferenciación morfológica. Estas señales químicas u hormonas bacterianas actúan como señales intercelulares, llevando a cabo su función fisiológica a muy baja concentración, del orden nanomolar, a través de la unión a receptores citoplasmáticos que actúan como reguladores transcripcionales y, por tanto, inhibiendo la unión del mismo a su diana en el cromosoma (Takano, 2006). La expresión de los genes reguladores específicos y globales depende de una gran diversidad de factores fisiológicos y medioambientales entre los que destacan: la tasa de crecimiento del microorganismo, moléculas de señalización, desequilibrio del metabolismo y varios tipos de estrés fisiológico (Bibb, 1996).

En el sistema de regulación se ha considerado un modelo piramidal en el que los reguladores específicos se encuentran controlados por reguladores globales de jerarquía superior. Sin embargo, a medida que avanza la caracterización de los sistemas de regulación, y se demuestra la regulación cruzada entre reguladores de diferentes niveles, cobra peso el modelo de regulación cruzada frente al modelo de regulación jerárquica (Huang y col., 2005) como se describe en el capítulo 4.2 y 4.4 de la presente tesis doctoral.

1.1.5.1. Reguladores específicos de ruta

La secuenciación del genoma de *S. coelicolor* permitió un primer análisis molecular de agrupaciones génicas biosintéticas mostrando que estas contenían genes reguladores, cuyo principal efecto se daba a nivel de producción del antibiótico en cuestión. A estos reguladores se les denominó reguladores específicos de ruta, en contraste a los reguladores globales o pleiotrópicos. El análisis de micromatrices de *S. coelicolor* reveló que algunos de estos reguladores específicos de ruta también tenían efectos de rango más amplio en los patrones de transcripción global, sugiriendo que el término *Cluster-Situated Regulator* (CSR) sería más adecuado y daría una descripción más objetiva (Huang y col., 2005). El valor de este término ha sido reforzado por resultados recientes que muestran que algunos CSRs controlan directamente la expresión de genes de otras agrupaciones. En las agrupaciones de genes de metabolitos secundarios se encuentran uno o varios reguladores específicos de la agrupación. Generalmente son proteínas de bajo peso molecular que regulan a nivel transcripcional activando la expresión de los genes de la agrupación en la que se encuentran (Martín y Liras, 2012).

Muchos de los reguladores específicos de ruta pertenecen a la familia SARP (del inglés, *Streptomyces antibiotic regulatory protein*). Estos se caracterizan por un dominio hélice-giro-hélice (HTH, del inglés *helix-turn-helix*) de unión al ADN en el extremo N-terminal (Wietzorrek y Bibb, 1997) y, contiguo, un dominio de activación transcripcional bacteriano BTAD (del inglés, *bacterial transcriptional activation domain*) (Bibb, 2005; Martín y Liras, 2012). En *S. coelicolor* destacan los reguladores ActII-ORF4, CdaR y RedD que controlan la producción de actinorrodina, el antibiótico dependiente de calcio (CDA, del inglés *calcium dependent antibiotic*) y la undecilprodigiosina, respectivamente. En *S. griseus*, StrR modula la producción de la estreptomicina. En *S. clavuligerus*, CcaR regula tanto la producción de ácido clavulánico como la de cefamicina C (Pérez-Llarena y col., 1997a; Martín y Liras, 2012).

La eliminación de los reguladores SARP resulta en la disminución o pérdida de la producción del metabolito, la cual queda restaurada por la complementación. Estudios transcriptómicos y EMSA (del inglés, *electrophoretic mobility shift assay*) demuestran que los activadores SARP regulan la expresión de los genes claves de la ruta biosintética de un antibiótico uniéndose específicamente a sus regiones promotoras (Martín y Liras, 2012). Aunque los reguladores de tipo SARP suelen actuar como reguladores específicos de ruta, reguladores globales como el activador transcripcional AfsR también presentan dominios característicos de SARP (Tanaka y col., 2007).

La expresión de los reguladores SARP está frecuentemente regulada por proteínas receptoras de butirolactonas (BRP, del inglés *butyrolactone receptor protein*) que actúan en respuesta a su correspondiente molécula γ -butirolactona (Takano, 2006). Estas BRPs reconocen secuencias específicas de 22 pb (denominadas ARE) localizadas próximas o anteriores al promotor del gen que codifica el SARP (Stratigopoulos y col., 2002; Santamarta y col., 2005). La unión de BRPs a los promotores de SARPs no ha sido totalmente esclarecida. La complejidad de las cascadas de proteínas reguladoras varía dependiendo de la especie de *Streptomyces* (Martín y Liras, 2012).

1.1.5.1.1. Otros tipos de reguladores específicos de ruta: LAL y reguladores de tipo LysR

Los reguladores de tipo LAL (del inglés, *large ATP-binding regulators of the LuxR class*) son de mayor tamaño que los SARP (Martín y Liras, 2012). Presentan un motivo de unión a ATP/GTP en su extremo amino (Walker y col., 1982) y un motivo HTH característico de las proteínas de unión a ADN de la familia LuxR en su extremo carboxilo (Bibb, 2005; Liu y col., 2013). Las familias de reguladores SARP y LAL parecen ser exclusivas de actinomicetos (Bibb, 2005). Algunos reguladores de la familia LAL identificados en agrupaciones de metabolitos secundarios son: RapH de la agrupación de rapamicina de *Streptomyces hygroscopicus* (Aparicio y col., 1996; Molnár y col., 1996; Kuščer y col., 2007), FkbN de *S. tsukubaensis* (Goranovič y col., 2010; Mo y col., 2012), AmphIV y PteF que regulan la anfotericina y la filipina en *Streptomyces nodosus* y *Streptomyces avermitilis* (Ikeda y col., 2003; Carmody y col., 2004), respectivamente, y Cvm7P que controla la formación de clavamas 5S en *S. clavuligerus* (Tahlan y col., 2007). En *S. coelicolor*, ninguno de los reguladores específicos de agrupación es un regulador de tipo LAL, sin embargo, se han descrito 14 genes que codifican reguladores LAL fuera de agrupaciones. Dos de estos reguladores, los codificados por los genes SCO0877 y SCO7173, han sido relacionados con la biosíntesis de actinorrodina a través de la disminución de la expresión de *actII-ORF4* y descritos como moduladores pleiotrópicos de varios procesos celulares, entre ellos la respuesta a escasez de fosfato (Guerra y col., 2012).

Uno de los ejemplos mejor caracterizados de una cascada controlada por un regulador de tipo LAL es la desencadenada por PimR al activar la expresión de *pimM* en *Streptomyces natalensis* (Martín y Liras, 2012). Tanto *pimR* como *pimM* se encuentran en la agrupación génica de pimaricina y codifican activadores transcripcionales (Antón y col., 2004; 2007). Ambos genes reguladores se requieren para la producción de pimaricina. PimR es un regulador de tipo SARP-LAL, que combina un dominio de tipo SARP en su extremo N-terminal con un extremo C-terminal homólogo a las guanilato ciclasas y reguladores LAL (Santos-Aberturas y col., 2012).

PimM presenta también una estructura muy particular, ya que combina un dominio sensor de tipo PAS (cuyo nombre proviene de las iniciales de tres proteínas eucarióticas que los portan: Per, de *Drosophila*, el traslocador nuclear ARNT y Sim, también de *Drosophila*) en su extremo N-terminal con un dominio de tipo HTH LuxR de unión al ADN en su extremo C-terminal (Antón y col., 2007). Los dominios PAS pueden actuar como sensores de luz, potencial redox, oxígeno, niveles energéticos o pequeños ligandos (Taylor y Zhulin, 1999). PimM interacciona cubriendo la caja hexamérica de la región -35 del promotor de cada gen regulado, lo que sugiere que la activación de la transcripción es consecuencia de la interacción de PimM con la ARN polimerasa. El sitio de unión de PimM está constituido por una diada simétrica de 14 nucleótidos que se ajusta a la secuencia consenso TVGGGAWWTCCCBA (donde V se corresponde con una A, C o G; W es A o T; y B es C, G o T) (Santos-Aberturas y col., 2011b). A diferencia de la mayoría de las proteínas bacterianas que contienen dominios PAS, PimM no forma parte de un sistema de dos componentes.

Los reguladores transcripcionales miembros de la familia LysR tienen un tamaño menor en longitud proteica respecto a los LAL (Martín y Liras, 2012). Presentan un dominio C-terminal de unión al coinductor y un motivo N-terminal HTH de unión a ADN (Maddocks y Oyston, 2008). Estas proteínas regulan genes implicados en virulencia, metabolismo, motilidad y percepción del cuórum (Maddocks y Oyston, 2008). El dominio de unión a ADN de los reguladores LysR está también implicado en el reconocimiento del coinductor y/o en la respuesta (Henikoff y col., 1988; Schell, 1993). Algunos de los reguladores LysR conocidos presentes en agrupaciones génicas de antibióticos incluyen a FkbR1 de *Streptomyces hygroscopicus* var. *asco myceticus* (Wu y col., 2000) y su ortólogo FkbR de tacrolimus en *S. tsukubaensis* (Mo y col., 2012), SAV_4790 en *S. avermitilis* (Omura y col., 2001), y ClaR, localizado en la agrupación génica del ácido clavulánico de *S. clavuligerus* (Pérez-Redondo y col., 1998).

1.1.5.2. Reguladores globales o pleiotrópicos

Los reguladores globales o pleiotrópicos son aquellos encargados de integrar la información aportada por las señales ambientales junto con parámetros celulares, como la situación nutricional o energética, y parámetros poblacionales, como la densidad celular, para desencadenar la respuesta adecuada. Se localizan fuera de las agrupaciones biosintéticas y ejercen su función sobre los reguladores específicos y no sobre los genes concretos de la agrupación biosintética. Participan en la regulación del metabolismo secundario pero también

los hay implicados tanto en el metabolismo secundario como en la diferenciación morfológica (*adpA*, *bld*) y/o en el metabolismo primario (*areB* o *ndgR*, *dasR*, *dmdR1*) (Martín y Liras, 2012).

1.1.5.2.1. Sistemas de dos componentes

Los sistemas de dos componentes (TCS, del inglés *two component system*) son la principal vía de transducción de señales, tanto ambientales como fisiológicas, en bacterias (Rodríguez y col., 2013). Están constituidos por una histidina-quinasa de unión a membrana (HK, del inglés *histidine kinase*) que recibe la señal ambiental o nutricional y fosforila al regulador de la respuesta (RR, del inglés *response regulator*). El RR experimenta un cambio conformacional y se une a una secuencia específica de ADN modulando la expresión génica (activación o represión) y, finalmente, la respuesta celular. El género *Streptomyces* presenta un mayor número de TCS respecto a otros géneros bacterianos, probablemente debido a los cambios ambientales a los que se enfrenta (Rodríguez y col., 2013).

PhoR-PhoP es el principal sistema de transmisión de señal para el control del fosfato en *Streptomyces* y es considerado modelo del control general del metabolismo primario. En condiciones limitantes de fosfato inorgánico este TCS activa rutas para la obtención de fosfato y controla la transición a la fase estacionaria y al metabolismo secundario (Martín, 2004). Está constituido por una quinasa sensora, PhoR, que se fosforila ante la escasez de fosfato, y un regulador de la respuesta, PhoP, que al ser fosforilado por PhoR, transduce la señal y se une a las secuencias específicas en los promotores denominadas cajas PHO (Sola-Landa y col., 2005). Los genes regulados, activados o reprimidos, por este sistema constituyen el regulón Pho (Santos-Beneit, 2015). La escasez de fosfato inorgánico activa la biosíntesis de metabolitos secundarios, que a su vez limita el crecimiento bacteriano como mecanismo en cascada (Santos-Beneit y col., 2008). En los genes biosintéticos de metabolitos secundario no hay cajas PHO por lo que la regulación es indirecta (Santos-Beneit y col., 2009).

El sistema de dos componentes AbsA1-AbsA2 es uno de los mejor conocidos en *S. coelicolor* y se encuentra, excepcionalmente, dentro de la agrupación génica del antibiótico dependiente de calcio (CDA). Mutantes en *absA1* y/o *absA2* presentan una producción de actinorrodina y undecilprodigiosina adelantada y superior respecto a la cepa silvestre (Brian y col., 1996). A través de la técnica ChIP-on-chip (del inglés, *chromatin immunoprecipitation on chip*) que combina la inmunoprecipitación de la cromatina con la tecnología de las micromatrices y EMSA

se ha observado la unión de AbsA2 fosforilado a los promotores de los genes *actII-ORF4*, *cdaR* y *redZ*, regulando así su transcripción (McKenzie y Nodwell, 2007).

El sistema CutR-CutS, en el que CutS es la histidina quinasa y CutR el regulador de la respuesta, fue el primer sistema de dos componentes descrito en *Streptomyces* (Tseng y Chen, 1991). *S. lividans* 66, una especie filogenéticamente próxima a *S. coelicolor* A3(2), posee la agrupación completa de la actinorrodina y la undecilprodigiosina en su genoma, pero generalmente la producción de estos dos metabolitos es nula o baja a lo largo de su ciclo celular y solamente los produce en determinadas condiciones de cultivo (Kim y col., 2001). Los mutantes en *cutR* y *cutS* en *S. lividans* presentaron un aumento y aceleración de la producción de actinorrodina, que fue revertido por la introducción de *cutR* en un plásmido (Chang y col., 1996). En su forma fosforilada, CutR reprime la biosíntesis de actinorrodina en *S. lividans*. El mismo fenómeno se produce en *S. coelicolor* A3(2) (Chang y col., 1996). Además, el operón *cutR-cutS* parece estar regulando el metabolismo del cobre en *Streptomyces* (Tseng y Chen, 1991).

Otros de los numerosos sistemas de dos componentes que han sido estudiados en el género *Streptomyces* son: AfsQ1/Q2, que relacionan la disponibilidad de nitrógeno y la producción de antibióticos (Shu y col., 2009; Martín y col., 2011); DraR/K, implicado en diferenciación morfológica (Yu y col., 2012); EcrA1/2 y EcrE1/2, que regulan la producción de undecilprodigiosina (Li y col., 2004); AbsA1/2 y RapA1/2 que controla la producción de más de un antibiótico (Brian y col., 1996; Lu y col., 2007); AbrA1/2 y AbrC1/2/3, que coordinan la fase de crecimiento y la producción de antibióticos (Yepes y col., 2011); y SCO5784/5785, que controla el inicio de esporulación y producción de antibióticos (Rozas y col., 2012).

1.1.5.2.2. Sistemas de serina-treonina quinasas

La transducción de señales en bacterias también se realiza a través de sistemas típicos de organismos eucariotas como las serina-treonina quinasas. El ejemplo mejor caracterizado es AfsK, una serina-treonina quinasa que participa en la regulación del metabolismo secundario y en la regulación de la polaridad celular, el crecimiento apical y la selección de los puntos de ramificación en *Streptomyces* (Hempel y col., 2012). Tras detectar la señal, AfsK se autofosforila y, seguidamente, fosforila a AfsR, un regulador de la respuesta con un dominio SARP en el extremo N-terminal, que activa la expresión de *afsS*. AfsS interacciona con PhoP implicado en el metabolismo del fosfato, que a su vez interacciona con GntR implicado en el metabolismo del

nitrógeno. Sin embargo, AfsR no media en el efecto que AfsK tiene sobre la diferenciación morfológica (Hempel y col., 2012).

1.1.5.2.3. Otros reguladores pleiotrópicos

DasR regula la producción de metabolitos secundarios y la diferenciación morfológica a través de su interacción con la N-acetilglucosamina. Durante el crecimiento, la liberación de N-acetilglucosamina debido a la lisis celular hace que se active la producción de metabolitos secundarios o la diferenciación morfológica en función de la escasez nutricional y del estado morfológico (Rigali y col., 2006; 2008). La N-acetilglucosamina se une a DasR que se encuentra bloqueando la transcripción de diferentes reguladores específicos de ruta como *act-ORF4* y *redZ*, responsables de la producción de actinorrodina y undecilprodigiosina, de modo que la unión de N-acetilglucosamina hace que DasR libere estas secuencias de ADN y los genes se transcriban.

1.1.6. Agrupaciones biosintéticas silenciosas y/o crípticas de metabolitos secundarios

Como se ha comentado previamente, entre los años 40 y 60 del siglo XX se descubrió un gran número de antibióticos, la mayoría de ellos producidos por actinomicetos aislados de diferentes muestras de suelo (Hopwood, 2007). La identificación de nuevos compuestos bioactivos disminuyó notablemente entre los años 70 y 80. Sin embargo, el desarrollo de nuevas tecnologías tales como: 1) el ADN recombinante en los años 70, 2) la secuenciación y el análisis *in silico* de genomas completos en los años 90, 3) la biosíntesis combinatoria, basada en la combinación de las rutas metabólicas de diferentes microorganismos, aprovechando las características que interesan de cada uno de ellos (Sun y col., 2015), 4) la biocatálisis combinatoria, que emplea transformaciones enzimáticas, quimioenzimáticas y microbianas para generar librerías de nuevas estructuras a partir de una molécula dada (Rich y col., 2002; Zhou y col., 2008) y 5) la búsqueda *in situ* (Antoraz y col., 2015; Ling y col., 2015), han activado el descubrimiento de nuevos compuestos basados en los ya descritos o codificados por agrupaciones silenciadas, esto es, compuestos que el microorganismo es capaz de biosintetizar, pero cuya producción en condiciones de laboratorio no ha sido observada, y cuya estructura química en ocasiones no está dilucidada (agrupación críptica). La búsqueda de nuevas moléculas es esencial para la industria, especialmente en el campo de los antibióticos debido al rápido desarrollo de las resistencias (Hopwood, 2007).

La secuenciación de varios genomas de *Streptomyces* y su análisis *in silico* han revelado un gran número de agrupaciones génicas para metabolitos secundarios previamente no descritas

y, por tanto, el gran potencial genético de *Streptomyces* para la producción de muchos más metabolitos de los reconocidos hasta el momento (Liu y col., 2013; Antoraz y col., 2015). En condiciones de laboratorio los genes de estas agrupaciones biosintéticas no se transcriben. Por ello, es necesario identificar las señales fisiológicas y los mecanismos reguladores que permitan activar las agrupaciones silenciadas. Algunos de los métodos empleados actualmente para esta activación se exponen a continuación.

1.1.6.1. Condiciones de fermentación

Tradicionalmente, la modificación de las condiciones de fermentación, tales como la composición del medio de cultivo, el pH, los niveles de oxígeno disuelto, la temperatura, el tiempo de cultivo, el escalado y la densidad celular, ha sido crucial para la mejora del rendimiento de la producción industrial (Martín, 1977a; Ruiz y col., 2010; Olmos y col., 2013). De este modo, se pretende conseguir un balance entre, por una parte, la disponibilidad de nutrientes para el crecimiento y como precursores para los antibióticos, y por otra, el efecto represivo de algunas de las más eficientes fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato. Numerosos metales tales como zinc, hierro y manganeso son esenciales para el crecimiento bacteriano y algunos de ellos pueden incluso afectar a la biosíntesis de antibióticos. De este modo, se ha descrito que la adición de la tierra rara escandio al medio de fermentación estimula notablemente la producción de actinorrodina en *S. coelicolor*, de actinomicina en *S. antibioticus* y de estreptomycin en *S. griseus* (Kawai y col., 2007).

El estudio y adaptación de las condiciones del cultivo han permitido, no solamente el aumento de la producción de determinados compuestos, sino también la obtención e identificación de nuevos metabolitos. El análisis transcriptómico del cultivo de *Streptomyces flaveolus* en seis diferentes medios de cultivo permitió identificar varios compuestos nuevos (Qu y col., 2011). De este modo, la combinación de cambios en las condiciones de fermentación junto con las técnicas «-ómicas» puede permitir identificar modos alternativos de despertar agrupaciones génicas crípticas codificantes de nuevas moléculas (Liu y col., 2013).

1.1.6.2. Cocultivo con otros microorganismos

El cocultivo simula las complejas interacciones entre microorganismos que se dan en el suelo, donde están presentes señales ambientales específicas o componentes nutricionales que pueden activar la producción de metabolitos crípticos (Liu y col., 2013). Un claro ejemplo es la inducción de la expresión de agrupaciones génicas silenciadas en *Aspergillus nidulans* al

cultivarlo junto con *Streptomyces rapamycinicus* con el que comparte nicho ecológico (Schroeckh y col., 2009). El cocultivo de *S. clavuligerus* con *Staphylococcus aureus* MRSA tras varios pases, activó la producción de holomicina como respuesta de una adaptación evolutiva en condiciones de laboratorio (Charusanti y col., 2012).

El descubrimiento de nuevas moléculas bioactivas a través de la comprensión de la ecología molecular es un enfoque muy prometedor. Por ello, se han desarrollado métodos que permiten identificar y cuantificar en el tiempo y en el espacio pequeñas moléculas presentes tanto en el interior como en los alrededores de las colonias bacterianas, generando perfiles de estas respuestas moleculares en los límites adyacentes de los diferentes microorganismos (Watrous y col., 2012). Recientemente, el grupo de Ling y col., (2015) ha desarrollado nuevos métodos para aislar y crecer, mediante cultivo *in situ* o aplicando factores de crecimiento específicos, microorganismos no cultivables empleando un dispositivo multicanal, iChip (del inglés, *isolation chip*) (Nichols y col., 2010). El resultado ha sido el descubrimiento de la teixobactina, un nuevo antibiótico frente al que dos de los grandes patógenos actuales, *S. aureus* y *M. tuberculosis*, no han desarrollado resistencia.

1.1.6.3. Ingeniería ribosómica y otras estrategias relacionadas

La ingeniería ribosómica se basa en la activación de la transcripción a través de determinadas mutaciones en componentes ribosomales (Ochi, 2007). En base a esta técnica, se cultivaron cepas de *Streptomyces* a concentraciones subletales de antibióticos cuya diana es el ribosoma para seleccionar las cepas resistentes y analizar la producción de nuevos compuestos. De este modo, se activó la biosíntesis de actinorrodina en *S. lividans* en el que los genes *act* normalmente no se expresan. En la búsqueda de nuevos compuestos, Hosaka y col. (2009) activaron la producción de metabolitos no descritos con actividad frente a *S. aureus* en más de 400 cepas de actinomicetos utilizando gentamicina, rifampicina y estreptomycinina. Posteriores estudios de este mecanismo revelaron que determinadas mutaciones en *rpoB* aumentan la afinidad de la ARN polimerasa por los promotores de genes biosintéticos (Tanaka y col., 2013), y en *rpsL* estimulan la síntesis proteica (Tanaka y col., 2009). En este sentido, la utilidad de ambas mutaciones ha sido probada en cepas de *S. coelicolor* diseñadas para la expresión heteróloga de agrupaciones génicas de metabolitos secundarios (Gomez-Escribano y Bibb, 2011; 2012).

1.1.6.4. Uso de nuevas moléculas de señalización y compuestos remodelantes de antibióticos

La presencia de determinadas sustancias a bajas concentraciones estimula el metabolismo secundario y la morfogénesis en varios actinomicetos. De este modo, la goadsporina, un oligopéptido de 19 aminoácidos producido por *Streptomyces* sp. TP-A0584, promueve la formación de un pigmento rojo y la esporulación en *S. lividans* TK23 (Onaka y col., 2001), y la nocardamina o desferroxiamina E, un sideróforo producido por *S. griseus*, estimula la formación de metabolitos secundarios y la diferenciación morfológica en *Streptomyces tanashiensis*, entre otros actinomicetos (Yamanaka y col., 2005).

Por otro lado, los compuestos remodelantes de antibióticos (ARC, del inglés *antibiotic remodeling compound*) son pequeñas moléculas capaces de modular la producción de metabolitos secundarios actuando sobre la función de determinadas enzimas (Craney y col, 2012). Por ejemplo, ARC2 aumenta la producción de actinorrodina en *S. coelicolor* e induce la síntesis de dos compuestos desconocidos en *Streptomyces peuceticus*. Estructuralmente, ARC2 es similar al triclosán, un inhibidor de la síntesis de ácidos grasos. Dado que la síntesis de ácidos grasos y policétidos comparten precursores como el acetyl-CoA y el malonil-CoA, al estar inhibida la síntesis de ácidos grasos, aumenta la disponibilidad de precursores para la producción de antibióticos (Ochi y Okamoto, 2012).

1.1.6.5. Manipulación genética de reguladores

La sobreexpresión de activadores y eliminación de represores, tanto específicos de agrupación (CSR) como pleiotrópicos, puede activar la expresión de agrupaciones génicas crípticas (Hopwood y col., 1995; Aigle y Corre, 2012). La amplificación de *sanG* en *Streptomyces ansochromogenes* y la sobreexpresión de *polR* en *Streptomyces cacaoi* subsp. *asoensis* aumentaron la producción de nikomicina y polioxina, respectivamente (Li y col., 2009; He y col., 2010). La sobreexpresión de un gen regulador de la familia LAL, permitió el descubrimiento de la estambomicina en *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877 (Laureti y col., 2011). En *S. albus*, la sobreexpresión de *sshg_00078*, gen regulador presente en la agrupación biosintética de candidina, permitió activar la producción de este metabolito (Olano y col., 2014). De modo similar, en *S. coelicolor*, la delección de *scbR2*, un gen localizado en la agrupación génica *cpk*, permitió la activación de esta agrupación y la producción de un nuevo antibiótico, abCPK (del inglés, *antibiotic coelicolor polyketide*) (Gottelt y col, 2010), y la transcripción de los genes *cpk* fue notablemente aumentada por la delección del regulador pleiotrópico DasR (Rigali y col.,

2008). La delección del homólogo a *scbR2* en *S. venezuelae*, *jadR2*, activó la producción de jadomicina B en ausencia de los cambios de estrés requeridos para la producción (Xu y col., 2010). Por ello, la sobreexpresión de reguladores específicos de ruta positivos, el bloqueo de la expresión de reguladores específicos de ruta negativos, así como el empleo de promotores constitutivos en los propios genes de la agrupación biosintética, son unas estrategias probadamente eficaces para la expresión de agrupaciones génicas silenciadas de metabolitos secundarios (Rutledge y Challis, 2015).

1.1.6.6. Expresión heteróloga de agrupaciones biosintéticas

La expresión de una agrupación génica críptica o silenciada de un organismo en una especie diferente permite descubrir nuevos metabolitos secundarios, ya que muchos de estos genes no se transcriben en las condiciones de cultivo de las especies originales y su introducción en otras puede activar su expresión. Esta técnica ha sido también aplicada para confirmar la integridad de una agrupación biosintética para metabolitos secundarios (Malpartida y Hopwood, 1984), como en el caso de la tunicamicina (Chen y col., 2010); producir el metabolito a más altos niveles que el productor natural (Gomez-Escribano y Bibb, 2011); crear nuevos compuestos por biosíntesis combinatoria (Alt y col., 2011) o por mutasíntesis (Heide, 2009); así como para descubrir nuevos compuestos con actividad biológica expresando librerías genómicas de un consorcio de microorganismos, también denominadas librerías metagenómicas, en ocasiones difíciles de cultivar o manipular genéticamente (Banik y Brady, 2010).

Con este objetivo, se han diseñado cepas hospedadoras derivadas de *S. coelicolor* y *S. avermitilis*. En la primera, además de los plásmidos SCP1 y SCP2, se han eliminado los genes de las agrupaciones de actinorrodina, undecilprodigiosina, el antibiótico dependiente de calcio y el antibiótico CPK, como es el caso de *S. coelicolor* M1146, y se han introducido adicionalmente las mutaciones en los genes *rpoB* y *rpsL*, mencionadas anteriormente (apartado 1.1.6.3), que estimulan la producción de antibióticos, obteniendo la cepa *S. coelicolor* M1154 (Gomez-Escribano y Bibb, 2011; 2014). En la segunda, se ha eliminado una región de 1,4 Mb implicada en el metabolismo secundario endógeno y prescindible para el desarrollo del microorganismo en condiciones de laboratorio (Komatsu y col., 2010; 2013). Asimismo, la expresión heteróloga de genes reguladores ha permitido la activación de agrupaciones génicas en el hospedador que se encontraban silenciadas. De este modo, la expresión del gen regulador de la agrupación de la pimarcina de *S. natalensis*, *pimM*, en *S. albus*, permitió activar la producción de candicidina y antimicina (Olano y col., 2014).

Los actinomicetos filamentosos producen el 45 % de todos los metabolitos secundarios bioactivos conocidos, siendo el género *Streptomyces* el productor del 80 % de estos compuestos (Bérdy, 2005; Olano y col., 2009; Newman y Cragg, 2012). A pesar de esta asombrosa diversidad metabólica, se estima que solo han sido descubiertos el 10 % del total de productos naturales que pueden ser sintetizados por estos organismos (Watve y col., 2001). Además, el 99 % de todas las bacterias de ambientes externos no crecen en condiciones de laboratorio, y son prometedoras fuentes de nuevos antibióticos (Lewis, 2013; Ling y col., 2015). Este gran potencial, junto con el rápido desarrollo de las resistencias, pone de manifiesto la trascendencia del estudio de este género en la búsqueda de nuevos fármacos. Por ello, la combinación de las técnicas mencionadas en el presente apartado junto con las técnicas «-ómicas», tales como transcriptómica, proteómica, metabolómica, además de la genómica, suponen un gran avance cualitativo y cuantitativo en la identificación de nuevos compuestos bioactivos.

1.2. Características de la especie *Streptomyces clavuligerus*

S. clavuligerus fue aislado de una muestra de suelo de América del Sur. El nombre de la especie se debe a la forma de bastón de las ramificaciones cortas que dan lugar a las cadenas de esporas (del latín, *clavula*, 'pequeños' bastones, e *-igerus*, 'que lleva'). Taxonómicamente, la especie se clasifica dentro de la Serie Gris de la Categoría IV del género *Streptomyces*, en base al color verde grisáceo oscuro de las esporas maduras (Locci, 1989). La cepa tipo es la ATCC 27064 (también denominada NRRL 3585; Higgins y Kastner, 1971).

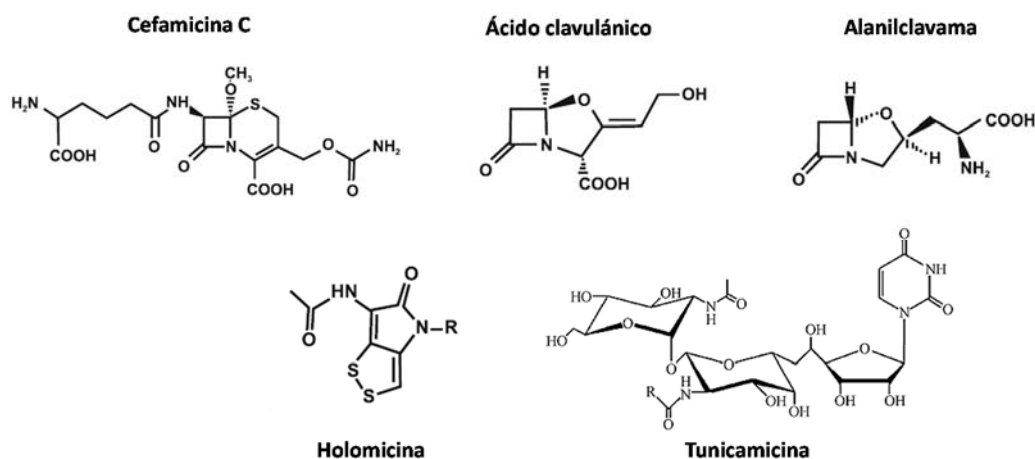


Figura 1.7. Estructura de los principales metabolitos producidos por *S. clavuligerus*.

S. clavuligerus se aisló como productor de cefamicina C, un antibiótico β -lactámico que inhibe la síntesis de peptidoglicano al interactuar con las transpeptidasas de la pared celular (Nagarajan y col., 1971). La cefamicina C es una molécula de tipo cefalosporina (figura 1.7), cuya biosíntesis comparte las etapas tempranas con la de penicilina, y las etapas intermedias con la de cefalosporina (Liras y Demain, 2009; apartado 1.2.2.1). En 1976, en un programa de búsqueda de nuevos inhibidores de β -lactamasas, se descubrió en esta cepa la producción de ácido clavulánico (Brown y col., 1976; Reading y Cole, 1977), un compuesto que se une a determinadas β -lactamasas a través de su anillo β -lactámico y las inactiva. Este compuesto combinado con antibióticos de tipo penicilina, como la amoxicilina, está ampliamente distribuido en el tratamiento de numerosas infecciones causadas por cepas resistentes productoras de β -lactamasas. Otros compuestos con actividad anti- β -lactamasas producidos por esta especie son las proteínas BLIP (Doran y col., 1990) y BLP (Pérez-Llarena, 1997). Además de la cefamicina C y el ácido clavulánico, *S. clavuligerus* produce una familia de compuestos con un núcleo clavam, como el ácido clavulánico, pero con diferente configuración estereoquímica (figura 1.7). Estas clavamas carecen de la capacidad para inhibir β -lactamasas, aunque algunas de ellas presentan actividad antifúngica o antibacteriana (Brown y col., 1976; 1979).

En 1979, Kenig y Reading descubrieron la producción de dos nuevos metabolitos en *S. clavuligerus* (figura 1.7). Por un lado, la molécula MM19290, un compuesto de tipo tunicamicina, inhibidor de la síntesis de peptidoglicano, y cuya agrupación en *S. clavuligerus* ha sido propuesta por Chen y col. (2010). La tunicamicina presenta actividad frente a virus animales y vegetales, levaduras y hongos, además de frente a bacterias Gram positivas (Takatsuki y col., 1971). Por otro lado, la holomicina, un compuesto del grupo de las pirrotinas que inhibe de la síntesis de ARN, descrito como antibiótico de amplio espectro y potente antitumoral (Oliva y col., 2001). Este metabolito es producido por algunos mutantes de genes biosintéticos implicados en la producción de ácido clavulánico y cefamicina C (de la Fuente y col., 2002), y su agrupación ha sido descrita y caracterizada por varios grupos de investigación, entre ellos nuestro laboratorio (Li y Walsh, 2010; Robles-Reglero y col., 2013).

1.2.1. Organización genómica

Como se ha comentado anteriormente, el gran interés industrial por *S. clavuligerus* ATCC 27064 ha conducido a tres diferentes grupos de investigación (*Broad Institute*; Medema y col., 2010; Song y col., 2010) a la secuenciación de su genoma. Su análisis ha revelado el gran

potencial genético que presenta esta especie para la producción de diferentes metabolitos secundarios, una valiosa información para el desarrollo del presente trabajo.

El genoma de *S. clavuligerus* se compone de un cromosoma lineal de 6,8 Mb que dispone de todos los genes implicados en el metabolismo primario, además de 24 agrupaciones de metabolitos secundarios (Medema y col., 2010; Chen y col., 2010), y cuatro plásmidos lineales: pSCL1 (11,7 kb), pSCL2 (120 kb), pSCL3 (430 kb) y pSCL4 (1,8 Mb) (Keen y col., 1988; Wu y Roy, 1993; Netolitzky y col., 1995; Medema y col., 2010) (figura 1.8).

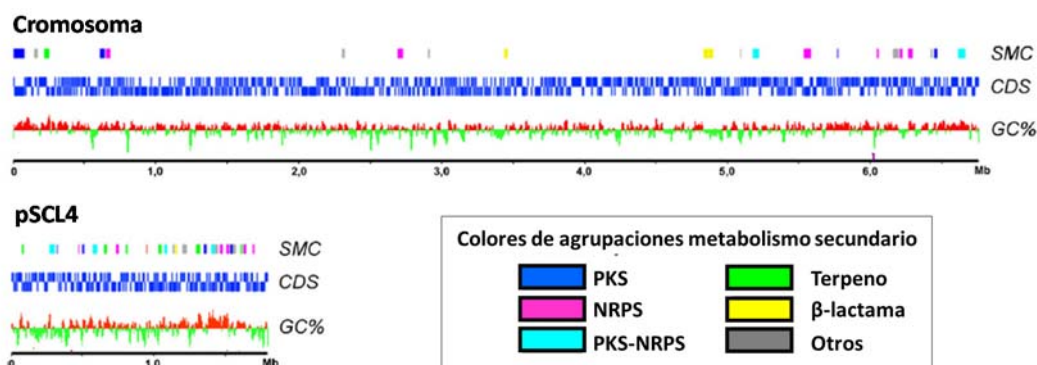


Figura 1.8. Visión global de las agrupaciones génicas de metabolitos secundarios en el cromosoma y en pSCL4 de *S. clavuligerus*. SMC: agrupación génica de metabolito secundario, se muestran en diferentes colores de acuerdo a la leyenda. PKS, policétido sintasa. NRPS, sintetasa de péptido no ribosomal. PKS-NRPS, híbrido de policétido sintasa-sintetasa de péptido no ribosomal. CDS: secuencias de ADN codificantes. GC %: porcentaje de GC. (Modificado de Medema y col., 2010).

Hasta el año 2010, se consideraba que *S. clavuligerus* presentaba solamente 3 plásmidos. Sin embargo, tras la secuenciación de su genoma por Medema y col. (2010), se descubrió la existencia de un cuarto plásmido de 1,8 Mb: pSCL4. Este megaplásmido constituye un cuarto del total del genoma (tabla 1.2) y un gran reservorio, densamente empaquetado, de 25 agrupaciones de metabolitos secundarios (figura 1.8) que han sido descritas por dicho grupo, algunas de las cuales tienen un gran parecido con agrupaciones génicas de antibióticos conocidos, mientras que otras parecen ser completamente nuevas y algunas presentan características que no habían sido descritas anteriormente. Este elemento extracromosomal, carente de genes esenciales para el metabolismo primario (Medema y col., 2010), es dispensable para la supervivencia del organismo (Charusanti y col., 2012; Álvarez-Álvarez y col., 2014a), al menos en condiciones experimentales, pero sí podría conferirle una gran ventaja ecológica.

	<i>S. clavuligerus</i>			<i>S. coelicolor</i>	<i>S. avermitilis</i>
	Cromosoma	pSCL4	Total	Cromosoma	Cromosoma
Tamaño de la secuencia (Mb)	6,760	1,796	8,556	8,668	8,546
GC %	72	72	72	72	72
Operones de ARNr	6	0	6	6	6
ARNt	66	7	73	63	68
ARNtm	1	0	1	1	1
Secuencias codificantes	5700	1581	7281	7825	7574
Agrupaciones metabolitos secundarios	24	25	49	20	30

Tabla 1.2. Comparación entre la arquitectura genómica de *S. clavuligerus*, *S. coelicolor* y *S. avermitilis*. (Modificado de Medema y col., 2010).

1.2.1.1. Escenarios hipotéticos de la evolución del megaplásmido pSCL4

S. clavuligerus presenta un cromosoma de menor tamaño (6,8 Mb) en comparación con el de otras especies de *Streptomyces* secuenciados (8,5-9 Mb) y un megaplásmido con una notable similitud funcional con los brazos del cromosoma. Además, pSCL4 dispone de un origen de replicación propio en su región central, en torno al cual se agrupan genes de replicación y una región similar a regiones cromosómicas de otros actinomicetos pero no identificada en el cromosoma de *S. clavuligerus*. Estas evidencias han llevado a proponer tres posibles escenarios de evolución del megaplásmido en los que se consideran múltiples eventos de recombinación entre un plásmido pequeño y los brazos del cromosoma de forma simultánea o consecutiva (Medema y col., 2010) (figura 1.9).

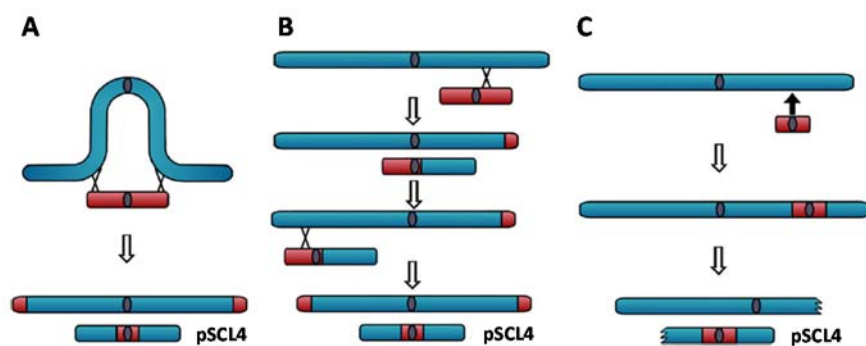


Figura 1.9. Escenarios de evolución del megaplásmido pSCL4 en *S. clavuligerus*. En azul se indican las regiones cromosómicas y en rojo las regiones plasmídicas del plásmido pequeño que ha dado lugar al megaplásmido. (Tomado de Medema y col., 2010).

Según el primer escenario, una recombinación doble entre un plásmido relativamente pequeño y el centro del cromosoma, dio lugar un replicón con el centro del cromosoma y pequeños brazos plasmídicos y un segundo replicón con el centro del plásmido y los largos brazos cromosomales (figura 1.9, A). La segunda hipótesis es una variante de la primera y considera dos eventos de recombinación asincrónicos: primero, una recombinación entre un plásmido pequeño con un brazo del cromosoma para dar un plásmido asimétrico y, posteriormente, una segunda recombinación con el otro brazo del cromosoma (figura 1.9, B). En el tercer planteamiento, un plásmido pequeño se habría integrado en uno de los brazos del cromosoma y, posteriormente, se habría separado por rotura, por ejemplo durante la transferencia conjugativa, dando lugar a un replicón independiente (figura 1.9, C).

1.2.1.2. Regulación entre el megaplásmido pSCL4 y el cromosoma

Como ya se ha comentado anteriormente, en *Streptomyces*, un mecanismo de regulación de la expresión de las agrupaciones génicas de metabolitos secundarios son las γ -butirolactonas (apartado 1.1.5). En *S. clavuligerus*, el gen que codifica la proteína receptora de butirolactonas (Brp) y que regula la producción de ácido clavulánico y cefamicina C (Santamarta y col., 2005), es SCLAV_p0894 y está localizado en el megaplásmido. Este gen parece ser el único que codifica una proteína receptora de butirolactonas en todo el genoma de *S. clavuligerus* (Medema y col., 2010). Sin embargo, se han identificado cuatro posibles proteínas biosintéticas de γ -butirolactonas ScbA/AfsA, tres de ellas en el cromosoma (SCLAV_0463, SCLAV_0471, SCLAV_2310) y una en el megaplásmido (SCLAV_p0812), siendo la tercera (SCLAV_2310) la candidata a participar en la biosíntesis de γ -butirolactonas más probable según análisis filogenéticos (Medema y col., 2010). El hecho de que la única proteína receptora de butirolactonas esté codificada en el megaplásmido resulta remarcable dado que todas las otras descritas están codificadas en el cromosoma. Además, esto implica que Brp transregula varios factores en el cromosoma (al menos las agrupaciones génicas de ácido clavulánico y cefamicina C). Curiosamente, dos de las proteínas biosintéticas de γ -butirolactonas que presentan dominios AfsA (SCLAV_0463 y SCLAV_0471) se localizan en una agrupación génica de policétidos (SMC5), que por tanto podría estar regulada por señalización mediante γ -butirolactonas (Medema y col., 2010).

Entre los genes reguladores identificados en *S. clavuligerus* se encuentran: 50 genes que codifican factores sigma, de los cuales 43 se localizan en el cromosoma y 7 en el megaplásmido; 51 sistemas de dos componentes, de los cuales 44 son cromosomales y 7 megaplasmídicos; 21

reguladores de respuesta huérfanos y 8 genes de histidina quinasa huérfanas. Los sistemas de dos componentes incluyen al menos 5 (codificados en el cromosoma) homólogos, muy próximos, de sistemas cuya implicación en la regulación de biosíntesis de antibióticos ha sido descrita: AfsQ12 (SCLAV_3812-3813) (Ishizuka y col., 1992), CutRS (SCLAV_4778-4779) (Chang y col., 1996), RapA12 (SCLAV_4312-4313) (Lu y col., 2007), AbrB12 (SCLAV_1381-1382) y AbiA123 (SCLAV_3595-3597). Se detectaron 26 genes que codifican serina/treonina quinasa, de los cuales solo 2 se localizan en el megaplásmido, y 20 genes que codifican reguladores de tipo SARP, de los cuales 8 se localizan en el megaplásmido y 7 forman parte de agrupaciones de metabolitos secundarios o se localizan próximos a ellas. Sorprendentemente, el plásmido pSCL4 presenta un número considerablemente menor de todas las clases de reguladores que el cromosoma, lo que refuerza la idea de que se trata de un elemento genético altamente especializado (Medema y col., 2010).

1.2.1.3. Agrupaciones génicas de metabolismo secundario

S. clavuligerus presenta un total de 49 agrupaciones génicas para la biosíntesis de metabolitos secundarios (SMC, del inglés *secondary metabolite cluster*), 24 cromosómicas y 25 localizadas en el megaplásmido, lo que constituye un número sin precedentes entre las bacterias (Medema y col., 2010; Chen y col., 2010) (tabla 1.3).

Además de los metabolitos que esta cepa produce —ácido clavulánico, cefamicina C, clavamas y holomicina, y cuya biosíntesis y regulación se exponen a continuación— Medema y col. (2010) han identificado en su genoma agrupaciones génicas para la biosíntesis de diversos compuestos: policétidos, péptidos no ribosomales, compuestos híbridos de policétidos y péptidos no ribosomales, terpenos, sideróforos como las desferroxiaminas, el indolocarbazol, la estaurosporina, lantibióticos, el fosfoglicolípido moenomicina, un macrólido similar al tacrolimus y un posible nuevo compuesto β -lactámico, entre otros. Asimismo, se han descrito las agrupaciones de tunicamicina (Takatsuki y col., 1971; Chen y col., 2010) y naringenina (Álvarez-Álvarez y col., 2015).

La presencia de múltiples agrupaciones génicas biosintéticas en el megaplásmido que presentan un gran parecido a las de especies de *Streptomyces* relativamente distantes y la ausencia de estas mismas agrupaciones en especies filogenéticamente más próximas, apoya la hipótesis de que muchas agrupaciones génicas de metabolismo secundario en las bacterias son adquiridas por transferencia génica horizontal (Medema y col., 2010).

Cromosoma			Megaplásmido		
Agrupación	Genes	Producto	Agrupación	Genes	Producto
Medema y col., 2010			Medema y col., 2010		
SMC1	SCLAV_0001-0026	Macrólido PKS tipo I	SMCp1	SCLAV_p0064-p0075	Terpeno sintasa
SMC2	SCLAV_0082-0105	No identificado	SMCp2	SCLAV_p0286-p0308	NRPS y PKS-NRPS
SMC3	SCLAV_0148-0152	Sideróforo	SMCp3	SCLAV_p0326-p0334	Terpeno sintasa y PKS tipo II
SMC4	SCLAV_0153-0172	Terpeno sintasa	SMCp4	SCLAV_p0486-p0492	Terpeno sintasa
SMC5	SCLAV_0446-0497	PKS tipo I	SMCp5	SCLAV_p0509-p0520	PKS tipo II
SMC6	SCLAV_1942-1955	Sideróforo	SMCp6	SCLAV_p0563-p0588	NRPS/ PKS/ Terpeno sintasa
SMC7	SCLAV_2274-2302	NRPS	SMCp7	SCLAV_p0633-p0643	Terpeno sintasa
SMC8	SCLAV_2456-2469	Lantibiótico	SMCp8	SCLAV_p0690-p0714	No identificado
SMC9	SCLAV_2920-2935	Clavamas	SMCp9	SCLAV_p0760-p0768	Terpeno sintasa
SMC10	SCLAV_4178-4197	Ácido clavulánico	SMCp10	SCLAV_p0966-p0986	Terpeno sintasa
SMC11	SCLAV_4198-4217	Cefamicina C	SMCp11	SCLAV_p1005-p1012	PKS-NRPS
SMC12	SCLAV_4387-4392	Lantibiótico	SMCp12	SCLAV_p1057-p1063	Toxina actina-ADP-ribosilante
SMC13	SCLAV_4460-4486	PKS-NRPS	SMCp13	SCLAV_p1074-p1079	Betalactama
SMC14	SCLAV_4740-4758	NRPS	SMCp14	SCLAV_p1107-p1023	Estauosporina (indolocarbazol)
SMC15	SCLAV_4911-4921	PKS tipo II	SMCp15	SCLAV_p1170-p1194	Terpeno sintasa
SMC16	SCLAV_5142-5148	NRPS	SMCp16	SCLAV_p1219-p1234	Enedina PKS
SMC17	SCLAV_5227-5255	Fitoeno/escualeno	SMCp17	SCLAV_p1263-p1273	PKS-NRPS
SMC18	SCLAV_5267-5278	Holomicina	SMCp18	SCLAV_p1274-p1290	Moenomicina (fosfoglicolípido)
SMC19	SCLAV_5325-5347	NRPS	SMCp19	SCLAV_p1302-p1311	NRPS
SMC20	SCLAV_5463-5497	PKS tipo III	SMCp20	SCLAV_p1334-p1341	NRPS
SMC21	SCLAV_5608-5638	PKS-NRPS	SMCp21	SCLAV_p1345-p1376	Enedina PKS
SMC22	SCLAV_5670-5674	Terpeno sintasa	SMCp22	SCLAV_p1407-p1415	Terpeno sintasa
SMC23	SCLAV_5702-5710	Sideróforo	SMCp23	SCLAV_p1426-p1432	NRPS/ Terpeno sintasa
Álvarez-Álvarez y col., 2015			SMCp24	SCLAV_p1471-p1483	NRPS
SCLAV_5491-5492, 5472			SMCp25	SCLAV_p1508-p1510	Posible agrupación de betalactama
Chen y col., 2010					
Tunicamicina	SCLAV_4276-4287	Tunicamicina			

Tabla 1.3. Agrupaciones génicas de metabolitos secundarios en el genoma de *S. clavuligerus* localizadas en el cromosoma (SMC, naringenina, tunicamicina) y en el megaplásmido pSCL4 (SMCp). (Modificado de Medema y col., 2010).

1.2.2. Biosíntesis de compuestos β -lactámicos

Las agrupaciones de ácido clavulánico y cefamicina C se encuentran adyacentes en el cromosoma de *S. clavuligerus* formando una «superagrupación» de 60 kb (Ward y Hodgson, 1993). Ambas se localizan también de manera contigua en el genoma de otras especies productoras de ácido clavulánico y cefamicina C, como son *Streptomyces katsurahamanus* y *Streptomyces jumonjinesis* (Ward y Hodgson, 1993). En el cromosoma se encuentra también una agrupación génica de clavamas (Mosher y col., 1999; Tahlan y col., 2007), mientras que, en el megaplásmido pSCL4 está localizada la agrupación de genes parálogos del ácido clavulánico, que contiene los genes duplicados *ceaS1*, *bls1*, *pah1* y *oat1*, que corresponden a las etapas compartidas de las rutas de ácido clavulánico y clavamas (Jensen y col., 2004; Tahlan y col., 2004b; 2007; Jensen, 2012) (figura 1.10). Recientemente, Medema y col. (2010) han descrito una pequeña agrupación (SMCp25) localizada en el megaplásmido pSCL4 y constituida por tres genes, SCLAV_p1508, SCLAV_p1509 y SCLAV_p1510, de los cuales SCLAV_p1509 tiene cierta similitud con los genes para la clavaminato sintasa (*cas2* y *cas1*), por lo que podría ser la responsable de la producción de un nuevo antibiótico β -lactámico (Medema y col., 2010).

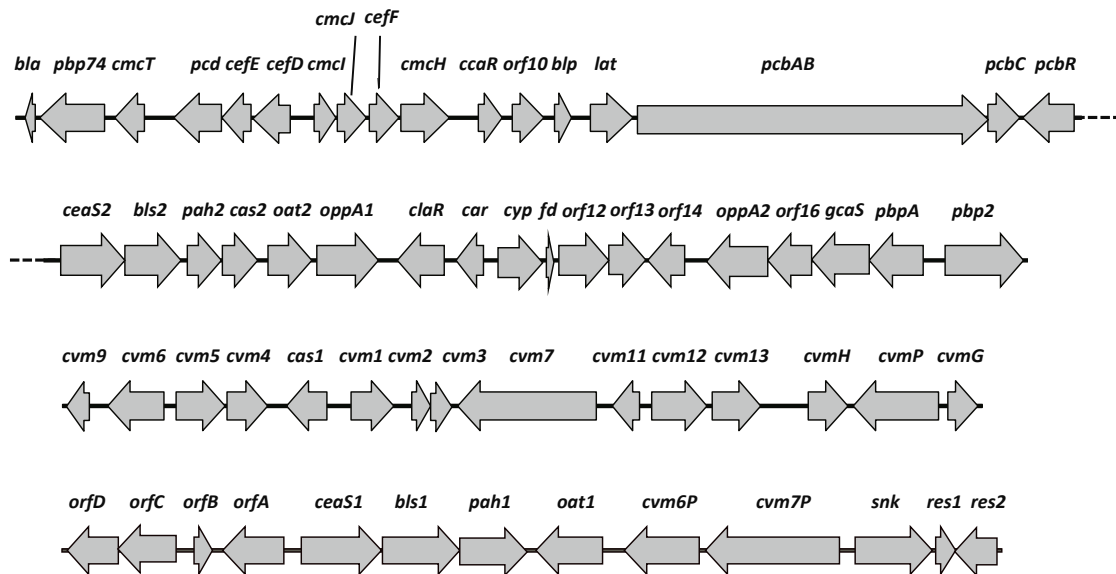


Figura 1.10. Organización de la agrupación de cefamicina C, ácido clavulánico, clavamas y parálogos de clavamas (desde arriba hacia abajo) en *S. clavuligerus*. (Modificado de Liras y Gomez-Escribano, 2008; Jensen, 2012). La línea discontinua en las dos primeras indica su continuidad.

1.2.2.1. Ruta biosintética y agrupación de la cefamicina C

La cefamicina C es una molécula con estructura β -lactámica de tipo cefalosporina. Presenta un anillo β -lactámico (carbonos en las posiciones 7, 8 y 9), un anillo dihidrotiazínico (carbonos C2, 3 y 4), una cadena lateral de ácido α -aminoadípico, un grupo metoxilo en el carbono C7 y un grupo carbamoilo en C3 (Whitney y col., 1972; Liras y Demain, 2009) (figura 1.11).

S. clavuligerus produce cefamicina C a través de una ruta que presenta varios pasos en común con la biosíntesis de cefalosporinas y penicilinas en otros actinomicetos productores de cefamicina C (Liras y Demain, 2009) y en la cual se generan otros compuestos β -lactámicos como isopenicilina N y desacetocefalosporina C (figura 1.11).

El primer paso de la ruta es la condensación de los tres aminoácidos precursores (L- α -ácido aminoadípico, L-cisteína y L-valina) mediante la enzima ACV sintetasa (ACVS) codificada por el gen *pcbAB*, originando el tripéptido lineal δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina (LLD-ACV) (Tobin y col, 1991; Schwecke y col., 1992). El aminoácido no proteínogénico L- α -ácido aminoadípico es sintetizado a partir de la lisina en dos pasos: 1) la lisina experimenta una desaminación mediante la lisina-6-aminotransferasa, LAT, codificada por el gen *lat*, formando ácido 1-piperideín-6-carboxílico (P6C) (Madduri y col., 1991; Tobin y col., 1991) y 2) el P6C es convertido a L- α -ácido aminoadípico por la piperideín-6-carboxilato deshidrogenasa, P6C-DH

(de la Fuente y col., 1997), codificada por el gen *pcd* (Pérez-Llarena y col., 1998; Alexander y Jensen, 1998). Los genes *lat* y *pcd* se localizan en la agrupación génica de la cefamicina C, pero no se encuentran en *Streptomyces* no productores de cefamicinas (Liras y Demain, 2009). Los anillos β -lactámico y tiazolidínico proceden de la ciclación oxidativa del péptido ACV por la isopenicilina N ciclasa (Jensen y col., 1986) codificada por el gen *pcbC* (Leskiw y col., 1988), formando isopenicilina N, el primer intermediario con actividad antibiótica.

El siguiente paso es la racemización de la cadena lateral L- α -aminoadipil de la isopenicilina N a la configuración D, mediante la enzima isopenicilina N epimerasa (Usui y Yu, 1989), codificada por *cefD* (Kovacevic y col., 1990), para formar penicilina N. El anillo tiazolidínico de cinco miembros de la penicilina N se expande a uno dihidrotiazínico de seis miembros por la DAOC sintasa (Jensen y col., 1985), producto del gen *cefE* (Kovacevic y col., 1989, 1990), dando lugar a la desacetoxicefalosporina C (DAOC). Este intermediario es posteriormente hidroxilado en el C3 por la DAOC hidroxilasa (Jensen y col., 1985; Baker y col., 1991) codificada por *cefF* (Kovacevic y Miller, 1991), para generar desacetilcefalosporina C (DAC), último intermediario común con la ruta biosintética de las cefalosporinas.

Los últimos pasos de la biosíntesis de la cefamicina C implican una carbamoilación y una metoxilación. La transferencia de un grupo carbamoilo al C3 hidroxilado de DAC es catalizada por la DAC carbamoiltransferasa (Brewer y col., 1980), codificada por *cmcH* (Coque y col., 1995b), para dar O-carbamoil-desacetil-cefalosporina C (OCDAC). El último paso de la biosíntesis de cefamicina C tiene lugar en dos pasos consecutivos catalizados por un complejo de dos proteínas. La cefalosporina-7- α -hidroxilasa, codificada por *cmcI*, cataliza la hidroxilación del C7 del anillo β -lactámico de OCDAC, y la enzima codificada por el gen *cmcJ* transfiere un grupo metilo al recién creado grupo hidroxilo en el C7 (Xiao y col., 1993; Coque y col., 1995a; Enguita y col., 1996; Alexander y Jensen, 1998; Sim y Sim, 2000; Oster y col., 2006).

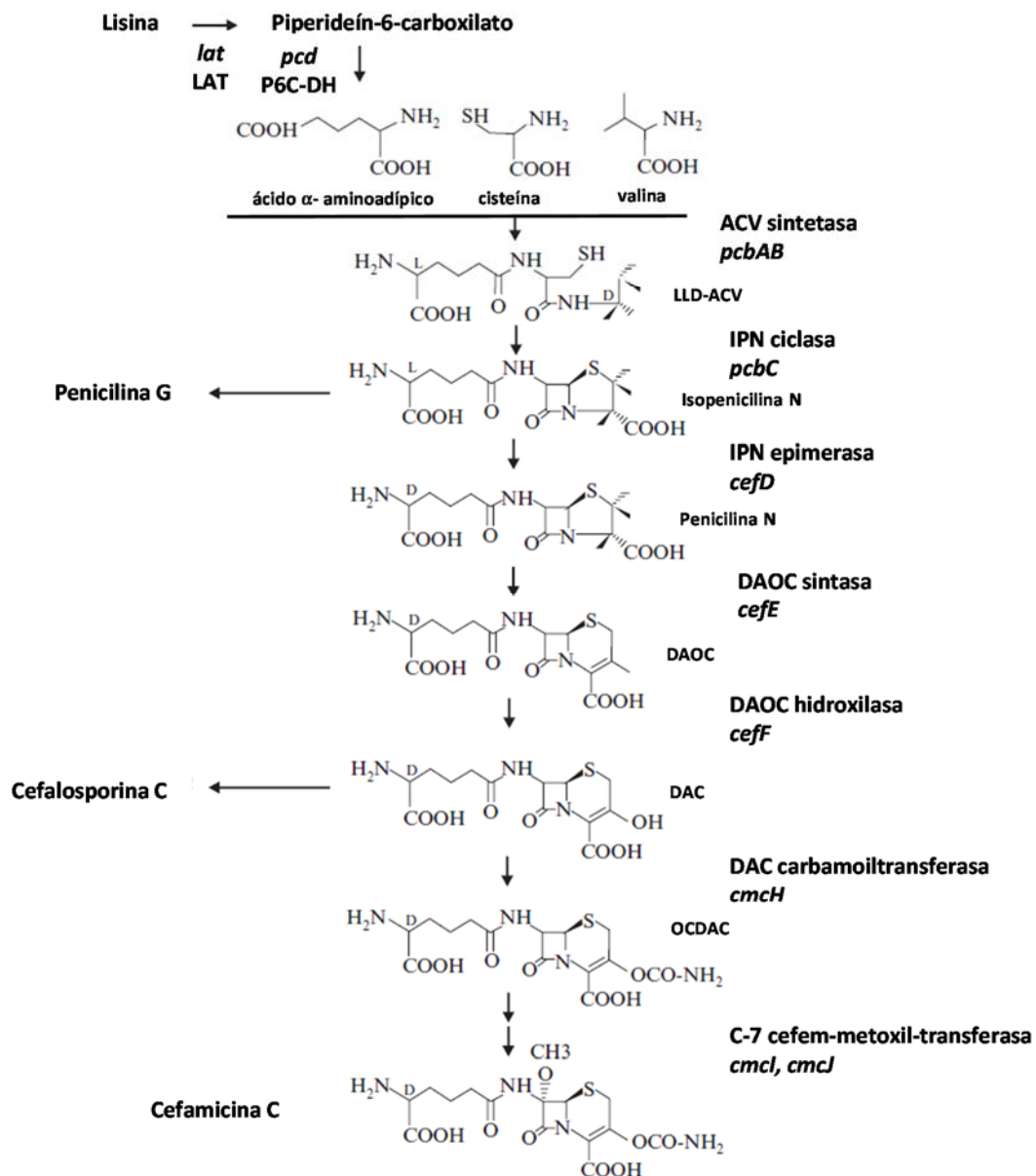


Figura 1.11. Ruta biosintética de la cefamicina C en *S. clavuligerus*. (Modificado de Liras y Demain, 2009).

La agrupación génica de la cefamicina C se extiende aproximadamente unas 34 kb y presenta genes implicados en la regulación (*ccaR*), resistencia (*pcbR*, *pbp74*, *bla*) y transporte (*cmcT*), además de los genes que intervienen en la biosíntesis de cefamicina C (Alexander y Jensen, 1998; Liras, 1999) (figura 1.10). En el extremo contiguo a la agrupación del ácido clavulánico, el gen *pcbR* (también llamado *pbp57*) codifica una proteína de unión a penicilinas del grupo de alto peso molecular y clase B implicada en la resistencia a β-lactamas (Paradkar y col., 1996). En el otro extremo de la agrupación, el gen *bla* codifica una β-lactamasa de tipo A de baja actividad

(Perez-Llarena y col., 1997b). Corriente arriba de *bla* se encuentra el gen *pbp74* que codifica una posible proteína de unión a penicilinas de bajo peso molecular que podría tener una función similar y complementaria a *pcbR* (Alexander y Jensen, 1998). Por delante de *pbp74* se localiza *cmcT*, que codifica una posible proteína de exportación perteneciente a los transportadores dependientes de gradiente de protón de la superfamilia MFS (del inglés, *major facilitator superfamily*) (Alexander y Jensen, 1998). También por delante de *cmcT* se encuentran los genes biosintéticos *pcd*, *cefE*, *cefD*, *cmcl*, *cmcl*, *cefF* y *cmcH*, y antes de *cmcH* se encuentran los genes *ccaR*, *orf10* y *blp*. *ccaR* codifica un regulador positivo de la familia SARP que participa en la regulación conjunta de la agrupación de cefamicina C, ácido clavulánico y clavamas. La función de la proteína codificada por *orf10* aún no ha sido dilucidada. *blp* codifica una proteína similar al inhibidor de β -lactamasas BLIP codificado por el gen *bli* (Doran y col., 1990). Los mutantes nulos en *blp* y *orf10* no muestran ninguna alteración en la producción de β -lactamasas (Alexander y Jensen, 1998). Los genes biosintéticos *lat*, *pcd*, *pcbAB* y *pcbC* participan también en la producción de cefalosporinas y de penicilinas.

1.2.2.2. Ruta biosintética y agrupación del ácido clavulánico y las clavamas

El ácido clavulánico y otros compuestos con estructura de clavama se caracterizan por presentar un núcleo común, constituido por un anillo β -lactámico (carbonos en las posiciones 5, 6 y 7), fusionado con un anillo oxazolidínico (carbonos en las posiciones 2 y 3). En el caso del ácido clavulánico, este núcleo clavam es modificado añadiendo un grupo carboxilo en la posición C3 y una cadena lateral en C2 (Howarth y col., 1976). La estereoquímica 3R, 5R del ácido clavulánico es esencial para su función inhibidora de β -lactamasas, a diferencia del resto de las clavamas que poseen un estructura 5S y que carecen de esta propiedad (Bentley y Hunt, 1980). Las clavamas con estereoquímica 5S carecen del grupo carboxílico en el C3 y presentan en C2 una amplia variedad de cadenas laterales, dando lugar a diferentes compuestos biológicamente activos, algunos de ellos con propiedades antifúngicas y bacteriostáticas (Jensen, 2012). Las cuatro clavamas con estructura 5S producidas por *S. clavuligerus* son: 2-formiloximetilclavama, 2-hidroximetilclavama, alanilclavama y el clavam-2-carboxilato (Jensen, 2012).

El ácido clavulánico y las clavamas 5S (denominadas también simplemente clavamas), dadas sus semejanzas estructurales, comparten en *S. clavuligerus* las etapas tempranas de una ruta biosintética común que da como producto final el ácido clavamínico. A partir de este intermediario común, la ruta se diversifica para sintetizar ácido clavulánico o clavamas 5S (Egan y col., 1997).

La vía de las clavamas, mostrada en la figura 1.12 comienza con la condensación de la L-arginina y el D-gliceraldehído-3-fosfato para dar N²-(2-carboxietil)-L-arginina (CEA) mediante la acción de la enzima carboxietil-arginina sintasa (CEAS) (Khaleeli y col., 1999) codificada por el gen *ceaS* (Pérez-Redondo y col., 1999). El cierre del anillo β -lactámico forma ácido desoxiguanidino proclavamínico (DGPC) y es catalizado por la enzima β -lactama sintetasa (BLS), codificada por *b/s* (Bachmann y col., 1998). A continuación, la enzima clavaminato sintasa (CAS) (Salowe y col., 1990), codificada por *cas* (Marsh y col., 1992), sintetiza el ácido guanidino-proclavamínico a través de la hidroxilación del intermediario DGPC. El siguiente paso de la ruta es la formación del ácido proclavamínico por hidrólisis del grupo amidino del ácido guanidino-proclavamínico, mediante la acción de la proclavaminato amidinohidrolasa (PAH) (Elson y col., 1993), codificada por *pah* (Aidoo y col., 1994). La formación del anillo oxazolidínico tiene lugar a través de una reacción en dos pasos catalizada por CAS: una ciclación para formar el ácido dihidroclavamínico como intermediario inestable (Baldwin y col., 1991; Salowe y col., 1991) y la desaturación del enlace entre el C2 y el radical a él unido para sintetizar el ácido clavamínico como producto final (Salowe y col., 1990). Esta molécula, que ya presenta el núcleo clavam y estereoquímica 3*S*, 5*S*, es el último intermediario común de la ruta biosintética del ácido clavulánico y las otras clavamas (Egan y col., 1997).

Los restantes pasos de la ruta biosintética del ácido clavulánico aún no han sido totalmente esclarecidos. Se ha demostrado que la enzima N-glicil-clavaminato sintetasa (GCAS), codificada por el gen *gcaS*, condensa el ácido clavamínico con una molécula de glicina dando lugar a ácido N-glicil-clavamínico (Arulanantham y col., 2006). La transformación de ácido N-glicilclavamínico en clavaldehído tampoco ha sido completamente descrita, pero se sabe que se produce un cambio de la estereoisomería del grupo carboxilo de C3 y el hidrógeno de C5 para dar lugar a una estereoquímica 3*R*, 5*R* y la sustitución del grupo N-glicil en posición nueve por un grupo aldehído. El clavaldehído (clavulanato-9-aldehído), compuesto que posee actividad inhibidora de β -lactamasas debido a su estereoquímica 3*R*, 5*R*, es el último intermediario de la ruta. Finalmente, la clavaldehído reductasa (CAR), codificada por el gen *car* (Nicholson y col., 1994; Pérez-Redondo y col., 1998) cataliza la reducción del aldehído del C9 dando como producto final ácido clavulánico.

Los pasos que llevan a la formación de las distintas clavamas 5S a partir del último intermediario común, el ácido clavamínico, han sido postulados en función de la obtención de mutantes no productores de algunos de estos compuestos (Tahlan y col., 2004b; 2007; Jensen, 2012).

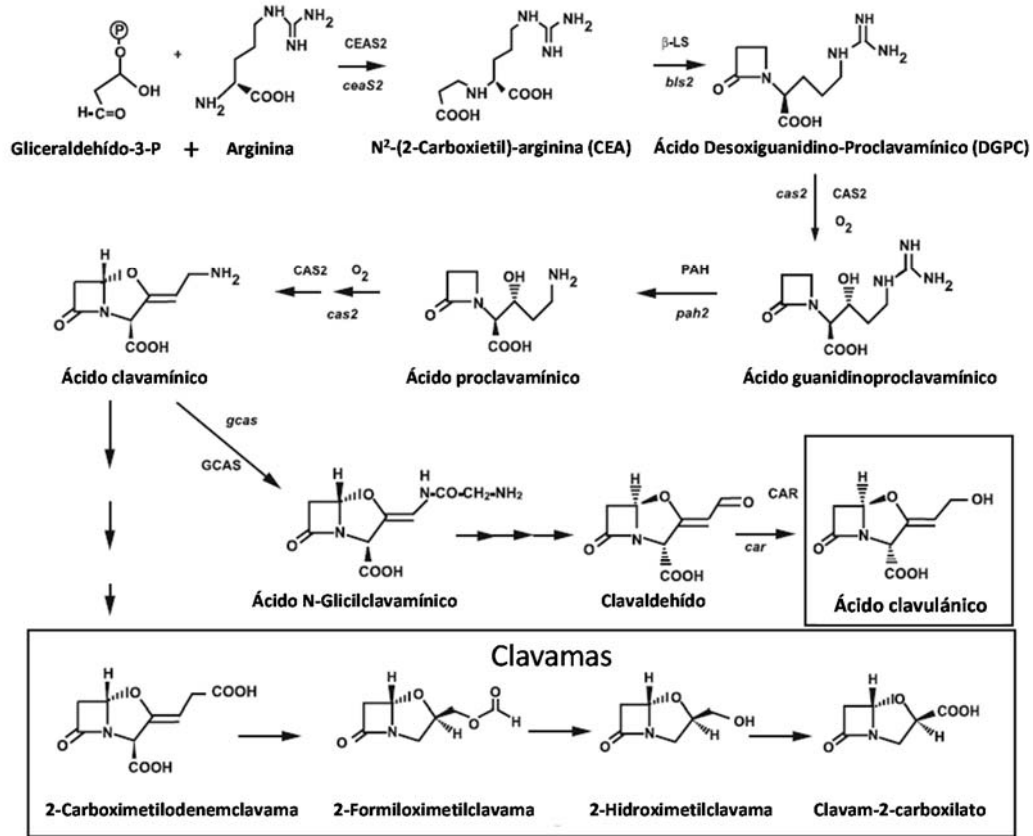


Figura 1.12. Ruta biosintética del ácido clavulánico y clavamas en *S. clavuligerus*. (Modificado de Liras y col., 2008).

La agrupación génica del ácido clavulánico se extiende unas 30 kb y presenta, además de los genes biosintéticos, otros genes que resultan esenciales para la producción de este metabolito (figura 1.10). Uno de ellos es el gen *oat2*, una ornitina acetiltransferasa probablemente implicada en la biosíntesis de arginina, precursor del ácido clavulánico (de la Fuente y col., 2004; Arulanantham y col., 2006). Además, *S. clavuligerus* presenta, al menos, dos genes que codifican proteínas similares a *Oat2*: *argJ*, en la agrupación génica de biosíntesis de arginina (Rodríguez-García y col., 2000) y *oat1*, en la agrupación de genes parálogos (Tahlan y col., 2004b). La delección de *oat2* reduce notablemente la producción de ácido clavulánico (de la Fuente y col.,

2004). Además, *Oat2* podría estar implicada en una regulación negativa sobre la producción de ácido clavulánico en respuesta a altas concentraciones de arginina (de la Fuente y col., 2004).

Los genes *oppA1* y *oppA2* codifican dos oligopéptido permeasas. La delección de cualquiera de estos dos genes anula la producción de ácido clavulánico sin afectar a la producción de cefamicina C, y en el caso de *oppA2* da lugar a un mutante capaz de producir holomicina y con fenotipo *bald*, que no desarrolla micelio aéreo (de la Fuente y col., 2002; Lorenzana y col., 2004). Entre estos dos mutantes no hay complementación cruzada, por ello se ha propuesto la implicación en el transporte de péptidos señal que, una vez en el interior de la célula, activan la producción de ácido clavulánico (Lorenzana y col., 2004). Sin embargo, recientemente se ha comprobado que el mutante *oppA2* de Lorenzana y col. (2004) presenta bajo número de copias de los plásmidos pSCL1, pSCL2 y pSCL4, por ello, se analizó el fenotipo de un nuevo mutante *oppA2* que posee niveles normales de todos los plásmidos (Álvarez-Álvarez y col., 2014a). Esta cepa, como la anterior, no produce ácido clavulánico y superproduce holomicina, sin embargo, no es deficiente en la esporulación (Álvarez-Álvarez y col., 2014a).

Los genes *cyp* y *fd* se presentan contiguos en la agrupación. Sus productos proteicos presentan alta similitud con un citocromo P450 y una ferredoxina, respectivamente (Li y col., 2000). La delección de *cyp* anula la producción de ácido clavulánico y aumenta considerablemente la producción de cefamicina C (Mellado y col., 2002). *Cyp* podría estar interviniendo en las reacciones de oxidación necesarias para obtener el clavaldehído (Li y col., 2000). El gen *orf12* codifica una proteína que presenta una homología significativa con β -lactamasas aunque solamente presenta algunos de los motivos conservados característicos de estas proteínas. Esta proteína es esencial en la producción de ácido clavulánico (Li y col., 2000; Mellado y col., 2002; Jensen y col., 2004). El marco de lectura *orf13* codifica una proteína con significativa homología a proteínas transportadoras de membrana. La interrupción de este gen afecta notablemente la producción de ácido clavulánico, aunque no la anula, y de clavamas 5S (Jensen y col., 2004). Esta proteína podría constituir un sistema de excreción de metabolitos con estructura clavama (Mellado y col., 2002; Jensen y col., 2004). El gen *orf14* aparentemente codifica una acetiltransferasa que podría estar implicada en mecanismos de autorresistencia a través de la acetilación (Mellado y col., 2002). La interrupción de este gen provoca una disminución, y no la anulación, de la producción de ácido clavulánico (Mellado y col., 2002; Jensen y col., 2004), lo que podría explicarse por la expresión de un gen parálogo a *orf14* (Jensen y col., 2000). El marco de lectura *orf16* codifica un polipéptido que presenta una región

conservada que podría ser responsable de modificaciones postraduccionales necesarias para el adecuado anclaje de las proteínas a la pared celular (Mellado y col., 2002). La interrupción de *orf16* anula la producción de ácido clavulánico y provoca la acumulación de ácido N-acetilglicilclavamínico (Jensen y col., 2004). En un extremo de la agrupación se localizan los genes *pbpA* y *pbp2*. Estos codifican proteínas de unión a penicilina (Mellado y col., 2002) que constituyen un mecanismo de resistencia debido a su baja afinidad por antibióticos β -lactámicos (Jensen y col., 2004; Ishida y col., 2006).

Los genes implicados en la biosíntesis de las clavamas 5S se localizan en dos agrupaciones génicas (figura 1.10). Por un lado, la agrupación génica de las clavamas situada en el cromosoma y constituida por los genes: *cvm1*, *cvm2*, *cvm3*, *cvm4*, *cvm5*, *cvm6*, *cvm7* y el gen parálogo *cas1* (Tahlan y col., 2004a; 2007; Jensen, 2012) (figura 1.10) y, por el otro, la agrupación paróloga en el pSCL4, constituida por: *ceaS1*, *bls1*, *pah1*, *oat1*, y otros genes (Zelyas y col., 2008), entre los que cabe destacar el regulador global de las clavamas 5S, *cvm7P* (Medema y col., 2010; Jensen, 2012) (figura 1.10). En cuanto a esta última agrupación, Medema y col. (2010) incluyen solo los cuatro genes parálogos (*ceaS1*, *bls1*, *pah1*, *oat1*) junto con los genes reguladores *cvm6P* y *cvm7P* (SMCp13; tabla 1.3).

1.2.2.3. Regulación coordinada de la biosíntesis de cefamicina C y ácido clavulánico

En *S. clavuligerus* existe una regulación coordinada de las agrupaciones para ácido clavulánico y cefamicina C por reguladores específicos de ruta (*ccaR* y *clAR*) y reguladores pleiotrópicos que controlan tanto el metabolismo secundario como la diferenciación morfológica, lo que revela un complejo sistema de regulación aún por desentrañar.

1.2.2.3.1. Regulación específica

En la agrupación de cefamicina C se localiza el gen *ccaR* (del inglés, *cephamycin C-clavulanic acid regulator*), que codifica un regulador transcripcional de la familia SARP. La interrupción de este gen anula la producción de cefamicina C y ácido clavulánico, sin embargo, el aumento del número de copias del regulador incrementa la producción de ambos metabolitos (Pérez-Llarena y col., 1997a; Alexander y Jensen, 1998). Este regulador actúa uniéndose a las secuencias heptaméricas de las regiones promotoras de los genes *lat* (etapas tempranas), *cefD* y *cefF* (etapas intermedias) y *cmcl* (etapas tardías) de la ruta biosintética de la cefamicina C, regulando, de este modo, la transcripción de los policistrones de los genes biosintéticos (Santamarta y col.,

2011). A su vez, la proteína CcaR se une a su propio promotor y autorregula positivamente su expresión (Santamarta y col., 2002).

En la agrupación del ácido clavulánico se localiza el gen *cl*aR (del inglés, *clavulanic acid regulator*), que codifica un activador transcripcional de la familia LysR específico de ruta (Paradkar y col., 1998). ClaR controla las etapas tardías de la producción de ácido clavulánico activando los genes comprendidos entre *car* y *oppA2* (figura 1.10), probablemente por interacción con el promotor bidireccional *car-cyp* y los promotores de *orf12*, *orf14* y *orf16* (López-García, 2010). Otra posible diana de este regulador sería la región promotora de *oat2*, a partir de la cual también podría activar la expresión de *oppA1* (López-García, 2010). La delección del gen *cl*aR: 1) aumenta la expresión de *ccaR*, por lo que la presencia de la proteína ClaR tiene un efecto represor sobre la transcripción del gen *ccaR* (López-García, 2010) y 2) anula la producción de ácido clavulánico (Paradkar y col., 1998) e incrementa la producción de cefamicina C (Pérez-Redondo, 2000). Por otra parte, el aumento del número de copias de *cl*aR aumenta la biosíntesis de ácido clavulánico y disminuye la de cefamicina C (Pérez-Redondo y col., 1998). Esta regulación coordinada de la producción de ambos metabolitos permite equilibrar su formación en función de las necesidades fisiológicas de la célula (Pérez-Redondo y col., 1998). El regulador CcaR ejerce un control directo mediado por la unión a regiones promotoras del gen *cl*aR y otros genes implicados en la biosíntesis del ácido clavulánico, como el policistrón *ceaS2-bls2-pah2-cas2* (Santamarta y col., 2011). Estos resultados confirman los estudios transcriptómicos previos, que muestran en el mutante delecionado en *ccaR* la bajada de expresión de *cl*aR (Pérez-Redondo y col., 1998) y de los genes biosintéticos de ácido clavulánico *ceaS2* (Tahlan y col., 2004a), *car* (Pérez-Redondo y col., 1998) y *oat2* (Pérez-Redondo, 2000).

1.2.2.3.2. Regulación pleiotrópica de orden superior

Multitud de factores componen el sistema de regulación de las biosíntesis de ácido clavulánico y cefamicina C (figura 1.13; Martín y Liras, 2012).

Muchos de los genes *bld* controlan tanto la esporulación como la producción de antibióticos en *S. coelicolor* (Elliot y col., 2008). El gen *bldA* codifica una ARNt para leucina implicado en la traducción de codones raros UUA. Sin embargo, aunque CcaR contiene el codón TTA, el mutante en *bldA* ve afectada la producción de micelio aéreo, pero no la traducción de *ccaR* ni los niveles de antibióticos. Esto podría deberse a que el contexto del codón TTA en la secuencia del gen

ccaR (TTA G), es diferente al que se encuentra en las proteínas dependientes de BldA (generalmente secuencias TTA C o TTA T), lo que permite un reconocimiento del codón por otro ARNt alternativo (Trepanier y col., 2002; Liras y col., 2008). El regulador BldG es un factor anti-anti-sigma necesario para la producción de antibióticos y la diferenciación morfológica en *S. clavuligerus* (Bignell y col., 2005), al igual que ocurre en *S. coelicolor* (Bignell y col., 2000). Este tipo de proteína interacciona con un factor anti-sigma impidiendo la unión de este al factor sigma diana, quedando libre la maquinaria de transcripción (Duncan y col., 1996). Tanto en *S. coelicolor* como en *S. clavuligerus*, el gen que codifica este factor anti-sigma ha sido identificado corriente arriba respecto al gen *bldG*, proponiéndose el nombre *apgA* (del inglés, *antagonistic partner of BldG*) para este marco de lectura (Parashar y col., 2009).

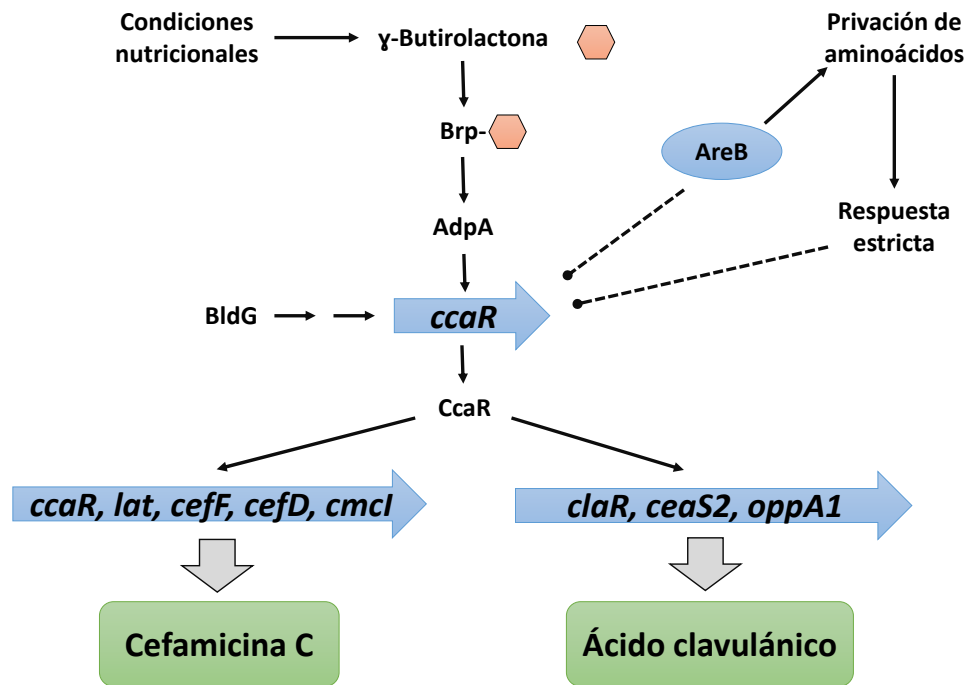


Figura 1.13. Esquema de la cascada de regulación que controla la biosíntesis de ácido clavulánico y cefamicina C en *S. clavuligerus*. (Modificado de Martín y Liras, 2012).

El sistema de señalización por γ -butirolactonas está implicado en la producción de ácido clavulánico y cefamicina C en *S. clavuligerus*. En este microorganismo se han identificado cuatro posibles genes implicados en la biosíntesis de las γ -butirolactonas (Medema y col., 2010), pero un único gen *brp*, para un receptor con afinidad por γ -butirolactonas de tipo IM-2 (Kim y col., 2004; Santamarta y col., 2005; Medema y col., 2010). Brp se encuentra unida a una secuencia consenso para receptores de butirolactonas, denominada ARE, situada por delante de la región

promotora de *ccaR*, reprimiendo su transcripción. A partir de una concentración crítica de γ -butirolactonas, estas se unen a Brp modificando su conformación estructural, liberándose de la secuencia ARE y desreprimiendo la transcripción de *ccaR*. Además, Brp se une a su propio promotor donde existe otra caja ARE, autoregulando su expresión (Santamarta y col., 2005). El aumento de la producción de cefamicina C y de ácido clavulánico observado en el mutante deletado en este gen, indica que la proteína Brp actúa como represor de la biosíntesis de antibióticos, lo que concuerda con el modelo de señalización por γ -butirolactonas descrito en otros *Streptomyces* (Santamarta y col., 2005).

AreB, una proteína de la familia de reguladores lclR que interviene en la biosíntesis y asimilación eficiente de leucina en *S. clavuligerus*, se une a la secuencia ARE localizada en la región promotora de *ccaR* (Santamarta y col., 2005; 2007). El aumento de la producción de cefamicina C y ácido clavulánico observado en el mutante deletado en *areB* indica una conexión entre el metabolismo primario y la biosíntesis de antibióticos en *S. clavuligerus*. Por un lado, la escasa transcripción de los genes biosintéticos de leucina en el mutante $\Delta areB$ conduce a una mayor disponibilidad de valina, precursor de la cefamicina C. Por otra parte, la inactivación de *areB* da lugar a un ligero aumento de la transcripción de *ccaR*, efecto probablemente mediado por el represor Brp, cuya expresión se ve considerablemente afectada por la ausencia de AreB (Santamarta y col., 2007).

AdpA es un regulador pleiotrópico que controla tanto la diferenciación morfológica como la producción de metabolitos secundarios en el género *Streptomyces*. En cuanto a la diferenciación morfológica en *S. clavuligerus*, el papel modulador es dependiente de las condiciones nutricionales (López-García y col., 2010). En este sentido, en medio TBO el mutante *S. clavuligerus* $\Delta adpA$ presenta un desarrollo deficiente con fenotipo formador de escaso micelio blanco sin capacidad para esporular, mientras que en medio ME es fenotípicamente idéntico a la cepa silvestre. Estos resultados parecen indicar que en *S. clavuligerus* AdpA es esencial en la regulación de la formación de esporas, pero prescindible en el desarrollo del micelio aéreo (López-García y col., 2010). Respecto a la producción de antibióticos, la delección de *adpA* provoca una disminución en la producción de ácido clavulánico y cefamicina C, aunque no la anula por completo. La ausencia de *adpA* provoca una reducción en la expresión de los genes *ccaR* y *claR*, y un descenso de la expresión tanto en los genes biosintéticos tempranos como en los tardíos en la agrupación del ácido clavulánico, siendo más drástico dicho descenso en los tempranos (López-García y col., 2010). La interacción de AdpA con reguladores específicos de la

síntesis de metabolitos secundarios ha sido descrita en diferentes especies del género *Streptomyces*, como ocurre en *S. griseus*, donde AdpA se une a las regiones promotoras de *strR* y *orf1*, activadores de la biosíntesis de estreptomicina y un compuesto policétido (Ohnishi y col., 2000; Hirano y col., 2008), activándolos transcripcionalmente. La localización *in silico* de dos posibles sitios de unión a AdpA en la región promotora del gen *ccaR*, con secuencias similares a las descritas en *S. griseus*, refuerza la idea del control directo que AdpA puede ejercer sobre *ccaR* (López-García y col., 2010). Además, la expresión de *adpA* en *S. clavuligerus* está regulada negativamente a nivel transcripcional por la proteína receptora de butirolactonas Brp y la traducción de AdpA es dependiente de *bldA* ya que contiene un codón TTA seguido de C, si bien en *S. clavuligerus* esta proteína no es la única diana a través de la cual *bldA* regula la diferenciación morfológica (López-García y col., 2010).

1.2.3. Biosíntesis de la holomicina

La holomicina es un metabolito con estructura de tipo ditiolpirrolona. Las ditiolpirrolonas están constituidas por un cromóforo, responsable del color, que contiene dos anillos heterocíclicos con un puente disulfuro y diferentes cadenas laterales de tipo N-acilo. Los compuestos con estructura ditiolpirrolona son producidos no solamente por *Streptomyces* o actinomicetos relacionados, como *Saccharothrix* sp. (Lamari y col., 2002), sino también por bacterias Gram negativas como *Photobacterium halotolerans* S2753 (Wietz y col., 2010) y *Yersinia ruckeri* (Qin y col., 2013b), productores de holomicina.

La holomicina, que presenta color amarillo, se caracteriza por presentar un grupo acetilo en el grupo amino del cromóforo y un hidrógeno en el nitrógeno presente en el heterociclo (figura 1.14, A) (Liras, 2014). Descubierta en *S. griseus* (Ettlinger y col., 1959), su producción se observó posteriormente en *Streptomyces* sp. P6621 (Okamura y col., 1977). La producción de holomicina de la cepa silvestre *S. clavuligerus* ATCC 27064 en medio SA no es detectable, probablemente debido a que la biosíntesis de este compuesto se ve fuertemente afectada por el nivel redox de las células (Liras, 2014). La primera cepa de *S. clavuligerus* productora de holomicina fue un mutante no caracterizado denominado IT1 obtenido por irradiación UV de esporas (Kenig y Reading, 1979). Posteriormente, en nuestro laboratorio se obtuvieron cepas productoras mejor caracterizadas, tales como los mutantes de *S. clavuligerus* interrumpidos en genes tardíos de la agrupación del ácido clavulánico (*car*, *cyp* y *orf12*) (Pérez-Redondo y col., 1998; Mellado y col., 2002), reguladores específicos de ruta (*ccaR* y *clar*) (Pérez-Llarena y col., 1997a; Pérez-Redondo y col., 1998) y de proteínas transportadoras (*oppA2*) (de la Fuente y col., 2002; Lorenzana y col.,

2004). Este último mutante fue uno de los primeros casos descritos de activación de una agrupación génica de antibióticos que estaba silenciada. En los mutantes en *ccaR*, *claR*, *car* y *orf12* se observó que producían holomicina a niveles medios o altos, pero los mayores productores de holomicina son las cepas interrumpidas en *cyp* y *oppA2* (de la Fuente y col., 2002; Lorenzana y col., 2004) que codifican una monooxigenasa P450 y una proteína periplásmica de transporte de oligopéptidos, ambas esenciales para la biosíntesis de ácido clavulánico, pero de función desconocida. Este metabolito tiene un amplio espectro de acción frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, inhibiendo la actividad de la ARN polimerasa a nivel de elongación de la cadena de ARN, pero no actúa frente a microorganismos eucariotas como *Saccharomyces cerevisiae* (Oliva y col., 2001). Además, presenta citotoxicidad frente a varias líneas celulares tumorales de mamífero (Webster y col., 2000; Li y col., 2007).

1.2.3.1. Ruta biosintética y agrupación de la holomicina

La ruta biosintética de holomicina propuesta por Li y Walsh (2010) se basa principalmente en análisis *in silico* de los dominios de las enzimas codificadas por los genes de la agrupación y por un número limitado de estudios bioquímicos de algunas enzimas purificadas implicadas en la ruta, como las proteínas HlmE y HlmI.

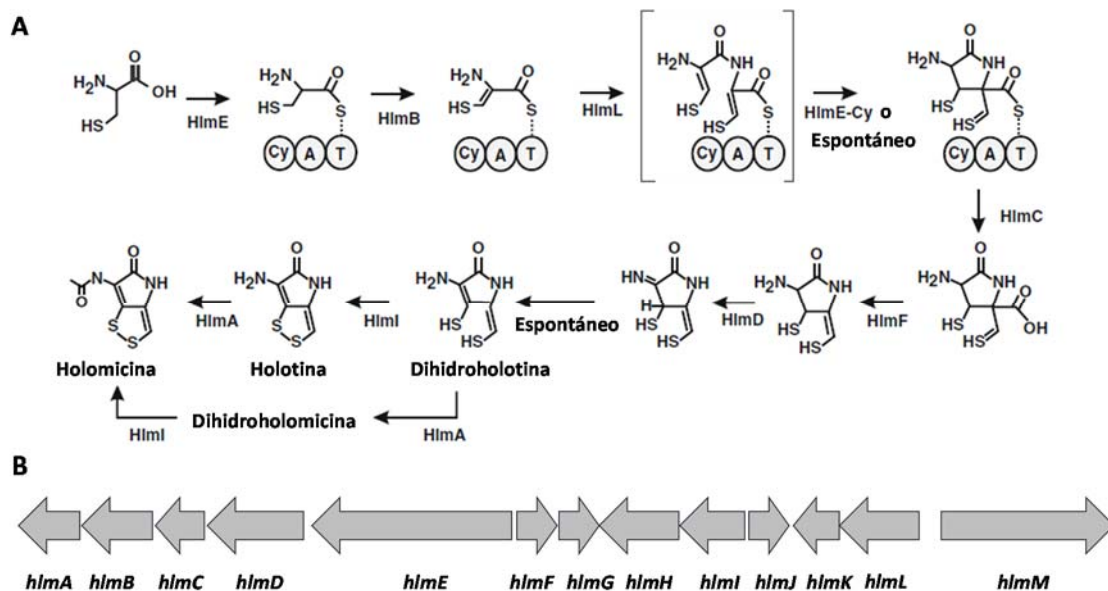


Figura 1.14. Ruta biosintética propuesta (A) y agrupación génica (B) de holomicina en *S. clavuligerus*. (Modificado de Liras, 2013).

La biosíntesis comienza con la unión de la L-cisteína, precursor de la holomicina, por el dominio T de la NRPS codificada por *hlmE* y su activación mediante adenilación a L-cys-AMP por el dominio A (figura 1.14, A). La ausencia de un segundo dominio de activación de aminoácidos para la segunda cisteína requerida para la formación de holomicina sugiere que HlmE puede ser una enzima iterativa, es decir, se mantiene unida al precursor activado mientras otras enzimas de la ruta ejercen su actividad catalítica sobre este. El precursor es modificado secuencialmente por: 1) la acil-CoA deshidrogenasa codificada por *hlmB*, que elimina dos hidrógenos de la molécula de cisteína y 2) el dominio de condensación autónomo HlmL, que une una segunda cisteína. Unidas las dos cisteínas modificadas se produce la ciclación mediante el dominio Cy de la HlmE (o espontáneamente) que forma el primer anillo de la holomicina. El dipéptido L-cys-L-cys, probablemente liberado desde el intermediario dipeptidil-HlmE, ha sido detectado en solución durante ensayos con HlmE (Li y Walsh, 2010). Se ha propuesto que la tioesterasa codificada por *hlmC* libera el dipéptido modificado de la enzima HlmE. El dipéptido liberado podría ser descarboxilado por HlmF, una flavoproteína con actividad oxidorreductasa que pertenece a la subfamilia de flavoenzimas capaces de realizar descarboxilaciones. El intermediario descarboxilado es reducido por la oxidorreductasa HlmD y espontáneamente modificado a la holotina reducida (denominada también dihidroholotina) (Li y Walsh, 2010).

En las etapas tardías de la ruta se obtiene la holomicina a partir de dihidroholotina, mediante dos actividades enzimáticas, HlmA y HlmI, que pueden actuar en distinto orden (figura 1.14, A). La tiorredoxina oxidorreductasa, codificada por *hlmI*, emplea como sustratos la dihidroholotina o la dihidroholomicina. Esta enzima ha sido purificada como proteína recombinante, requiriendo en su actividad catalítica el cofactor FAD_{red} y O_2 , dado que solamente es activa en condiciones aerobias. La acción de HlmI resulta en el cierre del segundo anillo del cromóforo ditiolopirrolona. La delección de *hlmI* anula la producción de holomicina y el mutante es sensible a holomicina (Li y Walsh, 2010; Huang y col., 2011). Finalmente, la actividad acetil transferasa (holomicina sintasa) codificada por *hlmA* da lugar a la conversión irreversible de la holotina a holomicina en presencia de acetil-CoA (de la Fuente y col., 2002). Esta actividad fue medida por de la Fuente y colaboradores (2002) en extractos de células dializadas, donde la actividad específica era proporcional al nivel de holomicina producido por los mutantes en los genes *ccaR*, *claR*, *car*, *cyp* y *orf15* de la biosíntesis de ácido clavulánico de *S. clavuligerus*.

La agrupación génica de biosíntesis de la holomicina en *S. clavuligerus*, se localiza en el cromosoma y comprende unas 17,6 kb (Li y Walsh, 2010; Qin y col., 2013a). Dicha agrupación

está formada por *hlmE*, gen que codifica la NRPS (del inglés, *non-ribosomal peptide synthetase*) con tres dominios para ciclación (Cy), adenilación (A) y tiolación (T), dos genes para tioesterasas autónomas (*hlmC* y *hlmK*) y un gen con un dominio de condensación autónomo (*hlmL*). Otros genes implicados en la biosíntesis codifican una proteína de tipo globina (*hlmG*) y una deshidrogenasa acil-CoA (*hlmB*), tres oxidoreductasas dependientes de flavina (*hlmI*, *hlmD*, *hlmF*) y un gen para una acetiltransferasa (*hlmA*). Además, dos genes codifican proteínas reguladoras (*hlmJ*, *hlmM*) y *hlmH* codifica un transportador MFS (Qin y col., 2013a; Liras, 2014). El análisis *in silico* y el estudio funcional de algunos de estos genes (Li y Walsh, 2010) junto con la expresión heteróloga en la cepa no productora de holomicina *S. coelicolor* M1154 (Robles-Reglero y col., 2013) confirman este grupo de genes como la agrupación biosintética de holomicina.

1.2.3.2. Regulación de la biosíntesis de la holomicina

La agrupación génica de la holomicina presenta dos genes que codifican proteínas reguladoras, el gen *hlmM*, que codifica un regulador de tipo LuxR, y *hlmJ* (figura 1.14, B). La inexistencia de mutantes delecionados en estos genes impide asignarles una determinada función reguladora (Liras, 2014). Sin embargo, la regulación de la producción de holomicina en *S. clavuligerus* parece ser mucho más compleja.

Los estudios transcripcionales mediante micromatrices de *S. clavuligerus oppA2::aph* y *S. clavuligerus ΔccaR::tsr* mostraron una mayor expresión de algunos de los genes biosintéticos de la agrupación de holomicina (*hlmA*, *hlmB*, *hlmC*, *hlmD*, *hlmF*, *hlmG* o *hlmI*) en comparación con la cepa parental (Álvarez-Álvarez y col., 2014a, b). El análisis proteómico de esos mismos mutantes confirmó que las proteínas HlmD, HlmF y HlmG están ausentes en la cepa parental (Robles-Reglero y col., 2013). La hipótesis sugerida para estas cepas que superproducían un metabolito pero subproducían el otro fue una regulación cruzada de la ruta de biosíntesis de clavulánico y holomicina en la bacteria (de la Fuente y col., 2002; Li y col., 2014).

Se han identificado otros genes cuya expresión modula la producción de holomicina. Así, el gen *rhIA* codifica una proteína de tipo rodanesa con actividad tiosulfato sulfurotransferasa que se encuentra sobrerrepresentada en el proteoma de la cepa superproductora *S. clavuligerus oppA2::aph*. El análisis funcional del doble mutante, interrumpido en *oppA2* y delecionado en *rhIA*, mostró una drástica reducción de los niveles de producción de holomicina, sugiriendo el

papel de RhlA en la formación de cisteína como precursor, poseedor de azufre en su estructura (Nárdiz y col., 2011).

Los genes SCLAV_3382 y SCLAV_3383 en *S. clavuligerus*, que codifican proteínas similares a los activadores de biosíntesis de antibióticos AfsR y AfsS de *S. coelicolor*, parecen regular la producción de holomicina y ácido clavulánico dado que la introducción de una copia adicional de dichos genes (operón *afsRS_{cla}*) en la cepa silvestre de *S. clavuligerus* activó la producción de holomicina, silenciada en condiciones normales, y aumentó la biosíntesis de ácido clavulánico hasta cinco veces en el mutante comparado con la cepa parental (Chen y col., 2012).

Recientemente, Charusanti y col. (2012) han obtenido cepas de *S. clavuligerus* de alta producción de holomicina por evolución adaptativa frente a *Staphylococcus aureus* N315 meticilina resistente. El análisis por PCR de genes internos del megaplásmido de 1,8 Mb pSCL4, así como por secuenciación completa del mismo, permitió confirmar que la cepa productora de holomicina había perdido el megaplásmido pSCL4, como ya anticipaba Kirby (1978) al afirmar que un elemento genético extracromosomal inestable afectaba a la producción de holomicina en *S. clavuligerus*. Estudios adicionales de *S. clavuligerus oppA2::aph* en nuestro laboratorio han demostrado que esta cepa tiene un bajo número de copias de los plásmidos pSCL4, pSCL2 y pSCL1 (Álvarez-Álvarez y col., 2014a). Por ello, se obtuvieron tres mutantes de *S. clavuligerus: oppA2* con una dotación normal de los tres plásmidos, *oppA2* completamente desprovisto de los tres plásmidos por regeneración de protoplastos y *S. clavuligerus pSCL4⁻* y se demostró que la mutación *oppA2* no es esencial para la producción de holomicina (Álvarez-Álvarez y col., 2014). La producción de holomicina es estimulada por la mutación en *oppA2* pero especialmente por la pérdida del plásmido pSCL4 (3 veces mayor) en las cepas con un gen *oppA2* funcional. Por lo tanto, la pérdida de *oppA2* y la del pSCL4 cooperan en la superproducción de holomicina en cepas de alta producción. Probablemente, todas las cepas superproductoras de holomicina obtenidas por diferentes grupos de investigación presenten un bajo número de copias de pSCL4, un plásmido que podría llevar genes para un represor de la biosíntesis de holomicina. El número de copias de plásmidos lineales en *S. clavuligerus* debería ser comprobado en todas las cepas, ya que estos plásmidos podrían haberse perdido tras el tratamiento con UV, subcultivo o mantenimiento de las cepas en condiciones de alto estrés, con la consecuente engañosa interpretación de los resultados obtenidos.

1.2.4. Otros metabolitos secundarios: el potencial de *S. clavuligerus*

Como se ha comentado anteriormente, *S. clavuligerus* dispone en su genoma de agrupaciones génicas para la biosíntesis de metabolitos secundarios recientemente descritas en esta especie: tunicamicina, naringenina, policétidos, péptidos no ribosomales, híbridos de policétidos y péptidos no ribosomales, lantibióticos, terpenos y sideróforos.

1.2.4.1. Tunicamicina

La agrupación biosintética de la tunicamicina, un antibiótico de tipo nucleósido y potente inhibidor de la translocasa I, enzima que participa en la síntesis del peptidoglicano, ha sido caracterizada en *Streptomyces chartreusis* (Chen y col., 2010). Dada la detección anterior de este metabolito en *S. clavuligerus* (Kenig y Reading, 1979), se identificó en esta especie una posible agrupación génica para su producción por homología con la descrita en *S. chartreusis* (Chen y col., 2010; figura 1.15). En la estructura de la tunicamicina se diferencian: un uracilo, N-acetilglucosamina, un azúcar 2-aminodialdosa de 11 átomos de carbono (tunicamina) y una cadena N-acilo de longitud variable. Por tanto, según la cadena lateral, este compuesto puede presentar diferentes variantes químicas, que hasta el momento comprenden desde la tunicamicina I hasta la X (figura 1.15; Tsvetanova y col., 2002; Price y Tsvetanova, 2007).

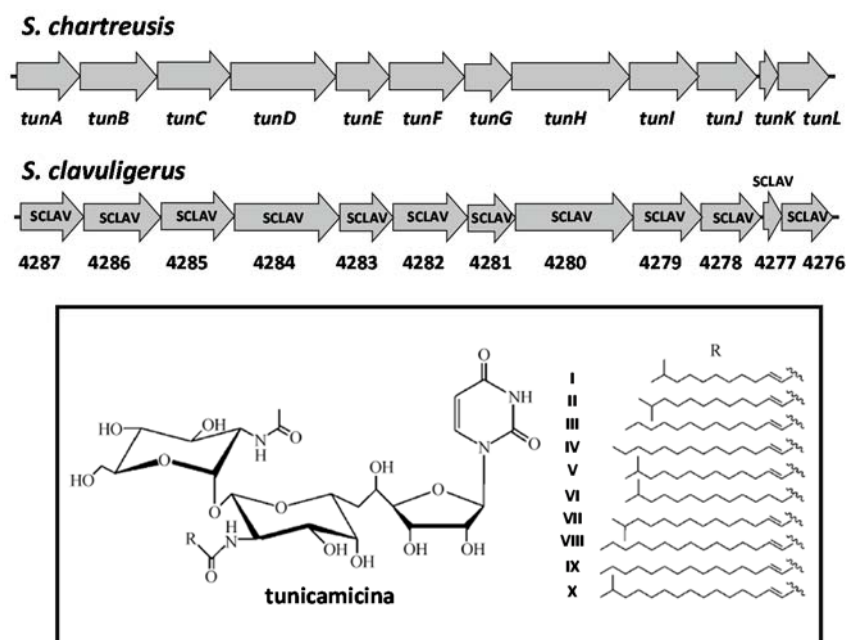


Figura 1.15. Agrupación génica para la biosíntesis de tunicamicina en *S. chartreusis* y en *S. clavuligerus*. En la parte inferior de la figura se indican la estructura química de las tunicamicinas. (Modificado de Chen y col., 2010).

1.2.4.2. Naringenina

Álvarez-Álvarez y col. (2015) han identificado recientemente tres genes implicados en la biosíntesis de naringenina (figura 1.16), un flavonoide descrito como antioxidante, antiinflamatorio y antitumoral (Jagetia y col., 2007; Cavia-Saiz y col., 2010). Estos genes codifican una chalcona sintasa (SCLAV_5492, *ncs*), un citocromo P450 (SCLAV_5491, *ncyP*) y una histidina amonio liasa (SCLAV_5457, *tal*). Los dos primeros se localizan en la agrupación SMC20 descrita por Medema y col. (2010). La naringenina es un flavonoide típicamente vegetal y cuya producción en un organismo procariota ha sido descrita por primera vez en *S. clavuligerus* (Álvarez-Álvarez y col., 2015). Según proponen Álvarez-Álvarez y col. (2015), en *S. clavuligerus* la tirosina amonio liasa, Tal, transforma la tirosina en ácido p-cumárico; este se activa como 4-cumaroil-CoA y condensa con tres unidades malonil-CoA a través de la chalcona sintasa Ncs; y finalmente, la ciclación de la chalcona mediante el citocromo P450 NcyP y una liasa isomerasa produce naringenina. La producción de naringenina en *S. clavuligerus* es superior en medio TSB, un medio complejo de origen vegetal, con respecto a en medio definido SA (Álvarez-Álvarez y col., 2015).

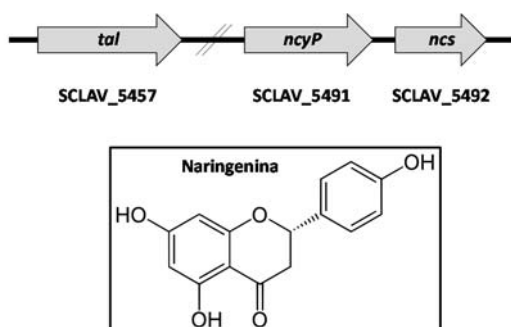


Figura 1.16. Organización de los genes *ncs*, *ncyP* y *tal* en el genoma de *S. clavuligerus*. En la parte inferior de la imagen se indica la estructura de la naringenina. (Modificado de Álvarez-Álvarez y col., 2015).

1.2.4.3. Policétidos

En *S. clavuligerus*, se han identificado ocho agrupaciones génicas, cuatro cromosómicas y cuatro localizadas en el megaplásmido pSCL4, presumiblemente implicadas en la biosíntesis de policétidos y que disponen de PKSs de tipo I, II o III, así como PKSs de tipo enedina (tabla 1.3). Además, una de estas agrupaciones génicas, SMC1, localizada en el extremo final de uno de los brazos del cromosoma, podría estar implicada en la biosíntesis de un policétido macrólido similar al tacrolimus, presentando cinco PKSs que constituyen un total de once módulos (Medema y col., 2010).

Los policétidos (PK, del inglés *polyketide*) constituyen una de las familias más extensa y variada de metabolitos secundarios y son producidos por bacterias, plantas, hongos, protistas e incluso animales, pero no por arqueas (Rawlings, 1997). Estos compuestos naturales presentan un amplísimo rango de actividades biológicas: antibacterianos, anticolesterolémicos, antifúngicos, antitumorales, inmunosupresores, insecticidas, antiparasitarios, entre otros (Shen, 2003; Hopwood, 2007). A pesar de la gran diversidad en la estructura química de esta familia de compuestos, presentan un patrón común de biosíntesis mediante la condensación sucesiva de unidades acil-CoA de cadena corta realizada por parte de enzimas denominadas policétido sintetasas (PKS, del inglés *polyketide synthase*).

1.2.4.3.1. Diversidad química de policétidos

Atendiendo a su estructura química, los policétidos pueden clasificarse en tres grupos principales: los policétidos aromáticos, los policétidos macrocíclicos, también denominados macrólidos, y los policétidos poliéteres.

Los policétidos aromáticos son aquellos que presentan un anillo aromático en su estructura. Generalmente son sintetizados por PKSs de tipo II (apartado 1.2.4.3.3), empleando normalmente como unidad iniciadora y en los sucesivos ciclos de extensión malonil-CoA, aunque otros sustratos, como acetil-CoA, propionil-CoA o isobutiril-CoA, también son posibles, especialmente en la unidad iniciadora (Das y Khosla, 2009). Las funciones biológicas de este tipo de policétidos son muy variadas. Entre ellos se encuentran las tetraciclinas, potentes antibacterianos, y la daunorrubicina, que constituye el andamiaje de la familia de los agentes antitumorales antraciclinas.

Los policétidos macrocíclicos son sintetizados por PKSs de tipo I (apartado 1.2.4.3.3) y químicamente están constituidos por uno o varios anillos grandes cerrados por enlace de tipo lactona, que pueden sufrir diversas modificaciones químicas tras la síntesis de la cadena policetídica. Dentro de ellos, se distinguen dos subgrupos: los macrólidos poliénicos, cuyas características estructurales se detallan a continuación en el presente apartado y caracterizados por la presencia en su anillo de tres a ocho dobles enlaces conjugados, y por otro lado los macrólidos no poliénicos, también llamados simplemente macrólidos, con un anillo de 12 a 16 átomos de carbono, sin dobles enlaces conjugados pero con hidroxilaciones y metilaciones, y al menos un residuo glicosídico (Mazzei y col., 1993; Nedal y Zotchev, 2004). Los macrólidos poliénicos presentan actividad antifúngica, mientras que los no poliénicos son potentes

antibacterianos. Entre los macrólidos poliénicos se encuentran la pimaricina, la filipina y la anfotericina B. El ejemplo más conocido de macrólidos no poliénicos es la eritromicina, un antibiótico de amplio espectro.

Por último, los policétidos poliéteres son moléculas lineales formadas por la condensación de unidades metilmalonato o etilmilmalonato y que contienen en su estructura numerosos ciclos de pequeño tamaño cerrados por enlaces de tipo éter. Estos compuestos son sintetizados también por PKSs de tipo I (Leadlay y col., 2001), si bien posteriormente su esqueleto carbonado es modificado por las enzimas epoxidasa y epóxido hidrolasa para dar lugar al producto final (Liu y col., 2009). Poseen actividad antibacteriana y frente a protozoos parásitos. Las monensinas A y B producidas por *Streptomyces cinnamonensis* se emplean ampliamente en la medicina veterinaria (Butaye y col., 2003; Chapman y col., 2010).

➤ Características estructurales de los macrólidos poliénicos

Los macrólidos poliénicos, también llamados simplemente polienos, constituyen un amplio grupo de agentes antifúngicos producidos esencialmente por *Streptomyces spp.* (Martín, 1977b) a través de la actividad de PKSs de tipo I. Estos compuestos están constituidos por un anillo macrocíclico hidroxilado de 20 a 44 átomos de carbono, ciclado por la formación de un enlace lactona, y que se caracteriza por la presencia de un sistema de entre tres y ocho dobles enlaces conjugados. Este cromóforo confiere al polieno muchas de sus propiedades esenciales tales como sus espectros de absorción característicos en el ultravioleta, fotolabilidad y baja solubilidad en agua (Martín y Aparicio, 2009). Los polienos tienen un carácter marcadamente anfipático, en el que el sistema de dobles enlaces conjugados, rígido y plano, constituye la región hidrofóbica de la molécula, mientras que la región hidroxilada del anillo, polar y flexible, junto con el azúcar, conforman la región hidrófila del compuesto (Martín y Aparicio, 2009).

Los polienos se clasifican como trienos, tetraenos, pentaenos, y así sucesivamente, en función del número de dobles enlaces presentes en su cromóforo. Además, el anillo macrocíclico suele llevar unido un azúcar, si bien en algunos casos no existen azúcares, y en otros existen dos. Este azúcar es en la mayoría de las ocasiones micosamina, un aminoazúcar procedente de la manosa (Nedal y Zotchev, 2004; Nedal y col., 2007), que en la naturaleza aparece exclusivamente asociado a este tipo de compuestos (Aparicio y col., 2004). Adicionalmente, los polienos presentan dentro de su anillo macrolactona (llamado aglicón) un anillo secundario de tipo hemicetal, compuesto por seis miembros y que se forma de manera espontánea entre un

grupo cetónico y uno hidroxilo que quedan adecuadamente orientados en la molécula (Martín y Aparicio, 2009). Otras modificaciones de la molécula producidas con posterioridad a la síntesis de la cadena policetídica, esencialmente ejecutados por citocromos P450, pueden ser también características de cada polieno en particular, como la muy habitual adición de un grupo carboxilo exocíclico mediante la oxidación de un radical metilo (Aparicio y col., 2004). La estructura de algunos de estos compuestos se muestra en la figura 1.17.

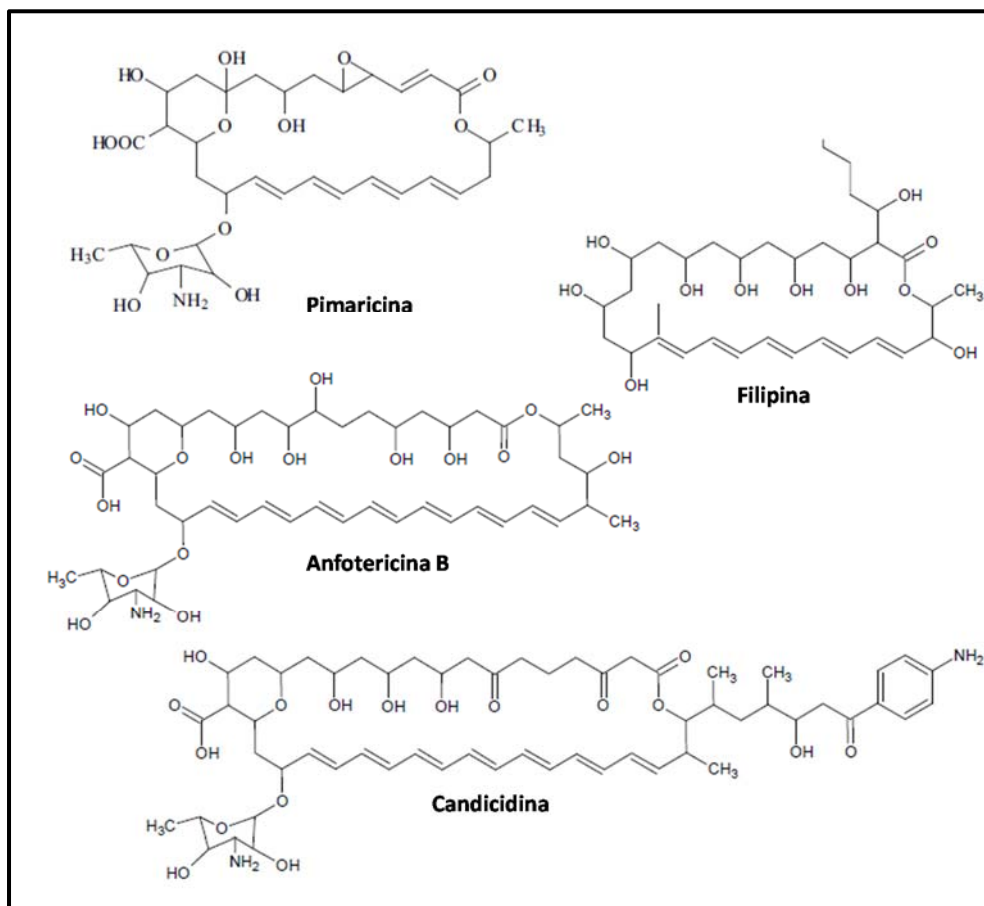


Figura 1.17. Estructura de algunos macrólidos poliénicos glicosilados (pimaricina, anfotericina B, candicidina) y no glicosilados (filipina).

Los numerosos intentos para obtener derivados semisintéticos de los polienos modificando sus agrupaciones biosintéticas mediante ingeniería genética han puesto de manifiesto diversos factores estructurales que afectan de manera relevante a la actividad antifúngica de estos compuestos (Brautaset y col., 2002; Carmody y col., 2005).

1.2.4.3.2. Biosíntesis de los policétidos: mecanismo de las PKSs

Pese a la diversidad estructural de los policétidos, su esqueleto carbonado se sintetiza mediante un mecanismo común: la condensación sucesiva de ácidos carboxílicos de cadena corta, procedentes de formas activadas acil-CoA, a la cadena policetídica en crecimiento. Este proceso de condensación descarboxilativa es análogo al de la síntesis de los ácidos grasos.

La enzima clave para la biosíntesis de estos compuestos es la policétido sintasa (PKS). La actividad PKS global está constituida por varias actividades enzimáticas diferentes (Hopwood y Sherman, 1990). De este modo, el núcleo mínimo de la actividad de una PKS está constituido por las actividades aciltransferasa (AT, encargada de la selección de la unidad extendedora en cada paso), cetosintasa (KS, del inglés *β -ketoacil-ACP-synthase*, encargada de catalizar la condensación descarboxilativa de la unidad extendedora con la cadena creciente) y transportadora de grupos acilo (ACP, del inglés *acyl carrier protein*, encargada de portar la cadena policetídica en crecimiento y presentarla al resto de dominios enzimáticos responsables de la formación de la cadena). Además de estas actividades esenciales, pueden darse otras tres accesorias, encargadas de someter a sucesivos grados de reducción al grupo ceto de la última unidad extensora incorporada a la cadena: cetorreductasa (KR, del inglés *ketoreductase*, que lleva a cabo la cetorreducción a hidroxilo), deshidratasa (DH, del inglés *dehydratase*, encargada de la deshidratación a enoilo) y enoilreductasa (EH, del inglés *enoylreductase*, que reduce el enoilo a una función alcano). Por último, una actividad tioesterasa (TE, del inglés *thioesterase*) se encarga de liberar de la ACP la cadena policetídica ya completada tras los sucesivos ciclos de elongación (Hopwood y Sherman, 1990). La organización y arquitectura de las proteínas que portan estas actividades enzimáticas es la base de la clasificación de las PKSs (apartado 1.2.4.3.3).

La síntesis de los policétidos (figura 1.18) se inicia con la condensación de una unidad iniciadora (por ejemplo, un acetilo procedente de acetil-CoA), unida mediante un enlace tioéster a un residuo de cisteína del centro activo de la KS, y una unidad extensora (por ejemplo, malonilo, procedente de malonil-CoA), que es transferida a una 4'-fosfopanteteína, el grupo prostético de la ACP, gracias a la AT. El grupo fosfopanteteína funciona como un brazo largo y flexible que transporta la cadena naciente y la presenta a los diferentes centros activos responsables de la conformación final de la cadena. A continuación, la KS cataliza una condensación de Claisen entre la unidad iniciadora y la extensora, produciéndose la consiguiente descarboxilación del malonilo y quedando la nueva cadena de cuatro átomos de

carbono así formada unida a la ACP a través del brazo de fosfopanteteína. El grupo ceto situado en el carbono β de la cadena puede sufrir a continuación una o más de las reducciones sucesivas catalizadas por las actividades KR, DH y ER, de existir las mismas. Al final del ciclo, la cadena completa se transfiere de nuevo a la cisteína de la KS, para ser empleada de nuevo como unidad iniciadora (esta vez de cuatro átomos de carbono) en el siguiente ciclo de elongación de la cadena. La biosíntesis del policétido continúa con la repetición de este ciclo de reacciones hasta que la cadena alcanza su tamaño final y es, entonces, liberada por la acción de la TE.

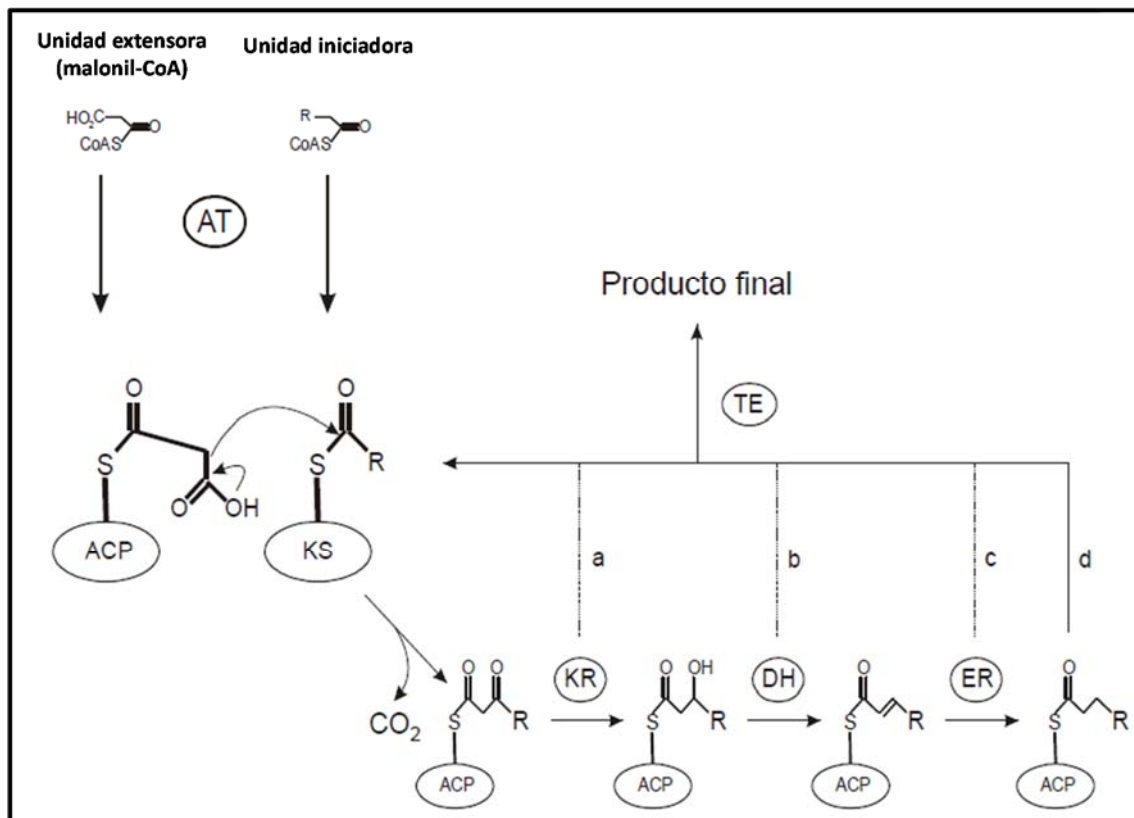


Figura 1.18. Esquema de la biosíntesis de policétidos y ácidos grasos. En el caso de los ácidos grasos, la reducción de cada unidad siempre es completa, llegando al paso «d», mientras que en el de los policétidos puede detenerse en los grados «a», «b» o «c», o alcanzar el máximo grado de reducción al detenerse en «d».

Los ácidos grasos se sintetizan de una manera muy similar a los policétidos, sin embargo, existen algunas diferencias entre la forma de actuación de las PKSs y las sintasas de ácidos grasos (FAS, del inglés *fatty acid synthase*) que hacen de los policétidos un grupo mucho más diverso (Hopwood y Sherman, 1990; Katz y Donadio, 1993):

1) las unidades iniciadoras y las extensoras empleadas por las PKSs pueden ser mucho más diversas que en el caso de las FAS,

2) el grado de reducción del grupo ceto es variable en cada uno de los pasos de extensión (mientras la reducción siempre es total en el caso de la síntesis de ácidos grasos), originándose diferentes grupos funcionales (β -ceto, β -hidroxilo, enoilo o alcano),

3) en los policétidos aparecen numerosos centros quirales como consecuencia de la estructura de las unidades extensoras y de las reducciones parciales hasta grupo hidroxilo, y

4) la estructura primaria del policétido suele ser completada con ciclaciones, plegamientos y otras modificaciones.

Además, una vez la cadena policetídica se suelta de la ACP por acción de la TE, puede ser objeto de diversas funcionalizaciones que llevan a cabo otras enzimas relacionadas con la biosíntesis de cada metabolito secundario en particular, como son las transferasas de grupos metilo, glicosilo y amino, entre otros, y los citocromos P450, los cuales se encuentran entre las enzimas oxidativas más frecuentes en este tipo de agrupaciones génicas (Sasaki y col., 1996).

1.2.4.3.3. Diversidad de las PKSs

Principalmente existen tres tipos de PKSs en función de su organización y del mecanismo mediante el que se van añadiendo las unidades acil-CoA (Shen, 2003):

Las PKSs de tipo I son grandes enzimas multifuncionales en las que las actividades enzimáticas (dominios catalíticos) que conforman la actividad global PKS se encuentran organizadas en módulos (por lo que se denominan también PKSs modulares). Cada módulo contiene al menos el mencionado núcleo mínimo de la PKS necesario para cada ciclo de la elongación (dominios catalíticos AT, KS y ACP). Por otro lado, las actividades de reducción sucesiva (dominios catalíticos KS, DH y ER) pueden o no estar presentes para llevar a cabo uno o más grados de reducción. Cada módulo de las PKSs de tipo I lleva a cabo un ciclo de elongación (y reducción, en su caso) y a continuación traspasa la cadena policetídica en crecimiento al siguiente módulo, en lo que se conoce como colinealidad. De este modo, cada centro activo presente en la enzima multifuncional actúa tan solo una vez sobre la cadena, por lo que se dice de estas PKSs que son no iterativas. Varias de estas proteínas pueden estar implicadas en la síntesis de un mismo policétido, portando cada una de ellas entre uno y seis módulos (Aparicio y col., 2003). La proteína responsable del inicio de la biosíntesis está formada, al menos, por el módulo de carga (módulo 0) encargado de tomar la unidad iniciadora de la ruta biosintética. Las proteínas implicadas en la elongación de la cadena policetídica presentan tamaños variables según el

número de módulos de elongación que posean y tan solo el último módulo de la última proteína lleva asociada la actividad TE (Staunton y col., 1996).

Las PKSs de tipo II (aromáticas o iterativas) presentan una arquitectura diferente. La actividad PKS es llevada a cabo por complejos multienzimáticos, en los que cada actividad catalítica se encuentra representada en una proteína diferente que actúa de forma iterativa en cada paso de elongación de la cadena. En este caso, el núcleo mínimo de las PKSs está representado por tres proteínas: KS_{α} , KS_{β} y ACP. La KS_{α} porta las actividades KS y AT, y KS_{β} es homóloga a la KS_{α} , pero que carece de las actividades KS y AT, estando su función relacionada con el control del número de elongaciones de la cadena que se producen, por lo que se denomina también factor determinante de la elongación (CLF, del inglés *chain length factor*). En este caso, las actividades reductoras accesorias quedan restringidas a la KR, por lo que estos policétidos muestran en general menor grado de reducción que los sintetizados por las PKSs de tipo I, aunque existen otras actividades capaces de modificar la cadena policétídica, como son la aromatasas y la ciclases, principalmente, que hacen posible la aparición de los anillos aromáticos mediante deshidratación y ciclación, respectivamente (Rawlings, 1997; Hertweck y col., 2007).

Por último, las PKSs de tipo III (también llamadas PKSs de tipo chalcona sintasa) son completamente diferentes no solamente desde el punto de vista arquitectónico, sino también en cuanto a su mecanismo de acción: se trata de enzimas homodiméricas de monómeros KS que actúan de manera iterativa empleando directamente como sustrato las unidades acil-CoA, sin necesidad de cargarlas previamente a través de la ACP, de la que carecen. Aunque estas PKSs son esencialmente propias de las plantas, se han encontrado también en *Streptomyces* y otras bacterias (Funa y col., 2005), como es el caso de la naringenina en *S. clavuligerus* (Álvarez-Álvarez y col., 2015), así como en hongos (Seshime y col., 2005). Las chalcona sintasas son las enzimas de este grupo que han sido estudiadas con mayor profundidad dado su papel en la biosíntesis de flavonoides (Abe y Morita, 2010; Álvarez-Álvarez y col., 2015).

Pese a esta clasificación general de tres tipos de PKSs se han descrito numerosas excepciones (Shen, 2003).

1.2.4.4. Péptidos no ribosomales

En *S. clavuligerus*, se han descrito diez agrupaciones génicas probablemente implicadas en la biosíntesis de péptidos no ribosomales y que disponen de una o varias NRPS. Cuatro son

cromosómicas y seis están localizadas en el megaplásmido pSCL4 (tabla 1.3; Medema y col., 2010).

Los péptidos no ribosomales (NRP, del inglés *non-ribosomal peptide*) son una clase de metabolitos secundarios, producidos por bacterias y hongos, constituidos por aminoácidos (entre 2 y 50 residuos) proteinogénicos y no proteinogénicos (Schwarzer y col., 2003). Estos compuestos son sintetizados por sintetetas de péptidos no ribosomales (NRPS, del inglés *non-ribosomal peptide synthetase*), grandes complejos multienzimáticos organizados en módulos. Un módulo es una sección de la NRPS responsable de la incorporación de un aminoácido a la cadena peptídica en formación y está constituido por dominios que representan las unidades enzimáticas que catalizan las etapas individuales de síntesis del péptido no ribosomal. Estos dominios son tres: adenilación, proteína portadora del péptido y condensación. El último módulo presenta también un dominio tioesterasa que lleva a cabo la liberación del péptido sintetizado y a menudo su ciclación. Adicionalmente, pueden darse otros dominios responsables de modificaciones posteriores a la síntesis de la cadena polipeptídica (Singh y col., 2012).

Los NRP abarcan una gran diversidad estructural, debido a su particular proceso de síntesis en el que pueden darse modificaciones químicas de los residuos incorporados tales como la epimerización, metilación, oxidación, reducción, glicosilación, acetilación, halogenación o hidroxilación, e introducción de productos de otras rutas biosintéticas tales como lípidos o carbohidratos. En ocasiones, se llevan a cabo deshidrataciones sobre los residuos de serina, produciendo dehidroalantoína. Además, la estructura primaria puede ser lineal, ramificada, total o parcialmente cíclica o, incluso, policíclica. A menudo, los péptidos no ribosomales son dímeros o trímeros de idéntica secuencia encadenados o ciclados, o incluso ramificados (Singh y col., 2012).

Los péptidos no ribosomales son una familia muy diversa de productos naturales con un rango de actividades biológicas y farmacológicas extremadamente amplio. Pueden funcionar como antibióticos (penicilina, vancomicina, daptomicina), toxinas (coronatina), sideróforos (enterobactina, vibriobactina), inmunosupresores (ciclosporina A) o pigmentos (indigoína) (Fischbach y Walsh, 2006).

En *S. clavuligerus*, se han identificado también seis agrupaciones génicas que disponen tanto de NRPS, como de PKSs o híbridos PKS-NRPS. Dos son cromosómicas y cuatro están localizadas en el megaplásmido pSCL4 (tabla 1.3; Medema y col., 2010).

Existen similitudes entre las poliketido sintetas y las sintetetas de péptidos no ribosomales a nivel arquitectónico y funcional, ya que ambas son grandes enzimas organizadas en módulos con dominios específicos de condensación, adenilación y carga del ácido carboxílico de cadena corta y el aminoácido, respectivamente (Fischbach y Walsh, 2006). Por ello, muchos metabolitos secundarios son sintetizados por la acción combinada de ambos tipos de proteínas multifuncionales, NRPS y PKSs de tipo I, originando compuestos derivados de aminoácidos y ácidos carboxílicos de cadena corta.

1.2.4.5. Lantibióticos

En *S. clavuligerus*, se han descrito dos agrupaciones génicas presumiblemente implicadas en la biosíntesis de lantibióticos (SMC8 y SMC12; tabla 1.3; Medema y col., 2010).

Los lantibióticos son péptidos cortos codificados por un gen estructural genéricamente denominado *lanA*, sintetizados por ribosomas y modificados postraduccionalmente. *lanA* se localiza en agrupaciones biosintéticas que disponen de genes para la introducción de aminoácidos raros, la exportación, la regulación y la resistencia, y codifica un péptido precursor denominado prepéptido. El prepéptido consta de un péptido líder de hasta 59 aminoácidos en su extremo N-terminal y un propéptido (entre 19 y 34 aminoácidos aproximadamente) en su extremo C-terminal que es modificado para convertirse en el lantibiótico maduro. Las modificaciones son llevadas a cabo bien por una enzima, LanM, con actividad ciclasa en su extremo carboxilo y deshidratasa en el amino, o alternativamente por la combinación de dos enzimas, LanB (deshidratasa) y LanC (ciclasa), que introducen los enlaces tioéter (Bierbaum y Sahl, 2009).

Los lantibióticos presentan aminoácidos no proteínogénicos raros como la lantionina y la β -metil-lantionina, constituidos por dos residuos de alanina, el primero, y un residuo de alanina y otro de ácido aminobutírico, el segundo, en ambos casos unidos en su carbono beta por un enlace tioéter, y la didehidroalanina y didehidrobutirina, obtenidos tras la deshidratación de un residuo de serina o treonina, respectivamente. Estos compuestos se caracterizan por presentar puentes lantionina, esto es, enlaces tioéter internos que se establecen entre los aminoácidos que constituyen el péptido maduro (Bierbaum y Sahl, 2009).

Tras las modificaciones, el péptido maduro es exportado por el transportador LanT. Para la actividad biológica del péptido la secuencia líder ha de ser eliminada, lo cual ocurre generalmente de forma simultánea a la exportación. En otros casos, una proteasa extracelular

LanP codificada en la misma agrupación u otras proteasas del organismo llevan a cabo el procesamiento. Los genes *lanR* y *lanK* suelen constituir un sistema regulador de dos componentes que induce la biosíntesis del lantibiótico o la expresión de la resistencia por los llamados genes de inmunidad. El gen *lanI* codifica un péptido o proteína que está presente en la envuelta celular de la cepa productora y, junto con los transportadores ABC codificados por *lanFEG*, participan en la protección de la célula (McAuliffe y col., 2001; Bierbaum y Sahl, 2009).

Los lantibióticos son lantipéptidos producidos principalmente por y frente a bacterias Gram positivas (Bierbaum y Sahl, 2009), sin embargo, algunos lantipéptidos como SapB de *S. coelicolor* o AmfS *S. griseus*, que constituyen péptidos surfactantes implicados en el desarrollo del micelio aéreo en *Streptomyces*, no parecen presentar actividad antibiótica (apartado 1.1.3.1; Flärdh y Buttner, 2009). El primer lantibiótico descrito fue la nisina, aislada de *Lactococcus lactis* y empleada como conservante alimentario en muchos países, y el segundo la subtilina, de *Bacillus subtilis* (Bierbaum y Sahl, 2009). Entre los producidos por *Streptomyces* se encuentran la cinamina, aislada de *Streptomyces cinnamoneus* y quizás la primera agrupación génica de un lantibiótico que ha sido clonada y secuenciada procedente de una bacteria con alto contenido en G+C (Widdick y col., 2003), la duramicina, producida también por este último, y la ancovenina, un inhibidor enzimático aislado de *Streptomyces* sp. A647P-2 (Wakamiya y col., 1985).

2. Objetivos

S. clavuligerus es un microorganismo de uso industrial conocido por ser productor de ácido clavulánico y cefamicina C, dos compuestos de tipo β -lactámico cuyas biosíntesis comparten mecanismos comunes de regulación. A partir de la secuenciación del genoma de *S. clavuligerus* se ha descubierto que esta bacteria posee un megaplásmido de 1,8 Mb, hecho poco frecuente entre los *Streptomyces*, prescindible para su viabilidad. La información contenida en la secuencia del megaplásmido, pSCL4, y del cromosoma revela que ambos constituyen un reservorio de genes para la biosíntesis de compuestos bioactivos aún desconocidos. Sin embargo, para poner en valor el potencial de *S. clavuligerus* en la producción de metabolitos secundarios aún no caracterizados, es necesario profundizar en la regulación del metabolismo secundario, por lo que se plantearon los siguientes objetivos:

1. Expresión heteróloga de la agrupación biosintética de la cefamicina C de *S. clavuligerus* ATCC 27064 en otros *Streptomyces*.
2. Análisis del efecto del regulador específico de ruta ClaR en el mutante *S. clavuligerus* $\Delta claR::aac$.
3. Efecto de la eliminación del megaplásmido pSCL4 en el metabolismo secundario de *S. clavuligerus*.
4. Estudio del efecto de la expresión heteróloga del regulador PimM de *S. natalensis* en el metabolismo secundario de *S. clavuligerus*.

3. Materiales y métodos

3.1. Microorganismos utilizados

3.1.1. Cepas de *Escherichia coli*

***E. coli* DH5 α** (Hanahan, 1983): cepa empleada habitualmente para la amplificación de ADN plasmídico debido a la alta eficiencia de transformación de sus células competentes (hasta $5 \cdot 10^8$ transformantes/ μg de ADN plasmídico) y su baja tasa de recombinación. Posee una delección en el gen *lacZ* del operón *lac*, lo que permite seleccionar aquellos transformantes portadores de vectores de clonación como pBluescript[®] (Stratagene) que permiten la α -complementación de *lacZ*. Estos transformantes producen una coloración azul en la colonia, originada por la acción de la β -galactosidasa (codificada por *lacZ*) sobre el compuesto X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido), previamente añadido al medio de cultivo. Esta cepa se utiliza para la clonación rutinaria de construcciones génicas. Genotipo: $F^- \text{endA1 gyrA96 hsdR17 recA1 relA1 supE44 thi-1 } (\Phi 80d \text{ lacZ}\Delta M15) \Delta(\text{lacZYA-argF}) \text{ U169 } (r_K^- m_K^+) \lambda^-$.

***E. coli* BW25113/pIJ790** (Datsenko y Wanner, 2000): cepa utilizada en la tecnología ReDirect[®]. El plásmido pIJ790 contiene: 1) la función λ RED (*gam*, *bet*, *exo*) la cual incrementa la tasa de recombinación utilizando ADN lineal y cuyo promotor es inducible por L-arabinosa (*araBp*), 2) el gen de resistencia a cloranfenicol que permite la selección de cepas transformadas con derivados del SuperCos 1, y 3) un origen de replicación termosensible (su replicación cesa a temperaturas superiores a 30 °C). Genotipo del cromosoma: *lacI^q rrnB_{T14} ΔlacZ_{W16} hsdR514 ΔaraBAD_{AH33} ΔrhaBAD_{LD78}*. Genotipo del plásmido: λ -RED (*gam*, *bet*, *exo*) *cat araC repA101^{ts}*.

***E. coli* ET12567/pUZ8002** (MacNeil y col., 1992): cepa donadora de plásmidos en el proceso de conjugación intergenérica con el género *Streptomyces*. Carece de un sistema de metilación funcional (*dam*⁻, *dcm*⁻, *hsd*⁻) por lo que el material genético que se transfiere no está 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 (Paget y col., 1999a) contiene los genes necesarios 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 del cromosoma: *dam-13::Tn9 dcm-6 hsdM hsdR recF143 zjj-201::Tn10 galk2 galT22 ara14 lacY1 xyl-5 leuB6 thi1 tonA31 rpsL136 hisG4 tsx-78 mtli glnV44 F⁻*. Genotipo del plásmido: *tra neo RP4*.

***E. coli* XL1-Blue** (Bullock y col., 1987): cepa deficiente en recombinación, lo que mantiene 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 las genotecas construidas en SuperCos 1. Genotipo del cromosoma: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI^qZΔM15 Tn10* (Tet^r)].

***E. coli* Ess22-31** (Hu y col., 1984): cepa sensible a los antibióticos β-lactámicos. Microorganismo indicador para la valoración de cefamicina C mediante bioensayo.

3.1.2. Cepas de *Streptomyces*

***S. clavuligerus* ATCC 27064** (NRRL 3585, DSM 738) (Higgins y Kastner, 1971): cepa silvestre aislada de una muestra de suelo de América del sur por un procedimiento selectivo de búsqueda de antibióticos de tipo β-lactámico (Nagarajan y col., 1971) y descrita por Higgins y Kastner en 1971 como productora de cefamicina C. Posteriormente fue descrita como la primera especie de *Streptomyces* productora de ácido clavulánico. Produce también otros compuestos de estructura β-lactama como penicilina N y otras clavamas. Obtenida de la colección americana de cultivos tipo (ATCC).

***S. clavuligerus* pSCL4⁻** (Álvarez-Álvarez y col., 2014a): cepa obtenida a partir de *S. clavuligerus* por eliminación del megaplásmido pSCL4 mediante la delección de los genes *parA* y *parB*, localizados en el propio pSCL4 e implicados la segregación del mismo en el proceso de división celular.

S. clavuligerus* *clAR::aph (Pérez-Redondo, 2000): cepa obtenida a partir de *S. clavuligerus* por transformación de protoplastos donde el gen *clAR* se interrumpe con el casete de kanamicina. Presenta bajo número de copias de los plásmidos pSCL2 y pSCL4 (Álvarez-Álvarez R., comunicación personal; presente trabajo) por lo que ha sido red denominada ***S. clavuligerus* *clAR::aph* pSCL^{low}**. Resistente a kanamicina.

S. clavuligerus* *oppA2::aph (Lorenzana y col., 2004): cepa obtenida a partir de *S. clavuligerus* por transformación de protoplastos donde el gen *oppA2* se interrumpe con el casete de kanamicina. Presenta bajo número de copias de los plásmidos pSCL2 y pSCL4 (Álvarez-Álvarez y col., 2014a), por lo que ha sido red denominada ***S. clavuligerus* *oppA2::aph* pSCL^{low}**. Resistente a kanamicina.

S. clavuligerus Δ *cl**aR*::*aac* (Martínez-Burgo y col., 2015): cepa obtenida a partir de *S. clavuligerus* por sustitución del gen *cl**aR* por el casete de apramicina. Resistente a apramicina.

S. clavuligerus Δ *cl**aR*::*aac* [*pMS83-cl**aR*] (Martínez-Burgo y col., 2015): cepa obtenida a partir de *S. clavuligerus* Δ *cl**aR*::*aac* por integración de la construcción *pMS83-cl**aR*. Resistente a apramicina e higromicina.

S. clavuligerus Δ *cl**aR*::*aac* [*pMS83*] (Martínez-Burgo y col., 2015): cepa obtenida a partir de *S. clavuligerus* Δ *cl**aR*::*aac* por integración de *pMS83*. Resistente a apramicina e higromicina.

S. clavuligerus::*pIB139* (presente trabajo): cepa obtenida a partir de *S. clavuligerus* por integración de *pIB139*. Resistente a apramicina.

S. clavuligerus::*pimM* (presente trabajo): cepa obtenida a partir de *S. clavuligerus* por integración de la construcción *pCPpimM*, derivada de *pIB139*. Resistente a apramicina.

S. flavogriseus ATCC 33331 (Shirling y Gottlieb, 1969): cepa silvestre y filogenéticamente próxima a *S. clavuligerus*. Obtenida de la colección alemana de cultivos tipo (DSMZ).

S. flavogriseus::[*P_{fur}-ccaR*] (Martínez-Burgo y col., 2014): cepa obtenida a partir de *S. flavogriseus* por integración del gen *ccaR* de *S. clavuligerus* bajo el control del promotor constitutivo del gen *furS*. Resistente a higromicina.

S. flavogriseus::[*SCos-CF*] (Martínez-Burgo y col., 2014): cepa obtenida a partir de *S. flavogriseus* por integración de la agrupación génica de la cefamicina C de *S. clavuligerus*. Resistente a kanamicina.

S. flavogriseus::[*SCos-CF* Δ *ccaR*] (Martínez-Burgo y col., 2014): cepa obtenida a partir de *S. flavogriseus* por integración de la agrupación génica de la cefamicina C de *S. clavuligerus* en la que el gen *ccaR* ha sido sustituido por un casete de resistencia a apramicina. Resistente a kanamicina y apramicina.

S. flavogriseus::[*SCos-CF*]:[*P_{fur}-ccaR*] (Martínez-Burgo y col., 2014): cepa obtenida a partir de *S. flavogriseus* por integración de la agrupación génica de la cefamicina C de *S. clavuligerus* y del gen *ccaR* de *S. clavuligerus* bajo el control del promotor constitutivo del gen *furS*. Resistente a kanamicina e higromicina.

S. coelicolor M1146 (Gomez-Escribano y Bibb, 2011): cepa obtenida a partir de *S. coelicolor* M145, que carece de los plásmidos SCP1 y SCP2 (Kieser y col., 2000), mediante la eliminación de

las agrupaciones génicas de los cuatro principales metabolitos secundarios de *S. coelicolor* M145, esto es, actinorrodina (*act*), undecilprodigiosina (*red*), antibiótico dependiente de calcio (CDA) (*cda*) y coelimidina (*cpk*). Se utiliza para la expresión heteróloga de agrupaciones génicas de metabolitos secundarios. Genotipo: $\Delta act \Delta red \Delta cpk \Delta cda$ SCP1⁻ SCP2⁻.

***S. coelicolor* M1146::[P_{fur}-*ccaR*]** (Martínez-Burgo y col., 2014): cepa obtenida a partir de *S. coelicolor* M1146 por integración del gen *ccaR* de *S. clavuligerus* bajo el control del promotor constitutivo del gen *furS*. Resistente a higromicina.

***S. coelicolor* M1146::[SCos-CF]** (Martínez-Burgo y col., 2014): cepa obtenida a partir de *S. coelicolor* M1146 por integración de la agrupación génica de la cefamicina C de *S. clavuligerus*. Resistente a kanamicina.

***S. coelicolor* M1146::[SCos-CF]::[P_{fur}-*ccaR*]** (Martínez-Burgo y col., 2014): cepa obtenida a partir de *S. coelicolor* M1146 por integración de la agrupación génica de la cefamicina C de *S. clavuligerus* y del gen *ccaR* de *S. clavuligerus* bajo el control del promotor constitutivo del gen *furS*. Resistente a kanamicina e higromicina.

***S. albus* J1074** (Chater y Wilde, 1976; 1980): cepa derivada de *S. albus* G en la que se ha eliminado el sistema de restricción y modificación para evitar la fragmentación del ADN exógeno. Esta cepa permite así la integración en su genoma de ADN para estudios de expresión heteróloga. Genotipo: *ilv-1 sal-2* RM⁻.

***S. albus* J1074::[P_{fur}-*ccaR*]** (Martínez-Burgo y col., 2014): cepa obtenida a partir de *S. albus* J1074 por integración del gen *ccaR* de *S. clavuligerus* bajo el control del promotor constitutivo del gen *furS*. Resistente a higromicina.

***S. albus* J1074::[SCos-CF]** (Martínez-Burgo y col., 2014): cepa obtenida a partir de *S. albus* J1074 por integración de la agrupación génica de la cefamicina C de *S. clavuligerus*. Resistente a kanamicina.

***S. albus* J1074::[SCos-CF]::[P_{fur}-*ccaR*]** (Martínez-Burgo y col., 2014): cepa obtenida a partir de *S. albus* J1074 por integración de la agrupación génica de la cefamicina C de *S. clavuligerus* y del gen *ccaR* de *S. clavuligerus* bajo el control del promotor constitutivo del gen *furS*. Resistente a kanamicina e higromicina.

3.1.3. Otros microorganismos

***Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665** (Reading y Cole, 1977): cepa productora de una β -lactamasa de clase C. Microorganismo indicador para la valoración de ácido clavulánico mediante bioensayo.

***Micrococcus luteus* ATCC 9341** (Kenig y Reading, 1979): cepa sensible a la acción de la holomicina. Microorganismo indicador para la valoración de holomicina mediante bioensayo.

***Candida utilis* CECT 1061** (Minter, 2009): cepa empleada para la detección de compuestos con actividad antifúngica mediante bioensayo.

3.2. Medios de cultivo

El pH de los medios se ajustó con el ácido o la base de la sal presente en la composición del medio, generalmente HCl, NaOH y KOH. En caso de que el medio esté a una temperatura superior a 18-20 °C (ejemplo: medio SA, que se prepara con agua hirviendo), dejar atemperar hasta esta temperatura antes de ajustar el pH. Los medios sólidos se obtuvieron añadiendo 2 % (p/v) de agar, salvo que se indique lo contrario, a la composición particular de cada medio. Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Las soluciones indicadas se esterilizaron por filtración mediante filtros estériles de 0,22 μ m de diámetro de poro (Millipore). Para cada medio, se indica su uso original y/o habitual. Además, en este trabajo, los medios 2xTY, ISP4, ME, MEY, MS, R2YEGm, R5m, SA, TBO y TSB se utilizaron para el análisis de la producción de compuestos con actividad antifúngica en *S. clavuligerus*, y los medios 2xTY, ISP4, ME, MEY, MS, SA, TBO y TSB se destinaron al análisis de la producción heteróloga de cefamicina C en diferentes cepas de *Streptomyces*. A continuación se indican las cantidades necesarias para un litro de medio.

3.2.1. Medios de cultivo para *E. coli*

LB (Miller, 1972): triptona 10 g, extracto de levadura 5 g, NaCl 10 g. El pH se ajusta a 7,5. El medio **LA** se obtiene añadiendo 2 % (p/v) de agar al medio LB.

SOB (Hanahan, 1983) y **SOC** (Sambrook y Rusell, 2001): triptona 20 g, extracto de levadura 5 g, NaCl 0,584 g, KCl 0,186 g. El pH se ajusta a 7. Una vez esterilizado y antes de utilizar el medio se añade 1 ml de solución MgCl₂-MgSO₄ por 100 ml de medio. El medio SOC se obtiene

añadiendo 1ml de glucosa 1 M al SOB por 100 ml de medio. Se utilizan para la obtención de células competentes de alta eficiencia y crecimiento de transformantes, respectivamente.

TB (Tartof y Hobbs, 1987): triptona 12 g, extracto de levadura 24 g, glicerol 4 ml. El volumen se ajusta a 900 ml y se esteriliza en alícuotas de 90 ml. En el momento de su uso se añaden 10 ml de solución KH_2PO_4 0,17 M- K_2HPO_4 0,72 M. Se emplea para el cultivo de transformantes de *E. coli* de los que se desea aislar ADN plasmídico.

3.2.2. Medios de cultivo para *Streptomyces*

ISP4 (Difco™) (Shirling y Gottlieb, 1966): almidón 10 g, K_2HPO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g, NaCl 1 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g, CaCO_3 2 g, agar 20 g. Elementos traza: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mg. El medio es comercial y viene preparado de manera que solo es necesaria la disolución de 37 g de mezcla sólida en 1 litro de agua destilada. El pH queda comprendido en un intervalo de $7,2 \pm 0,2$.

ME (Sánchez y Braña, 1996): MOPS 21 g, glucosa 5 g, extracto de levadura 0,5 g, extracto de carne 0,5 g, NZ amina 1 g. El pH se ajusta a 7. Es un medio optimizado para la esporulación de *S. clavuligerus*.

MEY (Hopwood y col., 1985): maltosa 10 g, extracto de levadura 4 g, CoCl_2 0,01 g. El pH se ajusta a 7.

MS (Hobbs y col., 1989): manitol 20 g en 1 L de agua. Por su insolubilidad se adicionan posteriormente el agar y la harina de soja al 2 %. Debe esterilizarse en el autoclave dos veces. Se utiliza para la conjugación entre *Streptomyces* y *E. coli*.

R2YEGm: es una modificación del medio R2YE (Thompson y col., 1980) donde la glucosa se sustituye por glicerol y se elimina la sacarosa. Contiene: glicerol 10 g, extracto de levadura 5 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10,12 g, K_2SO_4 0,25 g, casaminoácidos 0,1 g, solución elementos traza 2 ml en 800 ml de medio de cultivo. La solución de elementos traza contiene (1 L): ZnCl_2 40 mg; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 200 mg; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mg; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 10 mg; $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 10 mg; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 10 mg. El pH da un valor de 6,3. Repartir en alícuotas de 80 ml con 2 gr de agar y esterilizar. En el momento de uso añadir por botella: KH_2PO_4 0,5 % (p/v) 1 ml; CaCl_2 0,25 M 8 ml; L-Prolina 20 % (p/v) 1,5 ml; TES 5,73 % (p/v) pH 7,2 10 ml; NaOH 1 N 0,5 ml. Es un medio originalmente utilizado en la regeneración de protoplastos en la transformación de *S. clavuligerus*.

R5m: es una modificación del medio R5 (Thompson y col., 1982) donde la sacarosa y la glucosa, se sustituyen por maltosa. Contiene maltosa 10 g, extracto de levadura 5 g, NaCl 17,53 g, K₂SO₄ 0,25 g, MgCl₂·6H₂O 10,12 g, casaminoácidos 0,1 g, TES 5,73 g, solución de elementos traza 2 ml. La solución de elementos traza contiene (1 L): ZnCl₂ 40 mg; FeCl₃·6H₂O 200 mg; CuCl₂·2H₂O 10 mg; MnCl₂·4H₂O 10 mg; Na₂B₄O₇·10H₂O 10 mg; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 10 mg. El pH se ajusta a 7,3. En el momento de uso, se añade a cada 100 ml: 1 ml de KH₂PO₄ 0,5 % (p/v); 0,4 ml de CaCl₂ 5 M; 1,5 ml de L-prolina 20 % (p/v); 0,7 ml de NaOH 1 N. Es un medio de producción de *S. coelicolor*.

SA (modificación de Aharonowitz y Demain, 1978): almidón 10 g, L-asparagina 2 g, MOPS 21 g, MgSO₄·7H₂O 0,6 g, K₂HPO₄ 4,4 g. En primer lugar, hay que disolver lentamente el almidón en agua caliente (a temperatura próxima a su punto de ebullición). Disuelto completamente el almidón, se pueden añadir el resto de componentes. El pH se ajusta a 6,8 con KOH. Tras esterilizar en el autoclave el medio, se añaden 100 µL de la solución de elementos traza por 100 ml de medio: FeSO₄·7H₂O 1 % (p/v); MnCl₂·4H₂O 1 % (p/v); ZnSO₄·7H₂O 1 % (p/v); CaCl₂·3H₂O 1 % (p/v). Es un medio líquido optimizado para la producción de ácido clavulánico en *S. clavuligerus*. En el presente trabajo se ha empleado para cuantificar la producción de ácido clavulánico, cefamicina C y holomicina, además de lo indicado al inicio del apartado 3.2.

TBO (Higgins y col., 1974): pasta de tomate 20 g, copos de avena 20 g, agar 20 g. El pH se ajusta a 6,5. Es un medio de esporulación de *Streptomyces*.

TSB (Sambrook y Rusell, 2001): tripticaseína de soja 30 g. El pH se ajusta a 7,2. Es un medio para el crecimiento rápido de *Streptomyces*. Se utilizó también para el crecimiento de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *M. luteus* empleados en los bioensayos. El medio **TSA** se obtiene añadiendo agar al 2 % (p/v) y se utiliza para el cultivo de *S. clavuligerus* y para preparar las placas de bioensayo.

2xTY (Sambrook y Russell, 2001): triptona 20 g, extracto de levadura 10 g. El pH se ajusta a 7,2 con KOH. Es un medio de crecimiento de *E. coli*, sin embargo, en el presente trabajo se utilizó para germinación de las esporas de *Streptomyces* previa a la conjugación con *E. coli*.

3.2.3. Otros medios

YED (Gil y col., 1985): extracto de levadura 10 g, glucosa 10 g. El pH es 7,5. Se emplea para el crecimiento de *Candida utilis*, en su forma sólida con agar 1 %, en los bioensayos para detectar la actividad antifúngica frente a *C. utilis*.

3.2.4. Antibióticos de los medios de cultivo

Los medios de cultivo descritos fueron suplementados con determinados antibióticos cuando fue necesario. Estos antibióticos fueron preparados como se indica en la tabla 3.1, esterilizados por filtración empleando un filtro con poro de 0,22 µm de diámetro (Millipore), excepto aquellos disueltos en solventes orgánicos o NaOH, que no fueron esterilizados, y se conservaron en solución a -20 °C. La adición de uno o varios antibióticos al medio de cultivo tiene como objetivo la selección de los clones resistentes a los mismos dentro de una población heterogénea, en un proceso de introducción de ADN exógeno, o el mantenimiento de la homogeneidad dentro de una población microbiana ya resistente. Para cada antibiótico, la concentración final de uso tanto en medio sólido como en medio líquido fue la misma (tabla 3.1).

Concentración de la solución	Concentración final	
	<i>Streptomyces</i>	<i>E. coli</i>
Ácido nalidíxico 25 mg/ml en NaOH 0,1 N		25 µg/ml
Ampicilina 200 mg/ml en agua		100 µg/ml
Apramicina 100 mg/ml en agua	50 µg/ml	50 µg/ml
Cloranfenicol 100 mg/ml en etanol	25 µg/ml	
Higromicina 100 mg/ml en agua	50 µg/ml	50 µg/ml
Kanamicina 100 mg/ml en agua	50 µg/ml	50 µg/ml
Tiostreptona 50 mg/ml en DMSO al 100 %		10 µg/ml

Tabla 3.1. Antibióticos utilizados para la selección de las cepas.

3.3. Cultivo y conservación de los microorganismos

3.3.1. Cultivo y medida del crecimiento

Los cultivos microbianos se iniciaron utilizando el método de resiembra o empleando como inóculo viales de cultivos o de esporas congelados en glicerol al 20 %.

En general, *E. coli* se cultivó a 37 °C, pero las cepas Ess22-31 y BW25113/pIJ790 se cultivaron a 30 °C. Los cultivos en medio líquido se realizaron en matraces sin hendiduras en un incubador orbital a 250 rpm.

El cultivo de las cepas indicadoras *K. pneumoniae*, *M. luteus*, *C. utilis* se llevó a cabo a 30 °C y, en medio líquido, se utilizaron matraces sin hendiduras en un incubador orbital a 250 rpm.

Las cepas de *Streptomyces* se cultivaron a 28 °C, en el caso de *S. clavuligerus*, y a 30 °C, en el caso de *S. flavogriseus*, *S. coelicolor* y *S. albus*. En medio líquido, los cultivos se mantuvieron en un incubador orbital a 220 rpm en matraces con hendiduras, para favorecer la dispersión del micelio, grandes para *S. coelicolor*, o pequeñas para el resto de cepas, y con tapones metálicos para asegurar una mejor aireación del cultivo.

El crecimiento de los diferentes microorganismos fue estimado en base a la densidad óptica del cultivo a 600 nm de longitud de onda (DO_{600}), utilizando un espectrofotómetro *Hitachi U-2000*. Se midieron diluciones de la muestra original del cultivo de modo que la medida no sobrepasase el valor de 1,2. Debido a la morfología micelial que presentan las cepas de *Streptomyces*, este tiende a flocular y decantar, por lo que inmediatamente antes de ser cuantificado, el micelio fue resuspendido. Este método fue utilizado para la estimación del crecimiento del preinóculo para establecer las fermentaciones. La evolución del crecimiento de *Streptomyces* a lo largo de cada fermentación se siguió a través de la medida de cantidad de ADN del micelio (apartado 3.9.2).

3.3.2. Conservación de las cepas y obtención de esporas

Las cepas de *E. coli* se conservaron mediante siembra periódica en placa de LA o TSA selladas con *Parafilm*® y a 4 °C. Para una conservación a largo plazo, se mezcló un volumen de cultivo líquido con un volumen de glicerol al 40 % y se conservó a -20 o -80 °C. Este método de conservación a largo plazo fue utilizado también para la preservación de las cepas indicadoras.

Las cepas de *Streptomyces* se conservaron en forma de micelio o de esporas. Para su conservación en forma de micelio, se cultivaron en medio TSB a 220 rpm hasta alcanzar una DO_{600} entre 5 y 9, se mezclaron un volumen de este cultivo con un volumen de glicerol al 40 % y se guardaron a -20 o -80 °C. Las alícuotas para la conservación en forma de micelio fueron de un solo uso.

Las cepas indicadoras utilizadas en los bioensayos se conservaron mezclando un volumen de un cultivo de DO_{600} 1 y un volumen de glicerol al 40% y se guardaron a -20 o -80 °C, excepto *C. utilis* que se conservó como cultivo líquido a 4 °C.

Para la obtención de las esporas de *Streptomyces* se sembró una pequeña cantidad de micelio de 24 horas de crecimiento en medio sólido TSA, en una placa de medio de esporulación ME, en el caso de *S. clavuligerus* y *S. flavogriseus*, o TBO, para las especies *S. coelicolor* y *S. albus*. Transcurridos entre 4 y 14 días, según la especie, se recogieron las esporas frotando la superficie

de la placa suavemente con el asa de siembra y se añadieron a 5 ml de glicerol al 20 % (p/v), en el caso de *S. clavuligerus*. En el caso de las otras tres especies se añadió glicerol al 20 % (p/v) sobre la placa y se raspó suavemente con un bastoncillo de algodón. El tubo con la suspensión esporas-glicerol se sumergió en un baño de ultrasonidos durante 10 minutos para disgregar las esporas del resto del micelio. A continuación, la suspensión se mantuvo en hielo para evitar la germinación de las esporas e, inmediatamente después, se filtró con algodón hidrófilo para separar las esporas de fragmentos de micelio y restos de agar. El filtrado se centrifugó durante 10 minutos a 4500 rpm a 4 °C, se resuspendió en un volumen final de glicerol 20 % (p/v) de entre 50 y 500 µl en función de la concentración de esporas, se repartió en alícuotas de 50 µl y se guardó a -80 °C.

Las esporas de *Streptomyces* se cuantificaron a partir de la suspensión obtenida tras su recolección. El procedimiento consiste en sembrar diluciones seriadas 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} , por lo general, de dicha suspensión en medio TSA suplementado, si es necesario, con los antibióticos adecuados. A partir del número de colonias que aparezcan tras 2-3 días de incubación a la temperatura óptima de crecimiento, se calcula el número de esporas viables (formadoras de colonias) presentes en el tubo concentrado original, que se conserva congelado. Es importante conservar a -80 °C los viales de esporas cuantificadas, ya que a -20 °C la viabilidad de las esporas declina de manera progresiva con el paso del tiempo.

3.4. Vectores plasmídicos

A continuación se describen los vectores plasmídicos utilizados en el presente trabajo, indicándose su nombre, origen o referencia y aplicación.

3.4.1. Plásmidos de *E. coli*

SuperCos 1 (Agilent Technologies; Evans y col., 1989): cósmido de 7,9 kb caracterizado por contener: 1) sitios *cos* que permiten clonar fragmentos de ADN de un tamaño determinado de entre 30 y 42 kb, 2) secuencias promotoras de los bacteriófagos T3 y T7 flanqueando un sitio único de clonación (*BamHI*) que permiten caracterizar los extremos del inserto por secuenciación, 3) secuencias de reconocimiento para llevar a cabo mapas de restricción y 4) sitios únicos de restricción *NotI*, *SacII* y *SfiI* flanqueando el sitio de clonación que permiten extraer el ADN inserto del vector. Dispone además del origen de replicación de pUC y los genes de resistencia a ampicilina y kanamicina.

pUFurReg+ (Ortiz de Orué Lucana y col., 2003): vector de 4 kb derivado del plásmido pWKS12 que contiene el gen *furS* de *Streptomyces reticuli* con su propio promotor. Este gen codifica un autorregulador, en el que se ha sustituido la tirosina en posición 59 por una fenilalanina, de modo que la propia transcripción del regulador, y por tanto, la del gen acoplado a esta nueva versión de *furS*, es constitutiva. Contiguo al gen *furS*, dispone de un fragmento de ADN flanqueado por sitios de restricción *NcoI* y *HindIII* que permiten la subclonación del gen de estudio. Este vector incluye un gen de resistencia a ampicilina para seleccionar las colonias portadoras del plásmido.

3.4.2. Plásmidos con origen de replicación en *Streptomyces*

pIJ774 (Khodakaramian y col., 2006): vector de 4,3 kb derivado de pBluescript II SK(+) que contiene un casete con el gen de resistencia a apramicina y el origen de transferencia *oriT*. Este casete se emplea para delecionar y sustituir el gen de interés mediante la tecnología del ReDirect[®], confiere resistencia a apramicina y permite la introducción del plásmido en *Streptomyces* por conjugación con *E. coli*.

pMS82 y **pMS83** (Gregory y col., 2003): vectores bifuncionales *E.coli-Streptomyces*, de 6,1 y 7 kb, respectivamente, y transferibles mediante conjugación. Se integran en el genoma de *Streptomyces* mediante el reconocimiento del sitio *attP* de integración del fago Φ BT1, que en el genoma de *S. coelicolor* está en SCO4848. Presentan el gen de resistencia a higromicina para la selección de los transformantes de *E. coli* y los exconjugantes de *Streptomyces*.

pFL1272 (Eustáquio y col., 2005): vector de aproximadamente 10 kb derivado del pIJ787. Contiene el gen de la integrasa y el sitio *attP* de integración del fago Φ C31, cuyo punto de integración en el genoma de *S. coelicolor* está en SCO3798, un gen de resistencia a tetraciclina y un origen de transferencia. Estos cuatro elementos génicos constituyen el casete de integración que se obtiene a partir de este plásmido por digestión con la enzima de restricción *XbaI*.

pCPpimM (Santos-Aberturas y col., 2012): vector de 6,6 kb derivado de **pIB139** (Wilkinson y col., 2002) y a su vez del pSET152. Contiene el gen de la integrasa y el sitio *attP* de integración del fago Φ C31, el gen de resistencia a apramicina y el replicón de pUC18. Posee un fragmento de 698 pb con el gen *pimM* y su sitio de unión al ribosoma controlado por el promotor constitutivo *ermE**.

3.5. Métodos relacionados con la manipulación y análisis de ADN

3.5.1. Aislamiento de ADN plasmídico en *E. coli*

Según la cantidad de ADN necesaria para su estudio se utilizaron dos métodos para aislar el ADN.

3.5.1.1 Minipreparaciones de ADN plasmídico

Este método, descrito básicamente por Holmes y Quigley (1981), fue utilizado para aislar ADN plasmídico de forma rápida y a pequeña escala, suficiente para analizar un gran número de muestras de plásmidos recombinantes aislados de transformantes de *E. coli*, donde se requiere solo unos pocos microgramos de ADN.

Procedimiento

- ✓ Sembrar con un palillo estéril la colonia transformante en medio LA con los aditivos de selección correspondientes e incubar a 37 °C durante 12 h. En el caso de que el replicón sea sensible a la temperatura, incubar a 30 °C para conservar la construcción.
- ✓ Inocular con el mismo palillo en 700 µl de medio TB con 10 % (v/v) de sales de TB y los aditivos de selección correspondientes, e incubar a 37 °C (o 30 °C) a 250 rpm durante 12 h.
- ✓ Recoger las células por centrifugación a 13200 rpm a temperatura ambiente durante 30 s, y desechar el sobrenadante invirtiendo el microtubo y dando unos suaves golpes en un trozo de papel.
- ✓ Resuspender el precipitado de células en 200 µl de solución STET, añadir 6 µl de lisozima a 50 mg/ml en la tapa del microtubo, y agitar en *vortex* hasta resuspender el precipitado.
- ✓ Hervir en agua durante 40 s. Inmediatamente, centrifugar a 13200 rpm 10 min a temperatura ambiente. Retirar el precipitado con ayuda de un palillo estéril.
- ✓ Precipitar el ADN con 1/10 del volumen con acetato sódico 3 M pH 5,2 y 0,6 volúmenes de isopropanol.
- ✓ Mezclar por inversión, dejar reposar 5 min a temperatura ambiente y centrifugar a 13200 rpm 10 min a temperatura ambiente.
- ✓ Desechar el sobrenadante, secar el precipitado y resuspender en 15-20 µl de TE o agua.

Soluciones

- ❖ **Solución STET:** sacarosa 8 % (p/v); Tritón X-100 0,5 % (v/v); EDTA 50 mM pH 8; Tris-HCl 10 mM pH 8.
- ❖ **Lisozima:** solución acuosa de lisozima a una concentración final de 50 mg/ml.
- ❖ **TE:** Tris-HCl 10 mM pH 8 y EDTA 1 mM pH 8.

3.5.1.2. Lisis alcalina

El método utilizado para aislar ADN plasmídico a gran escala fue descrito por Sambrook y Russell (2001) y ha sido utilizado con algunas modificaciones.

Procedimiento

- ✓ Inocular una colonia aislada de la cepa de *E. coli* transformante en 90 ml de TB suplementado con 10 ml sales de TB y los aditivos de selección correspondientes. Incubar a 37 °C 250 rpm durante 24 h.
- ✓ Recoger las células en tubos de centrífuga tipo Falcón por centrifugación a 4 °C 4500 rpm durante 5 min y desechar el sobrenadante.
- ✓ Resuspender el precipitado de células añadiendo 2 ml de solución I y agitando con el *vortex*.
- ✓ Añadir 40 µl de una solución de lisozima, 4 ml de solución II de lisis recién preparada, y mezclar por inversión. Dejar reposar durante 5-10 min a temperatura ambiente.
- ✓ Precipitar las proteínas y ADN cromosómico añadiendo 2 ml de solución III de lisis. Agitar vigorosamente y dejar en hielo durante 10 min.
- ✓ Centrifugar a 4500 rpm a temperatura ambiente durante 10 min y filtrar el sobrenadante a través de una punta para micropipetas p5000 rellena con algodón hidrófilo.
- ✓ Precipitar el ADN plasmídico con 0,6 volúmenes de isopropanol, mezclar por inversión y mantener 10 min a temperatura ambiente.
- ✓ Centrifugar a 4500 rpm a temperatura ambiente durante 10 min y desechar el sobrenadante.
- ✓ Lavar el precipitado con 1 ml de etanol al 80 % resuspendiéndolo con la micropipeta.
- ✓ Centrifugar a 4500 rpm a temperatura ambiente durante 10 min, desechar el sobrenadante, dejar secar el precipitado, resuspenderlo en 450 µl de solución TE y pasarlo a un microtubo de 2,2 ml.
- ✓ Para precipitar el ARN, añadir 1 volumen de LiCl 5 M e invertir, mantener en hielo durante 5 min y centrifugar a 13200 rpm a 5 °C durante 5 min.
- ✓ Pasar el sobrenadante a un microtubo de 2,2 ml, añadir 0,6 volúmenes de isopropanol, agitar por inversión, reposar 5-10 min, centrifugar a 13200 rpm a temperatura ambiente durante 10 min, desechar el sobrenadante y dejar secar a temperatura ambiente.
- ✓ Lavar el precipitado añadiendo entre 500 y 1000 µl de etanol al 80 % y agitar vigorosamente. Centrifugar a 13200 rpm a temperatura ambiente durante 3 min, desechar el sobrenadante y dejar secar a temperatura ambiente.
- ✓ Resuspender en 400 µl de solución TE para fenolizar (apartado 3.5.3).

Soluciones

- ❖ **Lisozima:** solución acuosa de lisozima a una concentración final de 50 mg/ml.
- ❖ **Solución I de lisis alcalina:** la solución Tris-Cl 25 mM-EDTA 10 mM a pH 8 se esterilizar en autoclave a 120 °C durante 20 min y, posteriormente para evitar la oxidación del azúcar, se añade la glucosa 50 mM esterilizada por filtración.
- ❖ **Solución II de lisis alcalina:** NaOH 0,2 N y SDS (dodecilsulfato sódico) 1 %. Esta solución se prepara en el momento de su uso, añadiendo primero el agua, luego el NaOH y finalmente el SDS.
- ❖ **Solución III de lisis alcalina:** acetato potásico 3 M (autoclavado) y ácido acético glacial 2 M. pH 4,8. Conservar a 4 °C.
- ❖ **Etanol al 80 %:** diluir etanol absoluto en agua al 80 % (v/v).
- ❖ **TE:** Tris-HCl 10 mM pH 8 y EDTA 1 mM pH 8,0.

3.5.2. Aislamiento de ADN total de *Streptomyces*

El método utilizado para el aislamiento de ADN genómico de *Streptomyces* fue el llamado *Salting out* descrito por Pospiech y Neumann (1995) con algunas modificaciones.

Procedimiento

- ✓ Inocular la cepa de *Streptomyces* de la que se quiere aislar el ADN genómico en 50 ml de medio TSB suplementado con 0,5 % de glicina, para favorecer el crecimiento laxo del micelio. Incubar durante 48 h a 220 rpm a la temperatura óptima de crecimiento.
- ✓ Recoger el micelio mediante centrifugación a 4500 rpm durante 10 min a temperatura ambiente y desechar el sobrenadante. El ADN genómico empleado en las micromatrices se extrajo de un cultivo en fase estacionaria para evitar que esté más representada la región central donde se origina la replicación.
- ✓ Resuspender el micelio en 5 ml de solución SET agitando en *vortex*. Añadir 100 µl de lisozima, mezclar por inversión e incubar 60 min a 37 °C.
- ✓ Añadir 140 µl de solución acuosa de proteinasa K, mezclar por inversión, añadir 600 µl de SDS al 10 %, mezclar por inversión e incubar 2 h a 55 °C, mezclando por inversión ocasionalmente.
- ✓ Añadir 2 ml de NaCl 4 M, mezclar vigorosamente por inversión y dejar atemperar hasta aproximadamente 37 °C.
- ✓ Añadir 5 ml de CIA, mezclar por inversión durante 30 min a temperatura ambiente.
- ✓ Centrifugar a 4500 rpm durante 15 min a 20 °C, transferir el sobrenadante a un nuevo tubo, añadir 0,6 volúmenes de isopropanol y mezclar por inversión durante 3 min.
- ✓ Recoger el ovillo de ADN con una pipeta Pasteur. Si no se aprecia el ovillo, centrifugar para favorecer la precipitación del ADN. Lavar el ADN en un tubo con 5 ml de etanol al 80 %, dejar secar y disolver en 500 µl de TE a 55 °C.

Soluciones

- ❖ **Solución SET:** NaCl 75 mM; EDTA 25 mM pH 8; Tris-HCl 20 mM pH 7,5.
- ❖ **Proteinasa K:** solución acuosa de proteinasa K a una concentración final de 20 mg/ml.
- ❖ **SDS 10 %:** solución acuosa de SDS al 10 % (v/v).
- ❖ **CIA (cloroformo-alcohol isoamílico):** mezclar 24 partes de cloroformo y una de alcohol isoamílico.
- ❖ **Etanol al 80 %:** diluir etanol absoluto en agua al 80 % (v/v).
- ❖ **TE:** Tris-HCl 10 mM pH 8 y EDTA 1 mM pH 8.

3.5.3. Limpieza y precipitación del ADN

La eliminación de proteínas y otras impurezas de la solución de ADN se llevó a cabo mediante extracción con fenol-CIA. Posteriormente, se recuperó el ADN mediante la pérdida de su solubilidad en agua por la adición de sales y un alcohol.

Procedimiento

- ✓ Añadir un volumen de fenol-CIA a la suspensión con ácidos nucleicos y mezclar vigorosamente por inversión. Centrifugar 5 min a 13200 rpm temperatura ambiente y recuperar la fase superior acuosa.
- ✓ Repetir de nuevo el proceso hasta que la solución de ADN quede libre de impurezas en la interfase.

- ✓ Añadir un volumen de CIA para eliminar los restos de fenol de la solución y mezclar con *vortex*. Centrifugar 5 min a 13200 rpm temperatura ambiente y recuperar la fase superior acuosa.
- ✓ Para la precipitación del ADN, añadir de 2 a 2,5 volúmenes de etanol absoluto y mantener a temperatura ambiente 10 min, o a -20 °C toda la noche para favorecer la precipitación.
- ✓ Centrifugar a 13200 rpm 5 min a temperatura ambiente, o 10 min a 4 °C si no se observa el ovillo de ADN, y desechar el sobrenadante.
- ✓ Lavar por inversión del tubo con 400 µl de etanol al 80 %, centrifugar 13200 rpm 3 min a temperatura ambiente, desechar el sobrenadante y secar a temperatura ambiente.
- ✓ Resuspender el precipitado en 40 µl de solución TE. Conservar a 4 °C para largos periodos de tiempo.

Soluciones

- ❖ **TE:** Tris-HCl 10 mM pH 8 y EDTA 1 mM pH 8.
- ❖ **Fenol-CIA:** 1/2 volumen de fenol neutro a pH 7,4: 1/2 volumen de CIA.
- ❖ **Fenol neutro:** mezclar 50 g de fenol, 50 mg de hidroxiquinoleína y Tris-HCl 0,1 M pH 8,5, dejar reposar hasta que se formen dos fases. Retirar la fase superior y añadir Tris-HCl 0,1 M 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.

3.5.4. Evaluación de la concentración y pureza de los ácidos nucleicos

La concentración y pureza de los ácidos nucleicos fue evaluada espectrofotométricamente empleando un equipo *NanoDrop ND-1000 UV-vis* (Thermo Scientific). El aparato estima la concentración de ADN o ARN presente en la muestra basándose en su absorbancia a 260 nm y la absorptividad específica del ADN o ARN. De acuerdo con la Ley de Beer-Lambert, la concentración del absorbente en el medio (c) es directamente proporcional a la absorbancia (A), e inversamente proporcional al coeficiente de absorción (α) y a la longitud atravesada por la luz en el medio (l): $A=c \cdot \alpha \cdot l$. A su vez, el coeficiente de absorción (α) es directamente proporcional a la absorptividad específica e inversamente proporcional a la longitud de onda de la luz absorbida. La absorptividad específica para el ADN de doble cadena (ADN_{dc}) es de 50 µg/ml, para el ADN de cadena sencilla (ADN_{sc}) tiene un valor de 33 µg/ml y para el ARN el valor es de 40 µg/ml.

La pureza de la muestra es medida por el equipo a través del cociente A₂₆₀/A₂₈₀. Esta relación presenta un valor de 1,8 y 2,1 en muestras puras de ADN y ARN, respectivamente (Sambrook y Russell, 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, poseen absorción a 280 nm. El equipo mide también el cociente A₂₆₀/A₂₃₀ cuyo valor se encuentra entre 1,8 y 2,2 en el caso de ácidos nucleicos puros, y disminuye con la presencia de contaminantes no proteicos que absorben a A₂₃₀. En el caso del ARN la medida se considera óptima cuando el cociente A₂₆₀/A₂₃₀ se encuentra entre 2 y 2,3 (Sambrook y Russell, 2001).

3.5.5. Manipulación enzimática del ADN

3.5.5.1. Hidrólisis con endonucleasas de restricción

Las enzimas de restricción se emplearon siguiendo las recomendaciones del fabricante (Takara, New England Biolabs o MBI Fermentas), en cuanto a temperatura de incubación, pH, condiciones salinas y aditivos del tampón.

El volumen de reacción y la cantidad de ADN digerido variaron en función de las necesidades de cada experimento, considerando siempre que el volumen de enzima añadido no superara nunca la décima parte del volumen total de reacción. Las enzimas se comercializan en glicerol al 50 % (v/v), y concentraciones de glicerol superiores al 5 % (v/v) podrían inhibir la actividad enzimática o inducir la actividad inespecífica de tipo *star*. Por regla general, la cantidad de enzima añadida fue de 0,5-2 unidades por cada microgramo de ADN y el tiempo de incubación varió entre 3 y 15 horas. Cuando el ADN se encontraba resuspendido en TE se llevó a cabo la reacción en un volumen igual o superior a 10 veces el volumen de ADN a digerir, con el objetivo de diluir el TE para impedir que este interfiera con el tampón de reacción. La correcta digestión del ADN se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa y, cuando fue necesario, se purificó y precipitó desde el taco de agarosa, o directamente desde la mezcla de reacción.

3.5.5.2. Modificación enzimática de los extremos de ADN

Los extremos protuberantes generados por las enzimas de restricción fueron, en ocasiones, modificados generando extremos romos o semirrellenados para poder ligar así fragmentos de ADN en principio no compatibles. Los extremos 5' protuberantes se rellenaron con la actividad 5' → 3' polimerasa del fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*. Cuando se precisó un semirrellenado se añadieron únicamente los desoxinucleótidos trifosforilados de adenina, timina, guanina y/o citosina necesarios.

El volumen final de reacción fue de 15 a 50 µl en función de la cantidad de ADN a rellenar, con una concentración final de desoxinucleótidos trifosfato de 100 µM y 1 unidad de enzima Klenow por cada µg de ADN. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 15 minutos. La enzima se inactivó manteniendo la mezcla de reacción a 65 °C durante 10 minutos.

3.5.5.3. Ligación de fragmentos de ADN

La unión de fragmentos de ADN se realizó con la ligasa de ADN del fago T4 (Roche). Esta enzima cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre los extremos 3'-hidroxilo y 5'-fosfato

de ADN de doble cadena y requiere iones Mg^{2+} y ATP como cofactores. El volumen final de reacción fue de 10 μ l. La concentración final de vector e inserto se ajustó según las indicaciones de Sambrook y Russell (2001) y la de enzima T4 fue de 0,5 U/ μ l. La relación estequiométrica entre vector e inserto varió entre 1:2 y 1:10. En general, las ligaciones basadas en moléculas de ADN con los extremos romos resultan más improbables, por lo que, para favorecer la ligación, se añade un mayor número de moléculas de inserto en relación al vector que en los casos de extremos cohesivos. La reacción se incubó a 4 °C toda la noche para extremos romos y a temperatura ambiente 4 horas para extremos cohesivos. Transcurrido el tiempo de incubación, se inactivó la enzima a 65 °C durante 10 minutos.

3.5.6. Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR

La técnica PCR (del inglés, *Polymerase Chain Reaction*), descrita inicialmente por Mullis y Faloona (1987), permite amplificar fragmentos específicos de ADN. De este modo, partiendo de una molécula de ADN se pueden obtener entre 10^5 y 10^9 copias de una secuencia específica contenida en ella mediante la utilización de cebadores diseñados específicamente y de una ADN polimerasa termoestable. Esta técnica requiere, por tanto, conocer inicialmente la parte de la secuencia que se desea amplificar. La amplificación se basa en la repetición cíclica de las siguientes etapas:

Desnaturalización. Consiste en la separación de las dos hebras del ADN molde mediante la incubación a elevada temperatura (94-98 °C). Las dos cadenas permanecerán dissociadas en la solución hasta que la temperatura disminuya permitiendo la hibridación de los cebadores.

Hibridación de los cebadores. Consiste en la disminución de la temperatura de la reacción por debajo de la temperatura de desnaturalización de los cebadores (temperatura de *melting*, T_m) de modo que los cebadores se puedan unir a las cadenas sencillas de ADN molde. Cada uno de los cebadores es complementario a una de las dos cadenas del ADN y su diseño es tal, que tras la hibridación quedan enfrentados por sus extremos 3' flanqueando la región a amplificar. La distancia entre los cebadores determinará la longitud del amplicón obtenido. La temperatura de esta etapa es un factor crítico, ya que si es demasiado alta, el rendimiento de la reacción es bajo, debido a que la tasa de hibridación es baja, y si es demasiado baja, puede afectar a la especificidad de la reacción, amplificando productos no deseados. Por esta razón, la temperatura de hibridación se determina empíricamente, partiendo normalmente de una temperatura 5 °C inferior a la menor de las T_m de los cebadores.

Elongación. Consiste en la polimerización de desoxinucleótidos a partir de los cebadores del conjunto cadena sencilla de ADN-cebador por la acción de una ADN polimerasa termoestable, a una temperatura próxima a 72 °C. El resultado de la reacción es la formación de dos nuevas cadenas de ADN, copias de la molécula molde, y que han incorporado en el extremo 5' de su secuencia la secuencia del respectivo cebador. La duración de este paso depende de la polimerasa y de la longitud del fragmento a amplificar: la procesividad de *GoTaq*[®] es de 1 kb/min, mientras que la de *Phusion*[®] es de 1 kb/15-30 s.

Existen diversas ADN polimerasas comerciales que se pueden usar para PCR, cada una de ellas con unas características y condiciones específicas para llevar a cabo la reacción. En el presente trabajo se han utilizado dos tipos. Por un lado, *KapaTaq* (Kapa Biosystems) o *GoTaq*[®] (Promega) se emplearon cuando la introducción de un pequeño número de errores no resultaba crucial para el experimento (por ejemplo: análisis de construcciones por tamaño de amplicón) o bien cuando se pretendía determinar la temperatura óptima de hibridación de unos nuevos oligonucleótidos. Ambas polimerasas dejan una desoxiadenosina en cada extremo 3' del amplicón, lo que permite clonar directamente los fragmentos amplificados en vectores del tipo *pGEM*[®]-*T Easy* (Promega). Por otro lado, *Platinum*[®] *Pfx DNA polymerase* (Invitrogen), *Phusion*[®] *Hot Start DNA polymerase* (Finnzymes) o *Hybrid DNA polymerase* (EURx[®]) se utilizaron cuando la fidelidad en la copia era imprescindible (por ejemplo: amplificación de un gen para complementar una cepa mutante). Estas polimerasas generan extremos romos en los fragmentos amplificados.

En la tabla 3.2 se indican, de acuerdo a las especificaciones de la casa comercial Roche, los valores normales de los distintos componentes para la realización de un típica reacción de 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 amplificación de fragmentos de ADN pertenecientes a *Streptomyces* (genoma con alto contenido en G+C) es necesario añadir DMSO (entre un 5 y un 7 % del volumen final) en la mezcla de reacción. El DMSO facilita la separación de la doble cadena de ADN, que tiende a formar estructuras secundarias, por lo que incrementa la eficiencia de la reacción de PCR.

Los tiempos y temperaturas para una reacción de PCR son básicamente empíricos y dependen de diversos factores como: contenido en G+C del ADN y de los oligonucleótidos (que determina la temperatura de hibridación empleada), longitud del fragmento a amplificar, velocidad de procesamiento de la ADN polimerasa, abundancia de ADN molde, entre otros. De modo genérico estos tiempos y temperaturas aparecen reflejados en la tabla 3.3.

ADN molde	10-50 ng ADN genómico 0,1-1 ng ADN plasmídico
Cebadores (17-27 pb)	0,1-0,6 μM
MgCl ₂	1-5 mM (normalmente 1,5 mM)
dNTPs	50-500 μM (normalmente 200 μM)
Tampón 10X	1X
DMSO	5 %
ADN polimerasa	0,5-2,5 unidades
Agua	Hasta completar 20 μl

Tabla 3.2. Componentes necesarios para realizar una reacción de PCR y concentraciones finales para 20 μl de reacción.

Etapa		Temperatura	Tiempo	Ciclo
Desnaturalización inicial		94-98 °C	2-6 min	1 ciclo
Amplificación	Desnaturalización	94-98 °C	30-60 s	20-35 ciclos
	Hibridación	Según el cebador	30-45 s	
	Extensión	72 °C	Según la polimerasa	
Extensión final		72 °C	5 min	1 ciclo

Tabla 3.3. 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 para comprobar el tamaño y la cantidad del fragmento amplificado, así como la presencia o ausencia de bandas de amplificación inespecíficas.

Todos los oligonucleótidos empleados como cebadores en las reacciones de PCR, así como las temperaturas empíricas de hibridación se encuentran incluidos en la tabla 7.1 del anexo.

3.5.7. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa se realizó según la descripción de Sambrook y Russell (2001). Se utilizó agarosa disuelta por calentamiento en tampón TAE a concentraciones entre 0,6 y 2 % (p/v) en función del rango de tamaños de los fragmentos de ADN a separar (tabla 3.4).

Procedimiento

- ✓ Disolver la cantidad necesaria de agarosa en tampón TAE 1X por calentamiento en microondas (tabla 3.4). Compensar con agua destilada la pérdida de volumen debida a la evaporación.

- ✓ Dejar enfriar la solución de agarosa sin que llegue a solidificarse y verter sobre la bandeja colocada en el soporte adecuado para la realización de geles. Colocar los peines deseados en función del tamaño de pocillo que se necesite para cargar la muestra. Añadir el volumen de agarosa fundida necesario para obtener un gel de 4-6 mm de espesor. Dejar enfriar hasta la total solidificación del gel, al menos 20 min. Se puede enfriar el gel en la nevera a 4 °C los últimos 5 min para favorecer la solidificación.
- ✓ Retirar los peines y colocar la bandeja con el gel en la cubeta de electroforesis y llenar la misma con tampón TAE hasta cubrir el gel unos 0,5 cm.
- ✓ Mezclar cada muestra de ADN (o ARN) con 0,1 volúmenes de tampón de carga concentrado y dispensar en los pocillos del gel.
- ✓ El tamaño de los fragmentos de ADN separados por electroforesis se determina por comparación con marcadores de peso molecular de ADN conocidos, por lo que es necesario incluir una alícuota de este último en, al menos, uno de los pocillos del gel. Los marcadores empleados fueron el ADN del fago lambda digerido con las enzimas *HindIII* o *PstI*. Generalmente se utilizaron unos 300 ng de marcador por carril resuspendido en tampón de carga.
- ✓ Desarrollar la electroforesis mediante la aplicación de una diferencia de potencial de entre 2,5 y 5 V/cm de distancia entre el ánodo y el cátodo. La duración de la electroforesis depende de la longitud del gel empleado, así como del tamaño de los fragmentos de ADN a estudiar en cada caso.
- ✓ Teñir el ADN por inmersión del gel durante 15-30 min en una solución de bromuro de etidio. Este compuesto se intercala en la doble cadena y en las estructuras secundarias de los ácidos nucleicos de cadena sencilla permitiendo su visualización al iluminar el gel con luz ultravioleta.
- ✓ Los geles se visualizan y fotografían sobre un equipo transiluminador que emite luz con longitud de onda de 302 nm.

Soluciones

- ❖ **Tampón TAE 50X:** Tris base 2 M; ácido acético glacial 1 M; EDTA 50 mM pH 8; agua destilada hasta completar un litro.
- ❖ **Tampón de carga concentrado (10X):** azul de bromofenol 0,25 %, sacarosa 40 %; xilencianol 0,25 %; en solución acuosa. Se esteriliza en la olla a presión a 120°C durante 20 min. Se conserva a 4°C o a temperatura ambiente. En un gel de agarosa al 1 % el azul de bromofenol migra a una velocidad similar a un fragmento de 500 pb y el xilencianol a una velocidad similar a un fragmento de 4 kb.
- ❖ **Bromuro de etidio:** a partir de una solución comercial acuosa de bromuro de etidio a 10 mg/ml conservada a 4 °C se prepara una solución a 2 µg/ml en agua y se conserva a temperatura ambiente. Ambas soluciones se conservan protegiéndolas de la exposición a la luz.

Concentración de agarosa (%)	Tamaño de los fragmentos de ADN separados (kb)
0,6	1-30
0,8	0,8-12
1,0	0,5-10
1,5	0,2-3
2,0	0,05-2

Tabla 3.4. Concentraciones de agarosa utilizadas en los geles para la resolución de fragmentos de ADN de diferentes tamaños.

3.5.8. Recuperación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Los fragmentos de ADN separados mediante electroforesis en geles de agarosa y requeridos para manipulaciones posteriores fueron extraídos de la matriz. Para ello se emplearon dos métodos distintos en función del tamaño del fragmento de ADN a extraer. Para fragmentos de

gran tamaño, por encima de las 5 kb, se usó una técnica tradicional basada en la congelación rápida de la banda de agarosa que contiene el ADN en su interior y la centrifugación a través de algodón hidrófilo. Para la extracción de fragmentos de un tamaño menor de 5 kb se empleó un sistema comercial basado en la adsorción del ADN a una matriz, *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare).

3.5.8.1. Método de congelación rápida (*Freeze and Squeeze*)

Esta técnica es conocida como *Freeze and 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 del protocolo original (nociva por inhalación) por algodón hidrófilo.

Procedimiento

- ✓ Separado el ADN mediante electroforesis, y tras la tinción y visualización, cortar la porción del gel que contiene el fragmento de interés procurando tomar la menor cantidad de agarosa posible.
- ✓ Colocar el fragmento de agarosa en un microtubo de 1,5 ml, al que se ha practicado un orificio en el fondo y se ha obturado con una pequeña cantidad de algodón hidrófilo, encajado en un microtubo sin obturar.
- ✓ Congelar la banda a -20 °C durante 30 min o a -80 °C durante 15 min.
- ✓ Centrifugar a 13200 rpm durante 10 min.
- ✓ Recoger la fase acuosa recolectada en el tubo inferior. Tratar con CIA y precipitar tal como se describe en el apartado 3.5.3.
- ✓ Resuspender el precipitado en 10-20 µl de agua.

3.5.8.2. Método de purificación en columnas *GFX*

El kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare) permite la purificación de fragmentos de ADN comprendidos entre 50 pb y 10 kb empleando un agente caotrópico que desnaturaliza las proteínas, disuelve la agarosa y facilita la unión del ADN de doble cadena a una matriz de fibra de vidrio inmovilizada en una columna. Una vez que el ADN es retenido, las proteínas y sales contaminantes son eliminadas mediante un lavado. El ADN es posteriormente eluido en agua. El proceso de extracción es rápido y permite una recuperación del ADN en torno al 60-80 %, en el caso de fragmentos contenidos en agarosa, y del 95 % de productos de PCR de solución. El protocolo es el indicado por el fabricante.

Procedimiento

- ✓ Pesar un microtubo de 1,5 ml. Una vez separado el ADN mediante electroforesis, cortar la banda del gel con el fragmento de interés procurando tomar la menor cantidad de agarosa posible.

- ✓ Colocar la banda de agarosa que contiene el ADN a purificar en dicho tubo y volver a pesar. Calcular el peso de la banda de agarosa.
- ✓ Añadir 10 µl del tampón de captura tipo 3 por cada 10 mg de peso de la banda (no añadir menos de 300 µl de tampón de captura por muestra).
- ✓ Mezclar y calentar a 60 °C durante 10-20 min hasta que la agarosa este completamente disuelta.
- ✓ Colocar una microcolumna *GFX* en su microtubo correspondiente y transferir hasta 700 µl de la mezcla disuelta. Dejar a temperatura ambiente durante 1 min y centrifugar a 13200 rpm durante 30 s.
- ✓ Descartar el eluido y volver a colocar la columna en el mismo microtubo. Si quedase más volumen de muestra, transferirlo en una segunda ronda.
- ✓ Añadir 500 µl del tampón de lavado tipo 1 sobre la microcolumna. Centrifugar a 13200 rpm durante 30 s.
- ✓ Colocar la microcolumna en un nuevo microtubo de 1,5 ml y añadir 10-50 µl de agua sobre la membrana de la columna. Dejar a temperatura ambiente 1 min y centrifugar a 13200 rpm durante 1 min, para eluir y recuperar el ADN purificado.

3.5.9. Hibridación de ADN

Esta técnica se empleó con el fin de rastrear un genoteca en busca del clon con la secuencia de ADN de interés.

3.5.9.1. Transferencia *in situ* de ADN de colonias

La transferencia se realizó según el método descrito en el manual específico de hibridaciones con digoxigenina: *DIG Application Manual for Filter Hybridization 2000* (Roche Diagnostics GmbH).

Procedimiento

- ✓ Cultivar los grupos de 18 colonias procedentes de la placa maestra de la genoteca en *E. coli* sobre una membrana de nailon *Hybond-N+* (GE Healthcare) que descansa en una placa con medio LA suplementado con kanamicina y ampicilina durante 16-20 h.
- ✓ Para realizar la lisis celular, saturar 2 hojas de papel *Whatman® 3MM* (GE Healthcare) (de tamaño ligeramente superior al de la membrana) en bandejas diferentes con: solución desnaturalizante, solución neutralizante y SSC 2X (2 hojas para cada solución). Preparar también papel de filtro seco.
- ✓ Recuperar la membrana (con las colonias hacia arriba) y colocar sobre el papel embebido en la solución desnaturalizante durante 15 min.
- ✓ Secar brevemente la membrana dejándola sobre papel de filtro.
- ✓ Colocar la membrana sobre el papel embebido en solución neutralizante durante 15 min. Volver a secar dejando la membrana sobre papel de filtro.
- ✓ Colocar la membrana sobre el papel humedecido con SSC 2X durante 10 min.
- ✓ Colocar la membrana sobre papel de filtro y fijar el ADN a la membrana mediante luz ultravioleta (*UV-Stratalinker® 2400*, Stratagene).

- ✓ Colocar la membrana en una bandeja y humedecerla con una solución de proteinasa K (2 mg/ml). Incubar 1 h a 37 °C.
- ✓ 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.
- ✓ Conservar la membrana en un pliego de papel de filtro envuelto en papel de aluminio y a 4 °C.

Soluciones

- ❖ **Solución desnaturalizante:** NaCl 1,5 M y NaOH 0,5 M.
- ❖ **Solución neutralizante:** NaCl 1,5 M; Tris-HCl 0,05 M, pH 7,2; EDTA 1 mM.
- ❖ **SSC 20X:** NaCl 3 M y citrato sódico 0,3 M, pH 7.

3.5.9.2. Marcaje de sondas no radiactivo

El marcaje no radiactivo de una sonda se realizó con digoxigenina por el sistema *DIG-High Prime* (Roche). Este heptaeno esteroide se encuentra unido al nucleótido trifosfato dUTP por un enlace éster (digoxigenina-11-dUTP). Las sondas marcadas con digoxigenina son generadas enzimáticamente por el método de cebado al azar descrito por Feinberg y Vogelstein (1983). El método se basa en la incorporación al azar en el ADN del análogo del nucleótido digoxigenina-11-dUTP, gracias a la extensión de hexanucleótidos iniciadores por el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*. La proporción de DIG-11-dUTP frente a dTTP está ajustada para que por cada 20-25 nucleótidos incorporados se introduzca una molécula de digoxigenina. Esta densidad de heptaenos en el ADN proporciona una gran sensibilidad en la inmunodetección posterior por anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con la enzima fosfatasa alcalina. Para realizar el marcaje se siguió el protocolo descrito en *DIG System User's Guide for Filter Hybridization* (Roche).

Procedimiento

- ✓ Obtener en forma lineal 1-3 µg de ADN del fragmento que se desea marcar en un volumen de 16 µl.
- ✓ Desnaturalizar el ADN en agua hirviendo durante 10 min y transferir rápidamente a hielo.
- ✓ Añadir 4 µl de la mezcla de marcaje *DIG-High Prime* que contiene concentraciones óptimas de cebadores aleatorios, nucleótidos, DIG-dUTP y enzima Klenow.
- ✓ Centrifugar para recoger la muestra en el fondo del microtubo.
- ✓ Incubar la mezcla a 37°C durante 24 h.
- ✓ Parar la reacción congelando directamente o añadiendo 2 µl de EDTA 0,25 mM, pH 8 y mantener a -20 °C hasta su utilización.

3.5.9.3. Hibridación y detección del ADN

El proceso de hibridación se lleva a cabo una vez que se ha transferido el ADN a membrana 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 esta 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 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: a) disminuyendo la concentración de sales del tampón de lavado, b) aumentando la concentración de detergentes en el tampón de lavado, y c) aumentando la temperatura y la duración del lavado. La detección permite visualizar la hibridación de la sonda con los fragmentos de ADN específicos. El protocolo utilizado sigue las directrices de *DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I* (Roche) con algunas modificaciones.

Procedimiento

- ✓ Introducir la membrana de 11x8 cm en un tubo de hibridación de 15 cm de largo x 4 cm de diámetro, de modo que la cara de la membrana en la que se encuentra el ADN transferido no contacte con las paredes del tubo. Añadir 30 ml de solución de prehibridación calentada a 65 °C.
- ✓ Incubar con movimiento rotatorio durante 6 h a 65 °C.
- ✓ Hervir la sonda marcada con digoxigenina durante 10 min para desnaturalizar el ADN. Enfriar rápidamente en hielo durante 3 min. Añadir la sonda así desnaturalizada en una nueva solución de prehibridación atemperada a 65 °C. Esta solución de hibridación puede ser reutilizada varias veces; en este caso, desnaturalizar antes de su uso durante 15 min.
- ✓ Eliminar del tubo de hibridación la solución de prehibridación y sustituirlo por 30 ml de la nueva solución con la sonda desnaturalizada.
- ✓ Incubar en agitación durante 12 h a 65 °C. Tras el tiempo de hibridación, si se desea, recuperar la solución de hibridación en un tubo para su reutilización y conservarla a -20 °C.
- ✓ Recuperar la membrana y situarla en una bandeja para lavarla dos veces con solución de lavado I durante 15 min a temperatura ambiente en agitación.
- ✓ Lavar dos veces la membrana con solución de lavado II durante 25 min a 65 °C en agitación.
- ✓ Equilibrar la membrana incubando con tampón I durante 1 min a temperatura ambiente en agitación.

- ✓ Bloquear la membrana incubando con tampón II durante 30 min a temperatura ambiente en agitación.
- ✓ Sustituir el tampón II por la solución de anticuerpos e incubar 1 h a temperatura ambiente en agitación.
- ✓ Eliminar la solución de anticuerpos, lavar la membrana 2 veces con tampón I durante 15 min a temperatura ambiente en agitación.
- ✓ Eliminar el tampón I y sustituirlo por el tampón III durante 2 min a temperatura ambiente en agitación.
- ✓ Mezclar 45 µl de solución NBT y 35 µl de solución BCIP por cada 10 ml de tampón III e incubar la membrana en oscuridad en esta solución hasta que aparezcan señales de hibridación (un precipitado oscuro en la membrana). La incubación a 37 °C aumenta la velocidad de la reacción, por lo que la señal se observa antes.
- ✓ Retirar la solución de color y detener la reacción añadiendo TE.

Soluciones

- ❖ **Solución de prehibridación:** SSC 5X; agente bloqueante (*Blocking Reagent* de Roche) 1 %; N-lauril sarcosina 0,1 %; SDS 0,02 %.
- ❖ **Solución de hibridación:** solución de prehibridación con la sonda marcada.
- ❖ **Solución de lavado I:** SSC 2X y SDS 0,1 %.
- ❖ **Solución de lavado II:** SSC 0,1X y SDS 0,1 %.
- ❖ **Tampón I:** ácido maleico 100 mM y NaCl 150 mM, pH 7,5.
- ❖ **Tampón II:** tampón I con 0,5-1 % (p/v) de agente bloqueante (Roche).
- ❖ **Tampón III:** se prepara por una parte Tris-HCl 1 M, pH 9,5; y por otro lado NaCl 1 M; MgCl₂·6H₂O 500 mM. De esta forma las soluciones están a 10X, mezclándose antes de usar como 1X.
- ❖ **Solución de anticuerpos:** diluir en una proporción 1:10.000 anticuerpos antidigoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina (Roche) en tampón II.
- ❖ **Solución NBT** (azul de nitrotetrazolio): NBT 75 mg/ml en dimetilformamida al 70 %.
- ❖ **Solución BCIP** (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato): 50 mg/ml en dimetilformamida.

3.5.10. Secuenciación de ADN

Los fragmentos de ADN clonados en plásmidos o simplemente amplificados por PCR, se secuenciaron según el método de Sanger y col. (1977) en el Área de Análisis de Ácidos Nucleicos del Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León o en el Servicio de Genómica de Inbiotec. Para preparar la reacción se utilizó el sistema *BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems). La secuenciación de los productos amplificados se llevó a cabo por electroforesis capilar en el secuenciador *ABI PRISM[®] 3130* (Applied Biosystems).

El método de amplificación y resolución de los fragmentos marcados por fluorescencia se basa en la síntesis de ADN complementario a partir de un cebador con una ADN polimerasa en presencia de didesoxinucleótidos (ddNTP), análogos a los desoxinucleótidos (dNTPs) pero que carecen del grupo 3' hidroxilo necesario para la formación del enlace fosfodiéster. Estos ddNTPs están conjugados con un fluoróforo específico para cada uno de los mismos. En la fase de elongación, la ADN polimerasa del fago T7 incorpora los ddNTPs al azar en distintos tiempos, dando lugar a una población de moléculas fluorescentes de distintos tamaños y con distintos puntos de parada con respecto al molde original. Los fragmentos de ADN marcados con los

diferentes fluoróforos se separan según su tamaño por electroforesis. A medida que la muestra pasa por el capilar a través del polímero, los fragmentos atraviesan una ventana en la que son iluminados por un láser, lo que provoca la excitación de los fluoróforos ligados a los fragmentos. Estos emiten luz a una longitud de onda específica para cada uno de ellos, que es captada y almacenada por el sistema. El programa de análisis asigna a cada emisión fluorescente el nucleótido que le corresponde para así obtener la secuencia del fragmento analizado.

3.6. Introducción de ADN en *E. coli*

La introducción de ADN en *E. coli* fue llevada a cabo mediante el método de transformación por choque térmico y el de electroporación. Para ello, se necesitan bacterias en estado de competencia (células competentes o electrocompetentes).

3.6.1. Inducción del estado de competencia

El protocolo empleado para la inducción del estado de competencia de las *E. coli* necesarias para la transformación por choque térmico fue el método de Hanahan (1985) basado en el empleo de cationes divalentes que utiliza cloruro de rubidio. Con este método las células alcanzan eficiencias de hasta $5 \cdot 10^8$ transformantes/ μg ADN, para lo que es muy importante trabajar en un baño de hielo durante todo el proceso de manejo de las células.

Procedimiento

- ✓ Una colonia aislada en medio LA se inocula en 5 ml de medio SOB suplementado con 2 % (v/v) de la solución madre de magnesio, en ambos casos suplementando con antibióticos cuando sea necesario, y se incuba a 37 °C con una agitación de 250 rpm durante toda la noche.
- ✓ Con 200-400 μl del cultivo anterior se inoculan 100 ml de medio SOB suplementado con 2 ml de la solución madre de magnesio e incuba a 37 °C con una agitación de 250 rpm.
- ✓ Cuando el cultivo alcanza una DO_{600} de 0,48 unidades, se enfría en hielo. Durante el resto del proceso minimizar el tiempo en el que las células estén fuera del hielo.
- ✓ Las células se recogen por centrifugación a 4 °C durante 5 min a 4500 rpm y se retira el sobrenadante. El precipitado celular se resuspende suavemente en 30 ml de solución RF1 y se mantienen en hielo durante 30 min.
- ✓ Se recogen las células por centrifugación a 4 °C durante 5 min a 4500 rpm y se resuspenden en 4 ml de solución RF2.
- ✓ Finalmente, la suspensión celular se reparte en alícuotas de 50-100 μl que se congelan inmediatamente en nitrógeno líquido para su conservación a -80 °C.

Soluciones

- ❖ **Solución madre de magnesio:** $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 M; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 M. Esterilizar por filtración.
- ❖ **RF1:** RbCl 100 mM; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 50 mM; acetato potásico 30 mM; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mM; glicerol 15 % (p/v). Ajustar el pH a 5,8 con ácido acético 0,2 M. Esterilizar por filtración.

- ❖ **RF2:** MOPS 10 mM; RbCl 10 mM; CaCl₂·2H₂O 75 mM; glicerol 15 % (p/v). Ajustar el pH a 6,8 con NaOH 1 N. Esterilizar por filtración.

El método empleado para la inducción del estado de electrocompetencia de las *E. coli* necesarias para la transformación por electroporación fue el indicado en el protocolo de ReDirect® (Gust y col., 2002). Al igual que en anterior método, es muy importante trabajar en un baño de hielo durante todo el proceso de manejo de las células.

Procedimiento

- ✓ Inocular *E. coli* en 5 ml de LB suplementado con los antibióticos que correspondan. Incubar a 30 °C durante 12 h. El cultivo obtenido es el preinóculo.
- ✓ Inocular 1 ml del preinóculo en 100 ml de medio SOB suplementado con los pertinentes aditivos y antibióticos.
- ✓ Incubar durante 2-4 h a 30 °C y 200 rpm hasta alcanzar una DO₆₀₀ próxima a 0,4.
- ✓ Recoger las células en tubos de GSA por centrifugación a velocidad máxima durante 5 min a 4 °C.
- ✓ Eliminar el sobrenadante por decantación y resuspender el precipitado de células en 10 ml de glicerol al 10 % refrigerado en hielo. Las células han de ser resuspendidas cuidadosamente con la micropipeta p1000.
- ✓ Centrifugar la suspensión en tubos de GSA a velocidad máxima durante 5 min a 4 °C.
- ✓ Eliminar el sobrenadante por decantación y resuspender el precipitado de células en 5 ml de glicerol al 10 % refrigerado en hielo como en el paso anterior.
- ✓ Centrifugar la suspensión en tubos de GSA a velocidad máxima durante 5 min a 4 °C.
- ✓ Eliminar el sobrenadante por decantación y resuspender el precipitado de células en 100 µl de glicerol al 10 % refrigerado en hielo. Las células han de ser resuspendidas cuidadosamente con la micropipeta p200 y mantenidas en hielo para su uso en el mismo día.

3.6.2. Transformación por choque térmico

El método de transformación empleado fue el descrito por Hanahan (1983) que se basa en someter a un choque térmico a las células competentes anteriormente obtenidas para permitir la entrada del ADN.

Procedimiento

- ✓ La alícuota de células competentes congeladas a -80 °C se descongela en hielo.
- ✓ A los 50-100 µl de la suspensión celular se añade el volumen de la ligación o vector que se desea introducir en las células y se mantiene la mezcla en hielo durante 30 min. El volumen de estas suspensiones de ADN no puede ser superior al 10 % del volumen de células.
- ✓ Transcurrido este tiempo se pasa rápidamente la mezcla a un baño de agua a 42 °C durante 45 s, y luego se transfiere inmediatamente al hielo durante 3 min.

- ✓ Se añade 400 µl de medio SOC por cada 100 µl de células y se incuba a 37 °C y 250 rpm durante 45 min.
- ✓ El cultivo se siembra en placas de medio LA, con los aditivos que correspondan en función de las resistencias a antibióticos de la cepa y del plásmido, y se incuba 12 h a 37 °C.

3.6.3. Electroporación

El método de electroporación fue el descrito en el protocolo de ReDirect[®] por (Gust y col., 2002).

Procedimiento

- ✓ Mezclar 50 µl de la suspensión de células electrocompetentes con 1-2 µl (100 ng aproximadamente) del ADN de interés. Disponer la mezcla en una cubeta de electroporación de 0,2 cm refrigerada en hielo. Secar perfectamente la cubeta inmediatamente antes de su uso.
- ✓ Aplicar un pulso eléctrico con el electroporador *BioRad GenePluser II* de BioRad con los siguientes parámetros: 500 Ω, 10 µF y 2,5 Kv. Debe transcurrir un tiempo de paso de corriente de entre 4,5 y 4,9 ms.
- ✓ 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 4 h a 30 °C.
- ✓ Sembrar en placas de LA suplementadas con los antibióticos pertinentes. Incubar toda la noche a 30 °C.
- ✓ Comprobar mediante PCR la introducción del ADN en *E. coli*.

3.7. Introducción de ADN en *Streptomyces*

La introducción de material genético en las diferentes cepas de *Streptomyces* se llevó a cabo por transferencia intergenérica empleando como donador *E. coli* ET12567/pUZ8002, que carece de los sistemas de metilación *dam*, *dcm* y *hsd*, y posee el plásmido pUZ8002. Esta cepa es incapaz de degradar el ADN exógeno y moviliza vectores que contienen en su secuencia un *oriT* (MacNeil y col., 1992; Paget y col., 1999a). Si además de transferir un plásmido, se desean forzar procesos de recombinación que permitan la interrupción o delección de un gen, el vector debe ser no replicativo en *S. clavuligerus*. Como células receptoras pueden usarse esporas o micelio de *Streptomyces*. El protocolo de conjugación que se ha seguido es el descrito por Kieser y col. (2000).

Procedimiento

- ✓ Se inocula una colonia o 100 µl de las células conservadas en glicerol de *E. coli* ET12567/pUZ8002 portadoras del plásmido o cósmido que se desea transferir, en 50 ml de LB con kanamicina y cloranfenicol, antibióticos de selección del cromosoma y pUZ8002, respectivamente, y el antibiótico de selección al cual confiere la resistencia el material genético a transferir. Se incuba a 37 °C 250 rpm durante 12 h.

- ✓ Se inocula 1 ml del cultivo anterior en 100 ml de LB con los mismos antibióticos que en el paso anterior y se incuba a 37 °C y 250 rpm hasta alcanzar una DO_{600} de 0,3-0,8 unidades.
- ✓ Las células se recogen por centrifugación a 4 °C durante 10 min a 4500 rpm, se lavan con 10 ml de LB para eliminar los antibióticos y se resuspenden en 1 ml de LB.
- ✓ Mientras se lavan las células de *E. coli*, se añaden 10 μ l (10^6 - 10^8 UFC) de esporas de *Streptomyces* en 500 μ l de medio 2xTY, se someten a un choque térmico de 10 min a 50 °C y se dejan atemperar. Cuando se utilizaron cepas de *Streptomyces* que no esporulaban, se recogió una pequeña cantidad de micelio de 24 h de crecimiento en TSA con un bastoncillo de algodón, se añadió el medio 2xTY y se disgregó con un breve pulso en el vortex.
- ✓ Se mezclan 500 μ l de la suspensión celular de *E. coli* y 500 μ l de la suspensión de esporas o micelio de *Streptomyces* y se da un pulso breve. Se elimina la mayoría del sobrenadante y se resuspende la mezcla en unos 300 μ l restantes.
- ✓ La nueva suspensión se siembra en placas de MS suplementado con $MgCl_2$ a una concentración final de 10 mM y se incuba a 28 °C o 30 °C, según la temperatura óptima de cada *Streptomyces*. Las placas de MS se prepararon dispensando aproximadamente 34 ml de medio por placa de 9 cm de diámetro, de modo que hubiera suficiente medio para el periodo de incubación tras la selección con el antibiótico, y que la concentración de antibiótico indicada fuera la deseada.
- ✓ Transcurrido el periodo de conjugación, 8 h, en el caso de *S. albus* y *S. flavogriseus*, o 16 h, en el de *S. clavuligerus* y *S. coelicolor*, se añade a cada placa 1 ml de agua con 0,5 mg de ácido nalidíxico y 1,25 mg de apramicina, kanamicina e/o higromicina, según el antibiótico que se requiera para la selección de los exconjugantes de *Streptomyces*. Las placas se dejan secar en la campana de flujo laminar y se incuban a la temperatura óptima para cada *Streptomyces*: 4-5 días en el caso de *S. albus* y *S. flavogriseus* y 6-8 días en el caso de *S. clavuligerus* y *S. coelicolor*.
- ✓ Obtenidos los exconjugantes, se siembra cada uno de ellos en forma de pequeños cuadrados con palillos estériles en placas de TSA con ácido nalidíxico y el antibiótico de selección correspondiente: apramicina, kanamicina e/o higromicina.
- ✓ Tras 1 o 2 días, cuando los exconjugantes han crecido en el medio de selección esperado, se siembran de nuevo, como en el paso anterior, para confirmar su resistencia y asegurar la eliminación de *E. coli* por la selección con ácido nalidíxico.

3.8. Obtención de mutantes mediante ReDirect[®]

La tecnología ReDirect[®] permite la obtención de mutantes mediante el reemplazamiento del gen de estudio por un casete de resistencia obtenido por PCR (Gust y col., 2004). Esta técnica ha sido desarrollada en el centro John Innes (Reino Unido) para *S. coelicolor* (Gust y col., 2002), por lo que precisa de las pertinentes modificaciones y optimizaciones para su aplicación con éxito a otras especies de *Streptomyces*, y consta básicamente de tres partes.

Primero, el gen de interés que se desea eliminar ha de estar clonado en un vector replicativo de *E. coli*, generalmente un cósmido. Dicha construcción se introduce en la cepa *E. coli* BW25113/pIJ790 que contiene los genes *red* del sistema de recombinación del bacteriófago lambda. 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. Este producto de PCR es un casete delimitado por secuencias de 39 nt, homólogas a las que flanquean el gen que se va a reemplazar, y que contiene un gen de resistencia a antibiótico y el origen de transferencia *oriT*.

Una vez se ha obtenido el cósmido recombinante, la construcción se recupera y transforma en *E. coli* ET12567/pUZ8002, cepa deficiente en metilación que actúa como intermediaria, para que en el paso siguiente la construcción no se vea afectada por el potente sistema de restricción específico de metilación que tienen muchas de las especies del género *Streptomyces*. Como se ha indicado, esta cepa de *E. coli* posee el plásmido pUZ8002 capaz de movilizar vectores que contengan el origen de transferencia *oriT* desde *E. coli* hacia *Streptomyces* mediante conjugación. Una vez que *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.

3.8.1. Purificación del molde para la obtención del producto de PCR

En el centro John Innes se han desarrollado diferentes plásmidos con casetes de resistencia (<http://streptomyces.org.uk/redirect/cassettes/index.html>). En el presente trabajo se ha utilizado el plásmido pIJ774.

El uso de los plásmidos completos como molde para la obtención del casete de resistencia por PCR genera un gran número de falsos positivos. Esto se debe a que el plásmido superenrollado compite con el fragmento de PCR lineal y resulta en la obtención de transformantes resistentes al antibiótico pero que no han delecionado el gen. Por ello, es importante obtener la secuencia molde por digestión con enzimas de restricción y purificarla.

Procedimiento

- ✓ Digerir 10 µg del plásmido pIJ774 con *EcoRI* y *HindIII*.
- ✓ Separar los dos fragmentos de digestión por electroforesis en un gel de agarosa al 0,8 % y cortar la posición del gel que contiene el casete de resistencia (1382 pb).
- ✓ Purificar el casete mediante el kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* o el método *Freeze and Squeeze*, resuspender en agua y determinar su concentración. Conservar a -20 °C.
- ✓ Comprobar la ausencia de plásmido mediante la transformación de células competentes de *E. coli* DH5α con una alícuota (100 ng) de la suspensión purificada. Si se obtiene alguna célula transformante, purificar de nuevo el casete. En caso contrario, continuar con el protocolo.

3.8.2. Diseño de los cebadores para la obtención del producto de PCR

La deleción de un determinado gen requiere del diseño de una pareja de cebadores específicos. Cada cebador se compone de 58 o 59 nt, en 5' contiene 39 nt idénticos a la secuencia que flanquea el gen de *Streptomyces* que se desea eliminar y en 3' presenta 19 o 20 nt que hibridan con las secuencias flanqueantes del casete de resistencia elegido (figura 3.1). Todos los casetes de resistencia tienen las mismas secuencias flanqueantes P1 y P2 (figura 3.1), excepto la del plasmido pIJ774 que contiene un nucleótido menos en P1 (Khodakaramian y col., 2006).

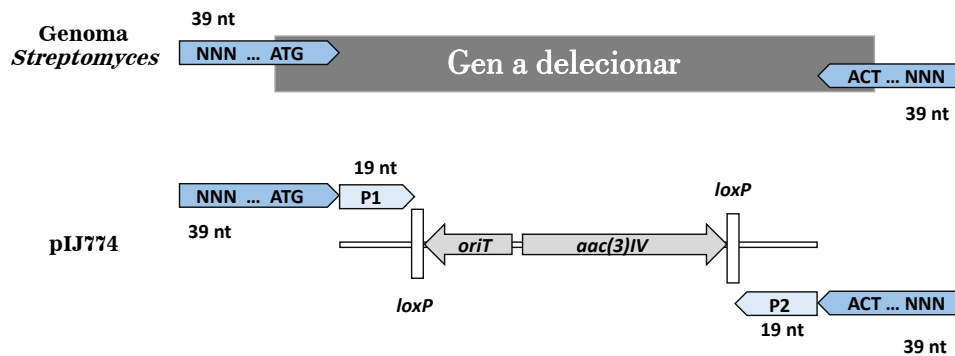


Figura 3.1: Diseño de los cebadores para la amplificación del casete de resistencia. Los cebadores, en azul, tienen una secuencia mixta: el extremo 5' contiene una secuencia idéntica a la flanqueante del gen a deleccionar, incluido el codón de inicio y de fin; el extremo 3' está constituido por las secuencias P1 y P2, flanqueantes al casete de resistencia.

3.8.3. Amplificación por PCR del casete de resistencia

Es recomendable utilizar una ADN polimerasa de alta fidelidad para evitar la generación de errores en la amplificación del casete de resistencia, los cuales pueden originar productos no funcionales para los pasos posteriores del protocolo. En el presente trabajo se ha usado la polimerasa *Phusion® Hot Start DNA polymerase* (Finnzymes). A continuación se detalla la mezcla de PCR y el programa seguido:

Mezcla de PCR		Programa de PCR	
Tampón GC 5X	4 µl	Desnaturalización inicial	98 °C 2 min
DMSO	1 µl	Desnaturalización	98 °C 30 s
MgCl ₂ (50 mM)	0,2 µl	Hibridación	48 °C 30 s
dNTPs (2 mM)	2 µl	Extensión	72 °C 90 s
Cebadores (10 µM)	0,5 µl / cebador	Extensión final	72 °C 5 min
ADN molde	20 ng		
<i>Phusion®</i>	0,2 µl		
Agua Milli-Q	Hasta 20 µl		

Tabla 3.5. (izquierda). Componentes necesarios para realizar la reacción de PCR en un volumen final de 20 µl. **Tabla 3.6.** (derecha). Tiempos y temperaturas de reacción.

Tras la PCR, se analizan 2 μ l de la mezcla de reacción mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8 %. Si la amplificación ha sido correcta, se ha de ver un único fragmento un poco mayor del tamaño del molde utilizado para la PCR, ya que los cebadores añaden al producto 117 nt. Los 18 μ l restantes se purifican con el kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* y se determina su concentración.

3.8.4. Introducción por electroporación en *E. coli* BW25113/pIJ790 del cósmido portador del gen a sustituir

El plásmido pIJ790 codifica las funciones necesarias para la recombinación *in vivo* entre el fragmento de PCR y el cósmido que contiene la región que se quiere delecionar. Este plásmido presenta un origen de replicación sensible a la temperatura que permite su replicación en la célula transformante a 30 °C, pero no a 37 °C.

El cósmido portador del gen a sustituir es introducido en *E. coli* BW25113/pIJ790 por electroporación como se indica en los apartados 3.6.1 y 3.6.3. En particular, los 100 ml de SOB de cultivo para *E. coli* BW25113/pIJ790 se han de suplementar con MgSO₄ a una concentración final de 20 mM y con cloranfenicol. Para la siembra de los transformantes, las placas de LA se suplementan con cloranfenicol para el mantenimiento de pIJ790, y kanamicina y ampicilina para la selección del cósmido.

3.8.5. Sustitución del gen de interés por el casete de resistencia

Las colonias de *E. coli* BW25113/pIJ790/cósmido de interés son electrotransformadas con el casete de resistencia obtenido mediante PCR (apartado 3.8.3) como se indica en los apartados 3.6.1 y 3.6.3. En particular, los 100 ml de SOB (sin MgSO₄) se han de suplementar con L-arabinosa a una concentración final de 20 mM, necesaria para inducir la expresión de los genes *red*, además de los antibióticos que correspondan, en este caso, cloranfenicol, para el mantenimiento de pIJ790, y los antibióticos de selección del cósmido SuperCos 1, ampicilina y kanamicina, y del casete de interrupción, apramicina. Las placas de LA se suplementan con estos mismos cuatro antibióticos.

Tras comprobar que la recombinación entre el fragmento de PCR y el cósmido se ha producido, extraer los cósmidos recombinantes mediante lisis alcalina (apartado 3.5.1.2). Conviene realizar la extracción tan pronto como sea posible porque se pueden producir reorganizaciones dado que las células BW25113 son altamente recombinogénicas.

En la misma colonia de *E. coli* BW25113 pueden coexistir cósmidos recombinantes y cósmidos silvestres. Sin embargo, estos últimos se perderán durante la transformación a la siguiente cepa de *E. coli* porque carecen del gen de resistencia al antibiótico que se suministrará al cultivo, *aac(3)IV* para apramicina, en este caso, y, además, no contienen *oriT* por lo que no podrán ser transferidos por conjugación a *Streptomyces*.

3.8.6. Transferencia del cósmido recombinante a *Streptomyces*

La transferencia se produce mediante conjugación intergenérica entre *E. coli* y *Streptomyces* como se indica en el apartado 3.7. Finalmente, se comprueba el genotipo de los exconjugantes seleccionados, por ejemplo mediante PCR empleando el ADN total, un cebador correspondiente a una secuencia contigua a la del gen deleciónado y el otro a una secuencia interna a la del casete de resistencia insertado.

3.9. Detección, cuantificación e identificación de metabolitos secundarios

En el presente trabajo se ha analizado la producción en diversos medios de cultivo, sólidos y líquidos, de ácido clavulánico, ácido clavamínico, cefamicina C, holomicina, nocardamina, tunicamicina y de un compuesto con actividad frente a *C. utilis*.

3.9.1. Desarrollo de las fermentaciones y toma de las muestras

Los cultivos para la fermentación pueden iniciarse inoculando un número determinado de esporas o con un preinóculo obtenido a partir de micelio congelado en glicerol cuando las cepas a analizar tienen deficiencias en la esporulación. Ya que algunas de las cepas utilizadas en el presente trabajo no esporulan, se utilizaron preinóculos para iniciar las fermentaciones. Cuando se trabajó en medio líquido con *S. coelicolor*, dado su crecimiento en pequeños agregados compactos de micelio, los cultivos se iniciaron con esporas. Es importante mantener el *stock* de gliceroles y utilizar el mismo incubador para garantizar la reproducibilidad del proceso en cuanto a la órbita de agitación, rpm y temperatura. El análisis de cada cepa y condición de cultivo empleadas en la fermentación se realizó con los datos obtenidos a partir de dos o tres réplicas biológicas cultivadas en matraz con hendiduras.

Procedimiento

- ✓ Inocular 100 ml de TSB con 0,1-2,0 ml de micelio congelado en glicerol. Este cultivo constituye el preinóculo de la fermentación. Se pueden iniciar varios matraces por cepa con distintos volúmenes de micelio para asegurarse que alguno de ellos esté en el rango de DO₆₀₀ adecuada al final del tiempo de

incubación. Es importante que los cultivos de cepas diferentes se encuentren a una densidad óptica y en un estado morfológico similar en el momento de establecer los inóculos.

- ✓ Cultivar durante 20-24 h hasta alcanzar una DO_{600} de entre 5 y 8, para asegurarse de que *Streptomyces* se encuentre en la fase de crecimiento exponencial.
- ✓ Recoger 5 ml del preinóculo a DO_{600} de 5 en tubos de tipo Falcón. Si el valor de la DO_{600} es superior, ajustar el volumen de manera inversamente proporcional.
- ✓ Centrifugar 10 min a 4500 rpm a temperatura ambiente y desechar el sobrenadante. Lavar el micelio con 5 ml de NaCl 0,9 % y volver a centrifugar, desechando el sobrenadante.
- ✓ Resuspender el micelio suavemente en 2,5 ml de NaCl 0,9 % y añadir a 100 ml del medio de cultivo elegido. La concentración del micelio será de DO_{600} 0,4. Cuando el inóculo se hizo directamente con esporas, se emplearon 10^6 UFC por 100 ml de medio de cultivo.
- ✓ En los tiempos de fermentación seleccionados recoger 1 ml de cultivo de cada matraz en tubos de 2 ml mantenidos en hielo.
- ✓ Centrifugar las muestras 10 min a 13200 rpm y a 4 °C. Transferir el sobrenadante a un tubo de 1,5 ml mantenido en hielo y guardar a -80 °C.
- ✓ Resuspender el micelio remanente en 1 ml de NaCl 0,9 %, centrifugar 10 min a 14000 rpm y 4 °C. Eliminar el sobrenadante y guardar a -20 °C para medir posteriormente la concentración de ADN.

3.9.2. Determinación del contenido de ADN

La medida del crecimiento durante las fermentaciones se realizó a través de la cuantificación del 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.

Procedimiento

- ✓ Preparar una serie de diluciones de ADN patrón y un blanco de NaOH 5 mM. Una alícuota de estos se procesa simultáneamente con las muestras de fermentación.
- ✓ Resuspender las muestras de micelio en el doble del volumen de partida (2 ml) con NaCl 0,9 % y homogeneizar en el *vortex*. Se pueden hacer diluciones mayores si se espera una alta concentración de ADN.
- ✓ Añadir 400 μ l de $HClO_4$ a 400 μ l de cada muestra, patrón o blanco. Mezclar por inversión e incubar durante 20 min en baño de 65 °C.
- ✓ Añadir 800 μ l (2 volúmenes) de reactivo de difenilamina a cada tubo, mezclar por inversión e incubar a 30 °C durante 15-17 h.
- ✓ Mezclar los tubos por inversión y centrifugar durante 5 min a 13200 rpm para precipitar los restos celulares.
- ✓ Medir a 600 nm la absorbancia de las muestras y de los patrones de ADN de concentración conocida.
- ✓ Representar los valores de absorbancia de los patrones de ADN frente a su concentración. Calcular, mediante regresión lineal, la concentración de las muestras referidas en μ g ADN/ml. Multiplicar por el factor de dilución aplicado para obtener el valor final.

Soluciones

- ❖ **Acetaldehído acuoso (1,6 % p/v):** 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 H₂SO₄. La solución es estable durante 3 meses si se mantiene a 4 °C y en oscuridad. En el momento de usar, añadir 100 µl de acetaldehído acuoso al 1,6 % por cada 20 ml de reactivo de difenilamina.
- ❖ **Soluciones patrón de ADN:** Preparar una solución madre diluyendo ADN de esperma de arenque parcialmente digerido (Sigma) a concentración de 0,3 mg/ml en NaOH 5 mM. Guardar a 4 °C un máximo de 6 meses. Preparar las diluciones de ADN patrón según lo indicado en la tabla 3.7:

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

Tabla 3.7. Diluciones de ADN de la recta patrón

3.9.3. Detección y cuantificación de compuestos antimicrobianos por bioensayo

3.9.3.1. Cuantificación de ácido clavulánico

La determinación de la concentración de ácido clavulánico se realizó con el microorganismo indicador productor de β-lactamasas *K. pneumoniae* ATCC 29665, sensible a ácido clavulánico en presencia de penicilina G. Todas las muestras se analizaron mediante réplicas en dos placas diferentes. El protocolo se basa en el desarrollado en nuestro laboratorio por Romero y col. (1984).

Procedimiento

- ✓ Cultivar la cepa indicadora en medio TSB a 30 °C hasta que alcance una DO₆₀₀ de 1-1,3. Conservar a 4 °C durante un tiempo máximo de 3 días.
- ✓ Fundir una botella de 140 ml de TSB con 2 % de agar y dejar enfriar a 46 °C en un baño. Añadir 140 µl de penicilina G 10 mg/ml y un volumen del cultivo de *K. pneumoniae* de forma que la DO₆₀₀ final sea de 0,033. Agitar suavemente para evitar la formación de burbujas y verter sobre una placa de bioensayo nivelada de 24 cm de lado. Una vez solidificado el agar, hacer pocillos de 6 mm de diámetro con un sacabocados.
- ✓ Añadir 60 µl de muestra en los pocillos. En el caso de las muestras que correspondan a las fases de mayor producción, realizar también diluciones de ellas. Incluir en cada placa las diluciones de ácido clavulánico de concentración conocida para realizar un recta patrón.
- ✓ Incubar a 4 °C durante 2 h para que difunda el antibiótico desde los pocillos.

- ✓ Incubar a 30 °C durante 12-15 h 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 (por lo general la dilución de 10 µg/ml).
- ✓ Realizar una recta patrón con las muestras de concentración conocida, representando el logaritmo decimal de la concentración frente al diámetro de halo en milímetros. 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 40 µg/ml de ácido clavulánico preparada en tampón MOPS 100 mM pH 6,8.

3.9.3.2. Cuantificación de cefamicina C

La determinación de la concentración de cefamicina C se llevó a cabo con el microorganismo indicador *E.coli* Ess22-31, cepa supersensible a antibióticos β-lactámicos. El protocolo se basa en el desarrollado en nuestro laboratorio por Romero y col. (1984). Para preparar las placas de bioensayo se siguió el mismo método que en el apartado 3.9.3.1, pero no se añadió penicilina G al medio TSA atemperado y mezclado con *E. coli* Ess22-31. 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:

$$y = 10^{[(0,0033351 \cdot x^2) - (0,0162 \cdot x) - 0,07535]}$$

en la que y representa la concentración de cefamicina C en µg/ml y x el diámetro del halo en milímetros.

La detección cualitativa de la producción heteróloga de cefamicina C se realizó desde cultivo sólido. Para ello, las cepas de *Streptomyces* se cultivaron previamente en medio TSB durante 24-36 horas hasta alcanzar un cultivo de alta densidad óptica, luego se sembraron en TSA donde crecieron durante 24-36 horas, y de ahí se sembraron en el medio sólido de producción definitivo. A diferentes tiempos de crecimiento, se extrajeron de estas placas cilindros de medio con ayuda de un sacabocados de 6 mm de diámetro y se depositaron sobre las placas de bioensayo con el extremo en el que no hay micelio en contacto con el medio. Las placas de bioensayo se prepararon e incubaron como se indica en este mismo apartado, pero empleando TSA al 1 % y 6 horas de difusión a 4 °C.

3.9.3.3. Cuantificación de holomicina

La determinación de la concentración de holomicina se llevó a cabo con la cepa *M. luteus* ATCC 9341 sensible a holomicina (Kenig y Reading, 1979). Para realizar los bioensayos se utilizó el mismo protocolo que en el apartado 3.9.3.1, excepto en que se emplearon 100 ml de medio TSB con 1 % de agar suplementado con *M. luteus* para cada placa de 24 cm de lado.

La recta patrón se calculó representando el logaritmo decimal de la concentración de las muestras patrón frente al diámetro de halo en milímetros. Los valores del diámetro de halo de las muestras problema se extrapolaron en la recta patrón y, de este modo, se calculó el valor del antilogaritmo o valores de la concentración de holomicina ($\mu\text{g/ml}$) de las muestras problema.

Soluciones

- ❖ **Soluciones patrón de holomicina.** Muestras de holomicina en agua con las siguientes concentraciones: 40; 20; 10; 7; 5; 3,5; 2,5 y 1,25 $\mu\text{g/ml}$. Se realizan a partir de una solución de 100 $\mu\text{g/ml}$ de holomicina, preparada en metanol al 60 %.

3.9.3.4. Detección de un compuesto antifúngico

La expresión heteróloga del regulador *pimM* indujo la formación de uno o varios compuestos antifúngicos en *S. clavuligerus::pimM*. La detección de este compuesto se realizó en medio sólido y líquido, ya que la producción de metabolitos puede verse favorecida por el cultivo del microorganismo en medio sólido frente al medio líquido (Barrios-González y col., 2003; López-Calleja y col., 2012).

3.9.3.4.1. Detección en cultivo sólido

Las cepas de *S. clavuligerus::pimM* y *S. clavuligerus::pIB139* se cultivaron previamente en TSB durante 24-36 horas hasta alcanzar un cultivo de alta densidad óptica, luego se sembraron en TSA donde crecieron durante 24-36 horas y de ahí se sembraron en los medios de cultivo TBO, MEY, MS, ME, ISP4, 2xTY, R2YEGm, TSA, R5m y SA. A diferentes tiempos de crecimiento, se extrajeron de estas placas cilindros de medio con ayuda de un sacabocados de 6 mm de diámetro y se depositaron sobre las placas de bioensayo con el extremo en el que hay micelio, en contacto con el medio, dado que muchos compuestos antifúngicos por su estructura química tienden a quedar asociados al micelio en lugar de difundir. Estas placas se prepararon y se incubaron como se indica en el «Procedimiento» del apartado 3.9.3.4.3.

3.9.3.4.2. Detección en extractos concentrados procedentes de cultivo sólido

Dado el pequeño tamaño de los halos de inhibición frente a *C. utilis* detectados con los bioensayos en taco de *S. clavuligerus::pimM*, se procedió a la extracción del compuesto o compuestos con actividad antifúngica desde los cultivos sólidos. Se cultivaron placas de 9 cm de diámetro y a los diferentes tiempos de estudio, con el microorganismo crecido homogéneamente en la superficie de la placa con 25 ml de medio se cortó la unidad del bloque de medio sólido, se troceó y se mezcló en un tubo tipo Falcón con 60 ml de metanol. Tras agitar en *vortex* durante unos 15 minutos, el extracto se filtró con papel de filtro para eliminar el agar, el micelio y los otros restos sólidos, se juntaron los 60 ml de extracto filtrado correspondiente a una placa y se concentraron en una centrífuga de vacío a temperatura ambiente hasta un volumen final de 1-2 ml. El extracto concentrado se analizó por bioensayo frente a *C. utilis* como se indica en el «Procedimiento» del apartado 3.9.3.4.3.

3.9.3.4.3. Detección en extractos concentrados procedentes de cultivo líquido

Una vez que se determinó que en el medio de cultivo sólido MEY se producían mayores niveles de compuesto/s con actividad antifúngica, se procedió al análisis de la producción en este medio de cultivo en líquido. El crecimiento en medio líquido de la cepa productora permite el análisis separado del micelio y del caldo del cultivo, lo que supone una mejor caracterización del metabolito producido. Tras el tiempo de incubación que se pretendía analizar, se recogió, por separado, el micelio y el sobrenadante de 100 ml de cultivo y se añadieron 30 ml de metanol al micelio y 1 volumen de metanol por volumen de sobrenadante del cultivo de un matraz, se agitó durante 15 minutos con *vortex*, se filtró con papel de filtro y se concentró en la centrífuga de vacío hasta un volumen final de 1-2 ml. El extracto concentrado se analizó por bioensayo frente a *C. utilis* como se indica en el «Procedimiento» en el presente apartado.

Procedimiento

- ✓ Cultivar la cepa indicadora en medio YED a 30 °C hasta que alcance una DO_{600} de 1-1,3. Conservar a 4 °C durante un periodo de tiempo máximo de 2 días.
- ✓ Fundir una botella de YED (100 ml, 1 % agar) y dejar enfriar a 46 °C en un baño. Añadir un volumen del cultivo de *C. utilis* de forma que la DO_{600} final sea de 0,014. Agitar suavemente para evitar la formación de burbujas y verter sobre una placa de bioensayo nivelada de 24 cm de lado. Esperar a que solidifique el agar.
- ✓ Si las muestras son tacos de agar con el cultivo de *Streptomyces* a ensayar, se colocan en contacto con el medio del bioensayo.
- ✓ Si las muestras son extractos concentrados del cultivo sólido o líquido, se hacen pocillos de 6 mm de diámetro con un sacabocados y se dispensan 50 µl del extracto concentrado en un pocillo. Se pueden

incluir en cada placa las soluciones de anfotericina de concentración conocida como control del bioensayo.

- ✓ Incubar a 4 °C durante 6 h para que difunda el antibiótico.
- ✓ Incubar a 30 °C durante 12-15 h y medir los halos de inhibición.

Soluciones

- ❖ **Soluciones patrón de anfotericina.** Muestras de anfotericina con las siguientes concentraciones: 3; 0,3; 0,03 y 0,003 mg/ml. Se realizan a partir de una solución de anfotericina B de 30 mg/ml, preparada en DMSO. Estas soluciones se emplearon como control del bioensayo.

3.9.4. Identificación de compuestos antimicrobianos

La identificación de cefamicina C, ácido clavamínico, ácido clavulánico, nocardamina, tunicamicina y del compuesto antifúngico sintetizados por los distintos mutantes se realizó mediante cromatografía.

3.9.4.1. Análisis de cefamicina C por HPLC-MS

La identificación de la cefamicina C producida de forma heteróloga por *S. flavogriseus*::[SCos-CF] fue realizada por el Dr. Alfredo F. Braña mediante HPLC-MS en la Universidad de Oviedo a partir del caldo de cultivo en medio TBO a las 96 horas. Se empleó una columna *Atlantis T3* (2,1 x 150 mm, 3 µm de tamaño de partícula) de Waters. La fase móvil utilizada fue acetonitrilo con agua acidificada en un 0,1 % con ácido trifluoroacético. Las muestras (2,5 µl) se inyectaron y eluyeron con un flujo de 0,25 ml/min y un gradiente de 20 minutos desde 0 a 20 % de acetonitrilo. La detección se realizó por absorción a 264 nm con un PDA (del inglés, *photodiode array*) y espectrometría de masas (MS) por monitorización del ion seleccionado *m/z* 447,2. La cefamicina C purificada desde un cultivo de *S. clavuligerus* por HPLC fue utilizada como estándar.

3.9.4.2. Análisis de ácido clavamínico y clavulánico por HPLC

La identificación de los ácidos clavamínico y clavulánico producidos por *S. clavuligerus* Δ *clAR::aac* y la cepa silvestre se realizó mediante HPLC según las indicaciones de Paradkar y col. (1998) excepto en que el flujo fue 1 ml/min y el pH de la fase móvil 3,2. Primeramente, el ácido clavamínico y el ácido clavulánico de las muestras de cultivo en medio SA a las 42 h fueron derivatizados por reacción con imidazol, lo que proporciona un compuesto estable cuyo cromóforo absorbe luz de 311 nm de longitud de onda. Para ello, a los sobrenadantes recogidos de las muestras de fermentación se les añadió ¼ de volumen de reactivo de imidazol y se mantuvieron una hora a temperatura ambiente para desarrollar la reacción de derivatización. Preparadas las muestras, el análisis cromatográfico se realizó empleando una columna *Nucleosil*

C18 (4 x 250 mm, 5 µm de tamaño de partícula) de Teknokroma acoplada a unidad *Waters 2690 Alliance*. La fase móvil utilizada fue KH_2PO_4 0,1 M acidificado a pH 3,2 con H_2PO_4 , añadiendo posteriormente 6 % de metanol. Las muestras (100 µl) se inyectaron y eluyeron con un flujo isocrático de 1 ml/min. La detección se realizó por absorción a 311 nm con un PDA. La identificación de los picos se realizó a partir de los descritos por Paradkar y col. (1998).

Soluciones

- ❖ **Reactivo de imidazol:** disolver 8,25 g de imidazol en 24 ml de agua destilada con 2 ml de HCl 5 M. Llevar a un volumen de 40 ml y ajustar a pH 6,8 con HCl 5 M. La solución se almacena a temperatura ambiente y es estable durante 2-3 meses.

3.9.4.3. Análisis de nocardamina por HPLC

La identificación de la nocardamina producida por *S. clavuligerus::pimM* y *S. clavuligerus::pIB139* fue realizada mediante HPLC a partir del extracto metanólico concentrado desde el cultivo líquido en medio MEY a las 87 h (apartado 3.9.3.4.3). Se empleó una columna *Nucleosil C18* (4 x 250 mm, 5 µm de tamaño de partícula) de Teknokroma acoplada a unidad *Waters 2690 Alliance*. La fase móvil utilizada fue una mezcla de acetonitrilo y agua. Las muestras (50 µl) se inyectaron y eluyeron con un flujo de 0,8 ml/min de acuerdo al siguiente programa de gradiente: 6:94 v/v 0-3 min, hasta 40:60 v/v 3-25 min, 6:94 v/v 25-30 min. La detección se realizó por absorción a 220 nm con un PDA. La nocardamina pura suministrada por Genaxxon Bioscience fue empleada como control estándar, siendo su tiempo de retención 19,5 minutos.

3.9.4.4. Análisis de tunicamicina por LC-MS

La identificación de tunicamicina producida por *S. clavuligerus::pimM* fue realizada por el Dr. José R. Tormo y Jesús Martín en la Fundación Medina de Granada mediante LC-MS a partir de las alícuotas con actividad frente a *C. utilis* obtenidas desde un HPLC preparativo y concentradas como se indica en el apartado 3.9.4.5.

3.9.4.4.1. Análisis de los perfiles y cuantificación de los iones específicos mediante HPLC-LRMS

La cromatografía líquida de alta presión (HPLC) acoplada a espectrometría de masas de baja resolución (LRMS, del inglés, *Low Resolution Mass Spectrometry*) se empleó para el análisis de los perfiles y la cuantificación de los iones específicos. Las muestras (2 µl) fueron analizadas por HPLC-LRMS. La cromatografía líquida fue llevada a cabo en un equipo *Agilent 1100*, empleando

una columna *Zorbax SB-C8* (2,1 × 30 mm), mantenida a 40 °C y un flujo de 300 µl/min. El solvente A fue 10 % de acetonitrilo y 90 % de agua con 0,01 % de ácido trifluoroacético y 1,3 mM de formiato amónico. El solvente B fue 90 % de acetonitrilo y 10 % de agua con 0,01 % de ácido trifluoroacético y 1,3 mM de formiato amónico. El gradiente inicial fue de 10 % de solvente B y ascendió a 100 % de este solvente en 6 minutos, manteniéndose al 100 % durante 2 minutos y volviendo al 10 % de B en 2 minutos para inicializar el sistema. Los datos se recogieron a intervalos de 4 nm en el rango de longitudes de onda entre 100 y 900 nm. La espectrometría de masas de baja resolución fue realizada por un espectrómetro de masas *Agilent MSD 1100* para obtener los datos metabolómicos crudos.

3.9.4.4.2. Búsqueda en bases de datos de metabolitos y antibióticos conocidos

La cromatografía líquida de alta presión y rápida resolución (RRHPLC, del inglés, *Rapid Resolution HPLC*) acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (HRMS del inglés, *High Resolution Mass Spectrometry*) se empleó para la búsqueda en bases de datos de metabolitos y antibióticos conocidos. Un espectrómetro de masas *Bruker maXis HR-QTOF* (Bruker Daltonics GmbH) acoplado a un sistema *Agilent 1200 RRHPLC* fue empleado para la identificación de metabolitos específicos. El método de cromatografía líquida fue equivalente al empleado en el de HPLC-LRMS para el análisis de los perfiles, mientras que la ionización del solvente eluido fue obtenida utilizando unas fuentes ESI estándar ajustadas a una evaporación por flujo de gas de 11 L/min a 200 °C y presión de nebulización de 40 psig. El voltaje de capilaridad fue ajustado a 4000 V. El espectro de masas de alta resolución analizado fue de entre 150 m/z y 2000 m/z en modo positivo. La búsqueda en la base de datos fue realizada por comparación del tiempo de retención y las masas exactas generadas con el *Bruker maXis* a partir de los componentes extraídos de las muestras de estudio, con los tiempos de retención y las masas exactas de los metabolitos conocidos almacenados en una base de datos de unas 800 moléculas adquirida bajo las mismas condiciones LC-HRMS.

3.9.4.5. Detección y análisis de un compuesto antifúngico

Con el objetivo de aislar y caracterizar el compuesto con actividad antifúngica, el extracto concentrado desde el micelio de un cultivo líquido (apartado 3.9.3.4.3) de *S. clavuligerus::pimM*, *S. clavuligerus::pIB139* y *S. clavuligerus* se analizó por HPLC. Para ello se utilizó una columna *Nucleosil C18* (4 x 250 mm, 5 µm de tamaño de partícula) de Teknokroma acoplada a una unidad *Waters 2690 Alliance*. La fase móvil empleada fue metanol y agua. Las muestras (50 µl) se

inyectaron y eluyeron con un flujo de 0,8 ml/min de acuerdo con el siguiente programa: 50:50 v/v 0-3 min, hasta 90:10 v/v 3-12 min, 90:10 v/v 12-30 min, hasta 100 % metanol 30-35 min, 100 % metanol 35-45 min, hasta 50:50 v/v 45-50 min, a 50:50 v/v 50-55 min. Se realizó un barrido de longitudes de onda de absorción entre 250 y 400 nm con un PDA. Las alícuotas del eluido del HPLC fueron recogidas entre los minutos 0-3, 3-12, 12-30, 30-35, 35-45, 45-50, y 50-55, concentradas hasta un volumen final de 100 µl y se analizó su actividad frente a *C. utilis*.

Una vez detectada la actividad frente a *C. utilis* en la alícuota 3-12 min eluída tras el procesamiento por HPLC, con el objetivo de obtener una muestra más concentrada en el compuesto antifúngico y analizar la naturaleza del mismo mediante espectrometría de masas, el extracto del micelio de 2,2 litros de cultivo de *S. clavuligerus::pimM* en medio MEY a las 96 horas se concentró y la alícuota completa se analizó mediante HPLC preparativo por el Dr. Jose R. Tormo en la Fundación Medina de Granada. Para ello se pinchó el extracto concentrado en un equipo *Gilson 322 PUMP*, con una columna *Zorbax SB-C8* (4 x 250 mm, 5 µm de tamaño de partícula) y con un flujo de 3,2 ml/min. La fase móvil fue acetonitrilo y agua de acuerdo con el siguiente programa: 10:90 v/v 0-18 min, 15:85 v/v 18-23 min, 25:75 v/v 23-27 min, 45:55 v/v 27-30 min, 65:35 v/v 30-33 min, 100 v/v 33-42 min. Se recogieron alícuotas de 1600 µl cada 30 s. De este volumen, 600 µl se concentraron por calor a 36 °C a sequedad y se resuspendieron en unos 200 µl DMSO al 20 % para ser ensayados frente a *C. utilis*. El mililitro restante se conservó refrigerado para el posterior análisis mediante cromatografía y espectrometría de masas de las alícuotas con actividad antifúngica como se indica en el apartado 3.9.4.4.

3.10. Métodos relacionados con la manipulación y análisis de ARN

La susceptibilidad del ARN a procesos degradativos debido a su estructura química, junto con la práctica ubicuidad de las ARNasas en el ambiente, hacen necesaria la adopción de medidas de precaución durante la extracción y el manejo de las muestras de ARN. Todo el material empleado en el protocolo se manipuló con guantes de uso exclusivo de ARN, que se cambiaron con cierta frecuencia. Las superficies, las micropipetas, el rotor y la tapa de la centrífuga, así como el material no esterilizable en el autoclave fueron tratados con un sistema inhibidor de ARNasas, *RNaseZap*® (Thermo Fisher Scientific). La superficie de la mesa de trabajo se cubrió con papel de filtro de uso exclusivo de ARN. El agua Milli-Q, la solución de TE y el material de plástico desechable (puntas y tubos) fueron esterilizados en el autoclave dos veces consecutivas envueltos en papel de filtro para facilitar el almacenamiento hasta su uso.

3.10.1. Aislamiento de ARN total de *Streptomyces*

El protocolo seguido para obtener el ARN ha sido optimizado para *S. clavuligerus* en nuestro grupo e incorpora algunas de las recomendaciones indicadas para la extracción de ARN de *Streptomyces* por V. Mersinias (protocolo disponible en <http://www.surrey.ac.uk/fhms/microarrays/Downloads/Protocols/index.htm>).

3.10.1.1. Estabilización del patrón transcripcional

Los cultivos de los cuales se tomaron las muestras para extraer el ARN se llevaron a cabo en 100 ml de medio SA, TBO o MEY, realizados a partir de preinóculos como se indica en el apartado 3.9.1. Las muestras han de ser tratadas inmediatamente para impedir tanto la degradación de ARN como la síntesis de nuevos transcritos y, así, estabilizar el patrón de transcripción.

Procedimiento

- ✓ Preparar tubos con 1-2 ml de *RNA Protect Bacteria* (Qiagen) y añadir 1-2 ml del cultivo de *Streptomyces* inmediatamente después de sacarlo del incubador.
- ✓ Agitar en *vortex* durante 5 s y, seguidamente, dejar actuar 5 min a temperatura ambiente.
- ✓ Centrifugar a 13200 rpm durante 10 min a temperatura ambiente (15-25 °C).
- ✓ Decantar y retirar bien el sobrenadante apoyando la boca del tubo sobre papel secante.
- ✓ Congelar el micelio precipitado a -80 °C hasta el momento de la extracción del ARN.

3.10.1.2. Lisis enzimática y mecánica del micelio de *Streptomyces*

La extracción de ARN se realizó empleando el sistema *RNeasy® Mini Kit* (Qiagen). Sin embargo, para romper las paredes celulares de *Streptomyces* es preciso iniciar el proceso combinando la acción de la lisozima con una disrupción mecánica.

Procedimiento

- ✓ Descongelar a temperatura ambiente los micelios y disgregar el precipitado dando pequeños golpes en la mesa en el fondo del tubo.
- ✓ Añadir 150 µl de lisozima 30 mg/ml disuelta en TE. Resuspender el micelio ayudándose con la punta de la micropipeta.
- ✓ Incubar a temperatura ambiente durante no más de 10 min, mezclando la suspensión con la punta de la micropipeta de vez en cuando.
- ✓ Añadir 600 µl de RLT-β-ME a cada tubo en campana extractora y agitar con *vortex* durante 5 s.
- ✓ Transferir el contenido del microtubo a un tubo de *Lysing Matrix B* (MP Biomedicals) y mantener en hielo.

- ✓ Homogeneizar la muestra aplicando en el equipo *FastPrep*[®] (MP Biomedicals) dos ciclos de 30 s a 6,5 m/s separados por una incubación de 1 min en hielo. De este modo las esferas de sílice contenidas en los tubos permiten la ruptura del micelio y la homogeneización de la muestra.
- ✓ Centrifugar durante 20 s a temperatura ambiente y velocidad máxima.
- ✓ Preempaquetar dos tubos PLG (*Phase Lock Gel*[™], 5 Prime) por muestra durante 20 s a temperatura ambiente y velocidad máxima.
- ✓ Transferir 750 µl del homogeneizado a un tubo PLG. Añadir 375 µl de fenol ácido y 375 µl de CIA. Agitar vigorosamente, aproximadamente 30 s, hasta formar una suspensión. No usar *vortex*.
- ✓ Centrifugar a temperatura ambiente 5 min a 13200 rpm. Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo PLG por decantación.
- ✓ Repetir la extracción con 375 µl de fenol ácido y 375 µl de CIA. Pasar la fase acuosa a un microtubo de 2,2 ml por decantación.
- ✓ Añadir 395 µl de etanol absoluto y mezclar por inversión.

Soluciones

- ❖ **Lisozima:** se disuelven 30 mg de lisozima (Fluka) de uso exclusivo para ARN en TE doblemente autoclavado. Se conserva a -20 °C.
- ❖ **RLT-β-ME:** añadir 1 µl de **β-mercaptoetanol** por cada 100 µl de tampón de lisis **RLT** suministrado en *RNeasy*[®] *Mini Kit*
- ❖ **Fenol ácido:** apto para tratamiento del ARN, *AquaPhenol*[™] (QBIogene)
- ❖ **CIA** (cloroformo-alcohol isoamílico): mezclar 24 partes de cloroformo y una de alcohol isoamílico.

3.10.1.3. Purificación del ARN con minicolumnas del sistema *RNeasy*[®] *Mini Kit*

Una vez homogeneizado y parcialmente fraccionado el lisado celular, se purifican los ácidos nucleicos por adsorción a sílica. En el protocolo se incluye un paso de eliminación de ADN por digestión.

Procedimiento

- ✓ Descongelar la ADNasa I (Quiagen) y atemperar su tampón.
- ✓ Cargar la minicolumna, montada sobre su tubo de colección, con un máximo de 0,7 ml de la mezcla con etanol anterior y tapar con cuidado. Añadir también los precipitados si los hubiera.
- ✓ Centrifugar 15 s a 13200 rpm a temperatura ambiente.
- ✓ Desechar el eluido y repetir el proceso hasta pasar toda la muestra por la columna.
- ✓ Añadir 350 µl de la solución RW1 a la columna y centrifugar 15 s a 13200 rpm a temperatura ambiente. Desechar el eluido.
- ✓ Preparar la mezcla de ADNasa I en un microtubo: añadir 10 µl de ADNasa I a 70 µl de solución RDD por muestra, mezclar por inversión y dar un pulso suave para recoger todo el volumen.
- ✓ Pipetear 80 µl de la solución de ADNasa I sobre la membrana de la columna e incubar 25-30 min a 30 °C en la estufa.
- ✓ Centrifugar brevemente.

- ✓ Repetir el tratamiento añadiendo 80 µl de la solución de ADNasa I sobre la membrana e incubar 25- 30 min a 30 °C en la estufa.
- ✓ Añadir 350 µl de solución RW1 y dejar actuar 5 min a temperatura ambiente para inactivar la ADNasa.
- ✓ Centrifugar 15 s a 13200 rpm a temperatura ambiente. Cambiar la columna a un nuevo tubo de colección.
- ✓ Añadir 500 µl de solución RPE y centrifugar 15 s a 13200 rpm a temperatura ambiente.
- ✓ Descartar el eluido.
- ✓ Añadir 500 µl de solución RPE y centrifugar 2 min a 13200 rpm a temperatura ambiente.
- ✓ Con cuidado, transferir la columna a un microtubo nuevo de 1,5 ml.
- ✓ Añadir 50 µl de agua sobre la membrana.
- ✓ Centrifugar 1 min a 13200 rpm a temperatura ambiente para eluir el ARN.
- ✓ Recoger el eluido, con cuidado de no contaminar el interior del tubo, y depositar sobre la misma columna.
- ✓ Centrifugar 1 min a 13200 rpm a temperatura ambiente para eluir el ARN.
- ✓ Recoger el eluido y pasarlo a un microtubo de 0,2 ml.
- ✓ Repartir el volumen del eluido en alícuotas y conservar a -80 °C.

Soluciones

- ❖ **RNase-Free DNase Set:** Qiagen. Contiene ADNasa I y tampón RDD.
- ❖ **Solución RW1:** suministrado en *RNeasy® Mini Kit*.
- ❖ **Solución RPE:** suministrado en *RNeasy® Mini Kit*. Se completa con etanol al iniciar el kit.

3.10.1.4. Tratamiento con ADNasa I en solución

El tratamiento con la ADNasa en minicolumna no elimina totalmente el ADN de la muestra. Esto supone un inconveniente cuando el ARN va a ser destinado al análisis por RT-qPCR. Por ello, se hace un segundo tratamiento con la ADNasa I comercializada por Ambion.

Protocolo

- ✓ Transferir la muestra a un microtubo de 0,2 ml.
- ✓ Añadir 0,1 volúmenes de tampón 10X y 1-2 µl de ADNasa I.
- ✓ Mezclar suavemente pipeteando e incubar a 37 °C durante 30 min en el termociclador.
- ✓ Añadir 1 µl de ADNasa I, mezclar e incubar a 37 °C durante 30 min en el termociclador.
- ✓ Resuspender la resina inactivadora con *vortex* y añadir 0,2 volúmenes.
- ✓ Incubar 2-3 min a temperatura ambiente, mezclar 2-3 veces durante la incubación con la micropipeta.
- ✓ Centrifugar 1,5 min a 13200 rpm a temperatura ambiente.
- ✓ Recuperar con cuidado el sobrenadante a un nuevo microtubo original. Evitar transferir la resina.

- ✓ Separar 4 μl para cuantificar el ARN en el *NanoDrop* y para analizar la calidad del ARN. Guardar el remanente a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Soluciones

- ❖ **TURBO DNA-free**™ kit con la ADNasa, su tampón y la resina inactivadora (Ambion).

3.10.2. Valoración de la concentración, pureza e integridad del ARN

Se analizaron en el *NanoDrop ND-1000 UV-vis* entre 1 y 2 μl de ARN para conocer su concentración y los indicadores de pureza A260/A280 y A260/A230 (apartado 3.5.4). La integridad del ARN se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa cuando se destinó a RT-qPCR y por electroforesis capilar cuando se utilizó para hibridar en micromatrices.

3.10.2.1. Electroforesis de ARN en gel de agarosa

El análisis en gel de agarosa se llevó a cabo utilizando un gel de agarosa al 2 % (apartado 3.5.7) empleando agarosa de uso exclusivo para ARN y tampón TAE 1X esterilizado dos veces en autoclave 20 minutos a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$. La cubeta de electroforesis se limpió con el sistema inhibidor de ARNasas *RNaseZap*® (Thermo Fisher Scientific) y se aclaró perfectamente con agua y papel, al igual que los moldes para hacer los pocillos y el soporte para hacer el gel. Las muestras de ARN, generalmente 1-2 μl , se cargaron en el gel empleando tampón de carga de uso exclusivo para ARN. La electroforesis se realizó a un voltaje de 4 V/cm. Una vez resuelto el gel, se tiñó con una solución de bromuro de etidio recién preparada para acelerar el proceso y evitar la difusión de los fragmentos, y se visualizó en el transiluminador. Cuando la muestra de ARN estaba libre de ADN, íntegra y suficientemente concentrada, se observaron dos bandas, correspondientes al ARN ribosomal 23S y 16S. La presencia de una banda por encima del 23S, indicaría la contaminación con ADN genómico. La ausencia de alguna de estas dos bandas indica la degradación del ARN, dando lugar, generalmente, a un rastro a lo largo de toda la carrera como consecuencia de esta degradación. En ocasiones, cuando el ARN está muy concentrado, los ARN 23S y 16S pueden fusionarse observándose entonces una sola banda.

3.10.2.2. Electroforesis capilar de ARN

El análisis por electroforesis capilar se realizó en un equipo *2100 Bioanalyzer* empleando los chips incluidos en el *RNA 6000 Nano LabChip*® kit (ambos de Agilent Technologies). El análisis de la integridad de las muestras en el bioanalizador se llevó a cabo en el Servicio de Genómica de Inbiotec siguiendo las indicaciones del fabricante con 50-500 ng de ARN.

Este sistema permite separar biomoléculas con carga, como ARN o ADN, en función de su peso molecular mediante una electroforesis que tiene lugar en unos microcanales, y detectar los fragmentos a través de la fluorescencia inducida por láser (Mueller y col., 2000).

Los datos obtenidos de esta electroforesis se muestran en electroferogramas (figura 3.2, A) donde cada pico corresponde a un fragmento de ARN. El área de cada pico es proporcional a la cantidad de ARN que contiene. El equipo transforma este electroforetograma en una imagen similar a la de un gel clásico (figura 3.2, B) donde se observan las bandas correspondientes a cada pico del electroforetograma, tanto los propios del ARN y sus posibles fragmentos de degradación, como a los restos de ADN contaminante. De manera simultánea a las muestras, se procesa en el chip un marcador con fragmentos de tamaño conocido que permite, por comparación de tiempo de migración, calcular el tamaño de cada fragmento que contenga la muestra. El sistema calcula por medio de un algoritmo el número de integridad del ARN (RIN) que nos permite evaluar la calidad del ARN. Este algoritmo no solo tiene en cuenta la relación entre las bandas ribosomales 23S y 16S, en el caso de las bacterias, sino que también considera parámetros como la intensidad y cantidad de otros picos presentes en la muestra (Schroeder y col., 2006). El valor del RIN va desde el 1 hasta el 10, correspondiendo el 1 a un ARN totalmente degradado, y el 10 a un ARN no degradado. En el presente trabajo los ARNs utilizados nunca tuvieron un valor inferior a 7, valor aceptado para experimentos de transcriptómica.

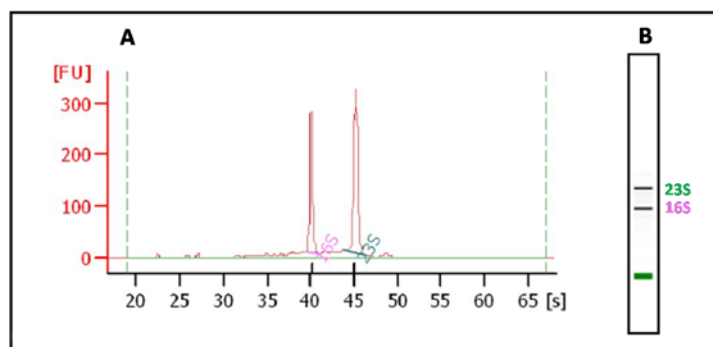


Figura 3.2. Electroferograma (A) y su simulación como gel clásico (B) resultado del análisis de una muestra de ARN de *S. clavuligerus* Δ *cltA::aac* obtenida en medio SA con un valor RIN de 9,5. Se indican los ARN ribosómicos 16S y 23S.

3.10.3. Análisis por PCR cuantitativa a tiempo real

La RT-qPCR o retrotranscripción-PCR cuantitativa en tiempo real permitió la cuantificación relativa de las diferencias de transcripción de un determinado gen de estudio por comparación con la medida de la transcripción de un gen cuya expresión se considera constitutiva. En este

trabajo la RT-qPCR se usó para comprobar la expresión heteróloga de la agrupación biosintética de cefamicina C introducida en diferentes cepas de *Streptomyces* y en las validaciones de los resultados de transcriptómica obtenidos por micromatrices.

Esta técnica permite analizar la transcripción de un gen mediante la detección de su ARNm en dos pasos: 1) la transcripción reversa del ARN a una cadena de ADN monocatenario, llamada ADN complementario (ADNc), y 2) la amplificación específica de las regiones a analizar (génicas o intergénicas) mediante cuantificación en tiempo real de producto de PCR (qPCR). Al tratarse de un proceso en tiempo real, la detección y la cuantificación de los productos de PCR es simultánea (Higuchi y col., 1993). La técnica de qPCR se empleó también para detectar y cuantificar los plásmidos pSCL1, pSCL2 y pSCL4 a través de la amplificación de determinados segmentos génicos utilizando 2 ng/μl de ADN genómico, por tanto, aquí, no hubo paso de retrotranscripción (Lee y col., 2006).

En el presente trabajo, las reacciones de RT-PCR a tiempo real se realizaron en dos fases y tubos diferentes: una retrotranscripción general del ARN de la muestra en cuestión con cebadores aleatorios y la posterior reacción de amplificación del ADNc de interés con cebadores específicos. Como marcador del producto amplificado se utilizó *SYBR® Green* (Applied Biosystems), fluoróforo que aumenta notablemente su emisión de fluorescencia al unirse a ADN de doble cadena, siendo la cantidad de fluorescencia emitida durante una reacción de PCR proporcional a la cantidad de producto amplificado. Debido a que el *SYBR® Green* se une a cualquier molécula de ADN de doble cadena, es muy importante que en la reacción de PCR no se amplifiquen productos inespecíficos ni se formen dímeros de oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos complementarios a la secuencia de ADN que se quiere analizar se diseñaron con el programa *Primer3 v. 0.4.0* para amplificar productos específicos de entre 90 y 180 pb, intentando que el amplicón se localizase cerca del extremo 5' del transcrito para minimizar así el efecto de una posible degradación del molde dado que el extremo 3' del ARNm es más susceptible de degradación. Se fijó un tamaño de oligonucleótidos de 17 a 27 pb y una temperatura de hibridación de 57 a 68 °C. Además, la presencia de A o T en el extremo 3' puede aumentar la especificidad de la unión debido al alto contenido en G+C en el genoma de *Streptomyces*. Se intentó que existiera una complementariedad mínima entre los dos cebadores de la pareja (analizada con el programa *Vector NTI®*), para evitar la formación de dímeros de oligonucleótidos, los cuales disminuyen la eficiencia de la amplificación y alteran los resultados al producir un aumento inespecífico de la fluorescencia.

3.10.3.1. Establecimiento de las condiciones de amplificación de las parejas de cebadores para la qPCR

La temperatura de hibridación de cada pareja de cebadores se determinó empíricamente haciendo un gradiente desde 58 a 68 °C, en intervalos de 2 °C, con 2 ng/μl de ADN genómico como molde. Se eligió la temperatura que presentó un valor de Ct más bajo, esto es, aquella en la que la detección del amplicón fuera más temprana. Posteriormente, con esta temperatura y la inmediatamente superior e inferior de las analizadas en el rango, se determinó la eficiencia de cada pareja de cebadores. Para ello, se emplearon como molde 6 diluciones seriadas con factor de dilución ½ obtenidas desde una muestra de 20 ng/μl de ADN genómico para cada una de las tres temperaturas elegidas. Con los valores de Ct obtenidos se hizo una recta de regresión lineal frente al logaritmo de las concentraciones de ADN molde y se calculó su pendiente. La temperatura de hibridación elegida para cada par de oligonucleótidos fue aquella en la que el valor de esta pendiente estaba entre -3,1 y -3,6 lo que corresponde a una eficiencia de la PCR de entre el 90 y el 110 % (Ponchel, 2006). En estos ensayos de optimización, al igual que en los de análisis final, las reacciones correspondientes a cada condición de temperatura o concentración de ADN se realizaron con triplicados técnicos.

3.10.3.2. Retrotranscripción

La síntesis de ADNc se llevó a cabo con la retrotranscriptasa *SuperScript™ III* y, como cebadores, hexanucleótidos al azar, ambos de Invitrogen.

Procedimiento

- ✓ Mezclar 0,5 μg el ARN molde, los hexanucleótidos y los desoxinucleótidos a una concentración final de 12,5 ng/μl y 0,5 mM, respectivamente, en un volumen de 14 μl.
- ✓ Incubar la mezcla a 70 °C durante 5 min y enfriar a 4 °C durante un tiempo mínimo de 1 min.
- ✓ Añadir el tampón, DTT a una concentración final 0,005 M y 200 unidades de retrotranscriptasa. El volumen final es de 20 μl. Mezclar con la pipeta.
- ✓ Incubar durante 1 h a 55 °C.
- ✓ Inactivar la retrotranscriptasa a 70 °C durante 15 min.
- ✓ Guardar el ADNc a 4 °C si va a utilizarse en las siguientes 48 h. Si no es así, conservarlo a -20 °C.

Soluciones

- ❖ *SuperScript™ III* (Invitrogen), contiene: *SuperScript™ III RT*, *5X First Strand Buffer* y DTT 0,1 M.
- ❖ **Hexanucleótidos cebadores al azar** (Invitrogen) 50 ng/μl.

3.10.3.3. PCR cuantitativa a tiempo real

La amplificación y cuantificación mediante PCR a tiempo real se realizó en el termociclador *StepOnePlus™* utilizando *SYBR® Green PCR Master Mix*, ambos de Applied Biosystems. Es muy importante que en la reacción de PCR no se amplifiquen productos inespecíficos ni se formen dímeros de oligonucleótidos, ya que el fluoróforo se une al ADN de doble cadena y no diferencia entre las moléculas de distinto tipo.

Las reacciones se prepararon de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, en un volumen final de 20 µl. Como molde se utilizaron 2 µl de ADNc sintetizado según las indicaciones del apartado anterior y la concentración de oligonucleótidos fue de 300 nM para cada pareja. El inicio de la amplificación del producto (ciclo umbral o Ct, del inglés *threshold cycle*) se debe detectar entre los ciclos mínimo y máximo de la recta de eficiencia del apartado 3.10.3.1; por lo general en un rango de entre 15 y 36 ciclos.

Como comprobación de la ausencia de ADN contaminante en las muestras de ARN, se llevaron a cabo controles negativos. En estos se sustituye el ADNc molde por su correspondiente ARN. La amplificación de producto específico en estos controles indica la presencia de ADN contaminante en las muestras de ARN. El programa de amplificación de la PCR cuantificación en tiempo real que se aplicó se muestra en la tabla 3.8 a continuación:

Etapa	Temperatura	Tiempo
Activación de la polimerasa	50 °C	2 min
Desnaturalización inicial	95 °C	10 min
PCR (40 ciclos)		
Desnaturalización	95 °C	15 s
Hibridación/Extensión	60 °C	1 min

Tabla 3.8. Tiempos y temperaturas de reacción típicos para una reacción de qPCR.

Con el objetivo de detectar la amplificación de posibles productos inespecíficos o la formación de dímeros de oligonucleótidos, finalizado el programa de amplificación, se llevó a cabo una curva de disociación. Con esto se observa la temperatura de fusión (T_m) de todos los fragmentos producidos en la reacción. La T_m es una característica propia de cada amplicón y en una reacción dada el producto de PCR específico tiene una T_m más alta que los dímeros de oligonucleótidos, debido a su mayor tamaño. Asimismo, para comprobar que los productos de

reacción amplificados eran específicos, tras la qPCR se realizó la separación electroforética en geles de agarosa al 2 %.

La determinación de la línea base así como del ciclo umbral se realizó mediante la aplicación informática suministrada junto al termociclador (*StepOne™ Software v.2.0*, Applied Biosystems).

3.10.3.4. Cuantificación del amplicón obtenido por qPCR

La cuantificación del producto durante una PCR a tiempo real debe producirse en la fase exponencial de amplificación, antes de que los componentes de la reacción comiencen a ser limitantes, ya que solo entonces la cantidad de producto amplificado es proporcional a la cantidad de molde inicial (Bustin, 2000). Debido a esto, la mayoría de los métodos de cuantificación se basan en la determinación del ciclo umbral o Ct, definido como el ciclo en el cual la fluorescencia debida al producto sobrepasa el umbral de la fluorescencia basal.

La cuantificación relativa de las diferencias de expresión de un gen diana entre las cepas mutantes y control se ha realizado a través del método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen y Zakrajsek, 2000; Livak y Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001). Este método requiere la coamplificación de un gen de referencia cuya expresión no muestre diferencias entre las condiciones analizadas, permitiendo compensar pequeñas variaciones en la cantidad de ADNc molde de las reacciones, originadas por errores en la cuantificación y pipeteo de las muestras. Como gen de referencia se empleó un factor sigma de expresión constitutiva en *Streptomyces* (Buttner y col., 1990; Aigle y col., 2000), *hrdB* en *S. coelicolor* y su ortólogo *rpoD* en *S. clavuligerus* y *S. flavogriseus*, siendo la pareja de cebadores específicos idéntica para los tres genes (tabla 7.1, Anexo). Adicionalmente, en la detección y cuantificación de los plásmidos pSCL1, pSCL2 y pSCL4 se empleó el gen cromosomal *adpA*.

Según el método que se ha utilizado, el valor relativo de expresión de un gen diana viene dado por $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde $\Delta\Delta Ct$ indica la diferencia entre los ΔCt de las dos cepas analizadas, mutante y control, obtenidos cada uno de ellos a partir de la diferencia del Ct del gen diana y del gen de referencia (*hrdB* o *rpoD*) en cada cepa. La aplicación del método del $\Delta\Delta Ct$ requiere que la eficiencia de amplificación de los cebadores empleados se encuentre próxima al 100 % (apartado 3.10.3.1).

$$\text{Valor relativo de expresión} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{mutante}} - \Delta Ct_{\text{control}}$$

$$\Delta Ct_{\text{mutante}} = Ct_{\text{diana}} - Ct_{\text{hrdB}}$$

$$\Delta Ct_{\text{control}} = Ct_{\text{diana}} - Ct_{\text{hrdB}}$$

Valores relativos de expresión en la cepa mutante o de estudio superiores a 1 indican que el gen analizado se encuentra activado, mientras que valores inferiores a 1 indican la represión del gen.

En todos los casos se emplearon dos réplicas biológicas (correspondientes a dos ADNc, en el caso de RT-qPCR, o dos ADN, en el caso de los plásmidos, en ambos casos procedentes de la misma cepa pero extraídos de dos matraces distintos) y tres réplicas técnicas (la misma muestra de ADNc o ADN analizada por triplicado).

3.10.4. Análisis transcriptómico mediante micromatrices de ADN

La palabra *microarray* (micromatriz) deriva del griego *mikro* 'pequeño' y del inglés *array* 'distribución ordenada'. Las micromatrices permiten fijar separadamente miles de sondas de ADN a una superficie sólida para tener una visión instantánea de la actividad de genomas completos o de un grupo determinado de genes o región de ADN. Dos ácidos nucleicos, uno control o de referencia y otro de estudio, marcados con diferentes fluoróforos, Cy3 y Cy5, son cohibridados con las sondas de la micromatriz. Un láser excita las muestras a diferentes longitudes de onda y compara los resultados obtenidos para la emisión de cada fluoróforo. De este modo, si un punto de la micromatriz asociado a una sonda emite una mayor cantidad de fluorescencia verde, se interpretará como que posee una mayor proporción del ácido nucleico marcado con Cy3. Si, por el contrario, la mayor emisión corresponde al color rojo, se identificará con una mayor proporción del ácido nucleico marcado con Cy5. Finalmente, la emisión de fluorescencia en color amarillo indica una misma proporción de fluoróforos hibridados en ese punto y, por tanto, de ambos tipos de ácido nucleico, control y de estudio.

En el presente trabajo, las micromatrices se utilizaron para detectar genes afectados por la ausencia del regulador ClaR, del megaplásmido pSCL4, y por la expresión heteróloga del regulador PimM. Para ello se compararon los niveles de expresión entre las cepas *S. clavuligerus* ATCC 27064 y *S. clavuligerus* $\Delta\text{claR}::\text{aac}$, *S. clavuligerus* ATCC 27064 y *S. clavuligerus* pSCL4⁻, y *S. clavuligerus*::pIB139 y *S. clavuligerus*::pimM, respectivamente.

3.10.4.1. Diseño de las micromatrices de *S. clavuligerus*

El diseño de las micromatrices fue realizado por el Dr. Antonio Rodríguez García (Instituto de Biotecnología de León, Inbiotec). Para ello, la secuencia del genoma de *S. clavuligerus* y su anotación fue descargada de la base de datos StrepDB (<http://strepdb.streptomyces.org.uk/>). Según esta anotación existen un total de 5710 secuencias de ADN codificantes (CDS) cromosómicas, 1581 secuencias codificantes del megaplásmido pSCL4, 18 ARNr y 66 ARNt. Para identificar ARN no codificantes (ARNnc) en la secuencia del genoma, se siguieron dos procedimientos. Primero, se emplearon 27 secuencias de pequeños ARN (ARNs) de la especie filogenéticamente cercana *S. avermitilis* para identificar secuencias homólogas en el genoma de *S. clavuligerus* mediante búsquedas BLAST. Estas 27 secuencias de *S. avermitilis* se obtuvieron desde las bases de datos StrepDB (genes *ssrA*, *srp* y *rnpB*) y fRNAdb de predicción de ARNnc (Kin y col., 2007). De este modo, se identificaron 20 secuencias, que se denominaron con el nombre sistemático SCLAV_mr001 a SCLAV_mr020. En segundo lugar, se utilizó el procedimiento y programa *nocoRNAC* de Herbig y Nieselt (2011) que permitió predecir 164 ARNnc en el cromosoma nombrados con el prefijo SCLAV_nr seguido de un número y 30 ARNnc en el plásmido pSCL4, con el prefijo SCLAV_pnr. Por tanto, un total de 7589 *loci* constituyeron el grupo inicial a partir del que se diseñaron las sondas para formar parte de la micromatriz.

Las sondas de las micromatrices (de 45 a 60 nucleótidos) fueron diseñadas con: a) la herramienta en línea *eArray* (Agilent) para las sondas de expresión de los genes (1 a 3 sondas por gen) y b) con el programa *chipD* (Dufour y col., 2010) para las sondas teseladas. El procedimiento *eArray* fue el *Tm matching methodology* utilizado, con la opción *best probe methodology* para seleccionar una sonda por gen o con la opción *best distribution* para obtener 3 sondas si el gen es más largo de 1,5 kb. En ambos casos, la T_m de la sonda fue 85 °C. El procedimiento *chipD* fue utilizado para cubrir 13 regiones del genoma para un análisis más profundo. Entre esas regiones se incluyen las agrupaciones biosintéticas para metabolitos secundarios conocidas o predichas. El diseño de estas sondas teseladas (5559 sondas) incluyó los siguientes parámetros: concentración de Na: 1134 mM; T_m de la sonda: 97 °C; modelo de T_m : 3 y distancia entre sondas: 30 nt. Finalmente, un total de 14867 sondas fueron seleccionadas, abarcando el 98,85 % de los *locus* iniciales (5688 CDS cromosomales, 1570 CDS del pSCL4, 7 ARNr, 51 ARNt, 157 ARNnc cromosomales y 29 ARNnc del pSCL4). Las micromatrices fueron fabricadas por Agilent Technologies en el formato 8x15K, lo que significa que en cada portaobjetos hay 8 micromatrices independientes e idénticas.

3.10.4.2. Obtención de los ácidos nucleicos para la hibridación

Se cultivaron dos réplicas biológicas para cada una de las cepas, *S. clavuligerus*, *S. clavuligerus* Δ *cltR::aac*, *S. clavuligerus* pSCL4⁻, *S. clavuligerus*::pIB139 y *S. clavuligerus*::*pimM*, en los medios SA para comparar las tres primeras o MEY para las dos últimas. Para aislar el ARNm se tomaron muestras de tres tiempos de cada uno de los cultivos, a las 22,5, 46,5 y 60 horas en el caso de *S. clavuligerus*, *S. clavuligerus* Δ *cltR::aac*, y *S. clavuligerus* pSCL4⁻, y a las 84, 90 y 96 horas, en el de *S. clavuligerus*::pIB139 y *S. clavuligerus*::*pimM*. Mediante retrotranscripción se obtuvo ADNc marcado fluorescentemente con Cy3. El ADN genómico (ADNg) de *S. clavuligerus* o *S. clavuligerus*::pIB139 marcado con Cy5 se usó como ácido nucleico de referencia para todas las hibridaciones del correspondiente experimento. Este ADNc se extrajo de un cultivo en fase estacionaria para evitar que estuviesen más representadas las regiones centrales del cromosoma y del plásmido donde se origina la replicación, se purificó como se indica en el apartado 3.5.2 y se disolvió en agua.

El éxito de un ensayo de micromatrices depende en gran parte de la calidad de los ácidos nucleicos hibridados. El ARN total debe estar intacto y puro, sin proteínas ni ADN contaminante. Para ello se exige que sea evaluada su cantidad, calidad e integridad. A continuación se detallan los protocolos de marcaje de ADNc con Cy3-dCTP a partir de ARN y de ADNg con Cy5-dCTP. La metodología sigue las indicaciones generales del proveedor de las micromatrices y de los reactivos utilizados y ha sido optimizada por el Dr. Antonio Rodríguez García en el Instituto de Biotecnología de León (Inbiotec).

3.10.4.3. Síntesis y marcaje del ADNc con Cy3-dCTP a partir de ARN total

Durante todo el procedimiento de marcaje es necesario usar puntas, microtubos y agua Milli-Q libres de ARNasa mientras se sintetiza el ADNc. También es conveniente evitar la exposición de los fluoróforos a la luz directa o intensa, por lo tanto, mantener en oscuridad el reactivo y las mezclas.

Procedimiento

- ✓ Para cada hibridación del cristal 8x15K, preparar en un microtubo de 0,2 ml la siguiente mezcla: 4,2 µg de ARN total, 0,6 µl de cebadores y agua Milli-Q hasta un volumen de 5,9 µl.
- ✓ Desnaturalizar en termociclador a 70 °C durante 10 min.
- ✓ Enfriar en hielo al menos durante 1 min y centrifugar a velocidad máxima durante 10 s. Mantener en hielo.

- ✓ Preparar la mezcla de marcaje según el número de muestras de ADNc que se hibridarán, por lo general 8 o múltiplos de 8. La siguiente tabla se indican los volúmenes necesarios tanto para 1 reacción de marcaje de escala 0,35X, lo que implica la reducción del volumen de todos los reactivos respecto a lo indicado por el manual de Invitrogen, como para 8 reacciones de marcaje, en la que se considera un exceso de mezcla del 12 % como margen de seguridad.

	1 reacción 0,35X	8 reacciones 0,35X + 12 %
Solución <i>First Strand</i> 5X	2,10 µl	18,8 µl
DTT 100 mM	1,05 µl	9,4 µl
dNTP-R	0,21 µl	1,88 µl
Cy3-dCTP 1 mM	0,53 µl	4,7 µl
Superscript™ III	0,70 µl	6,27 µl
Volumen final	4,59 µl	41,1 µl

- ✓ Añadir 4,6 µl de la mezcla madre a las muestras de ARN-cebadores desnaturalizadas. Mezclar bien pipeteando, evitar la formación de burbujas.
- ✓ Incubar en termociclador a 25 °C durante 10 min, y posteriormente, a 46 °C durante 5-6 h. Si se deja la reacción por la noche, incluir un paso final a 4 °C.
- ✓ Añadir 3,5 µl de NaOH 1 N y mezclar bien.
- ✓ Incubar en el termociclador a 70 °C durante 10 min.
- ✓ Añadir 3,5 µl de HCl 1 N y mezclar bien. Es necesario que los volúmenes de base y ácido se añadan con precisión (con la misma pipeta) para neutralizar la solución. Los marcajes se pueden guardar a -20 °C durante unos días hasta su uso.

Soluciones

- ❖ **Muestras de ARN total** a una concentración mínima de 0,79 µg/µL. Si no se alcanzase, el ARN se puede concentrar en centrífuga de vacío *Speed Vac* a temperatura ambiente, pero sin llegar a desecarlo.
- ❖ **Cebadores aleatorios** hexámeros, 3 µg/µl (Invitrogen).
- ❖ **Transcriptasa reversa SuperScript™ III** (200 u/µl), DTT y solución *First Strand* 5X (kit de Invitrogen).
- ❖ **Agua** sin ARNasas.
- ❖ **dNTP-R**: mezcla de dNTPs para marcaje de ARN (dA/G/TTP: 25 mM; dCTP: 10 mM). Se preparan a partir de soluciones 100 mM independientes de dATP, dCTP, dGTP, dTTP (New England Biolabs).
- ❖ **Cy3-dCTP** 1 mM (GE Healthcare).
- ❖ Soluciones comerciales de **NaOH** 1 N y **HCl** 1 N (Sigma).

3.10.4.4. Marcaje del ADN genómico con Cy5-dCTP

Durante todo el procedimiento de marcaje es conveniente evitar la exposición de los fluoróforos a la luz directa o intensa, por lo tanto, mantener en oscuridad el reactivo y las mezclas. Además, el Cy5 es especialmente sensible al ozono y a la humedad. Se realizó un único marcaje con las proporciones indicadas para las 8 hibridaciones de una micromatriz 8x15K.

Procedimiento

- ✓ Preparar en un microtubo de 1,5 ml: 3 µg de ADNg, 20 µl de *2,5X Random Primers Solution* y agua Milli-Q hasta completar 40 µl. Mezclar bien pipeteando.

- ✓ Desnaturalizar en termobloque a 95 °C durante 15 min.
- ✓ Enfriar en hielo no más de 5 min, agitar en *vortex* y centrifugar a velocidad máxima durante 10 s. Mantener el hielo.
- ✓ Manteniendo el microtubo en hielo, añadir a la mezcla anterior, en el siguiente orden: 5 µl de mezcla de nucleótidos, 3,75 µl de Cy5-dCTP. Agitar en *vortex* y centrifugar a velocidad máxima 10 s. Añadir 1,5 µl de Exo-Klenow.
- ✓ Tras añadir la polimerasa, pipetear suavemente para homogeneizar y transferir al microtubo de 0,2 ml.
- ✓ Incubar en el termociclador a 37 °C durante toda la noche.
- ✓ Añadir 5 µl de solución de paro y mantener en hielo. Se puede guardar a -20 °C durante unos días hasta su uso.

Soluciones

- ❖ **Muestra de ADN genómico** a 250 ng/µl.
- ❖ **Sistema de marcaje** *BioPrime Array CGH Genomic Labeling Module* (Invitrogen), que incluye:
 - 2,5X *Random Primers Solution* (octámeros, 750 µg/ml).
 - 10X *dCTP Nucleotide Mix* (dATP, dGTP, y dTTP 1,2 mM; dCTP 0,6 mM, en Tris pH 8 10 mM, EDTA 1 mM).
 - Fragmento Exo-Klenow de la polimerasa de ADN (40 U/µl).
 - Solución de paro (EDTA 0,5 M pH 8).
- ❖ **Cy5-dCTP** 1 mM (GE Healthcare).

3.10.4.5. Purificación de los ácidos nucleicos marcados con Cy3 y Cy5

Para eliminar los cebadores, nucleótidos, enzimas y sales de los ácidos nucleicos marcados se usó el kit *MinElute PCR purification* (Qiagen), evitando en todo momento la luz directa. Una vez purificados, los ácidos nucleicos marcados se conservaron a -20 °C en oscuridad hasta su uso. Se han de evitar los ciclos de congelación-descongelación.

Procedimiento

- ✓ Añadir 5 volúmenes de solución PB a cada alícuota de marcaje, mezclar bien y cargar las minicolumnas, montadas sobre sus tubos de elución.
- ✓ Centrifugar a velocidad máxima durante 1 min.
- ✓ Comprobar la coloración de la membrana de la minicolumna y del eluido: rojo/rosa para el marcaje con Cy3, azul para el marcaje con Cy5. Si la membrana no tiene color, el marcaje habrá sido poco eficiente. Descartar el eluido.
- ✓ Añadir 500 µl de solución PE a las minicolumnas para el primer lavado de las membranas.
- ✓ Centrifugar a velocidad máxima durante 1 min. Descartar el eluido.
- ✓ Añadir 250 µl de solución PE a las minicolumnas para el segundo lavado de las membranas.
- ✓ Centrifugar a velocidad máxima durante 1 min. Descartar el eluido.
- ✓ Centrifugar a velocidad máxima durante 1 min para eliminar los restos de etanol de la solución PE.
- ✓ Transferir las minicolumnas a microtubos de 1,5 ml sin tapa.

- ✓ Añadir 10 µl de solución EB sobre el centro de la membrana.
- ✓ Mantener 1 min a temperatura ambiente. Centrifugar a velocidad máxima durante 1 min.
- ✓ Añadir otros 10 µl de solución EB calentada a 60 °C, distribuyéndolos por la zona de las membranas que retenga color.
- ✓ Mantener 1 min a temperatura ambiente. Centrifugar a velocidad máxima durante 1 min.
- ✓ Repetir la elución con los 20 µl recogidos del microtubo y aplicados de nuevo sobre la membrana
- ✓ Mantener 1 min a temperatura ambiente. Centrifugar a velocidad máxima durante 1 min.
- ✓ Comprobar los restos de coloración de la membrana (debe quedar blanco) y decidir si se repite la elución.
- ✓ Pasar el eluido a un microtubo con tapa para su conservación. Medir, anotar el volumen recuperado, y mezclar el eluido pipeteando varias veces para homogeneizarlo (el eluido recogido directamente mantiene un gradiente de ácidos nucleicos). Reservar 1,5 µl para medidas espectrofotométricas y almacenar el resto del eluido a -20 °C.

Soluciones

- ❖ **MinElute PCR purification kit** (Qiagen): incluye las soluciones PB, PE y EB y las columnas de purificación.

3.10.4.6. Cuantificación de los ácidos nucleicos marcados con Cy3 y Cy5

La cantidad de ácido nucleico y la eficiencia en la incorporación de marcaje se calcularon mediante un barrido espectrofotométrico con el *NanoDrop ND-1000 UV-vis* (Thermo Scientific). Los valores de absorbancia obtenidos son necesarios para determinar la cantidad de muestra marcada de que se dispone para la hibridación.

Procedimiento

- ✓ En el programa de control del *NanoDrop ND-1000 UV-vis*, elegir la opción *Microarray*.
- ✓ Hacer doble blanco con el tampón EB.
- ✓ Para el marcaje del ADNg se utiliza la opción «DNA-50», mientras que para el marcaje del ADNc sintetizado a partir del ARN total se utiliza la opción «ssDNA-33».
- ✓ Aplicar 1,5 µl de cada marcaje.
- ✓ Tomar nota de los valores de concentración de ADN y de fluoróforo, que sirven para los cálculos posteriores.

Para la hibridación de las matrices 8x15K son necesarias las siguientes condiciones: para el ADN marcado con Cy3,

- ✓ un rendimiento mínimo de la síntesis de ADNc de 650 ng: concentración de ADNc (ng/µl) x (37/33) x volumen de elución recuperado (µl),
- ✓ una actividad específica mínima de 40 pmol/µg: [concentración de Cy3 (pmol/µl)/concentración de ADNc (ng/µl) x (37/33)] x 1000,

- ✓ unos valores FIC (frecuencia de incorporación de nucleótidos marcados) que deben oscilar entre 2 y 5 % según Corning Life Sciences, o entre 1 y 3,6 % según Kreatech. El valor FIC se indica en porcentaje y se calcula así: $(\text{Cy3 pmol} \times 330 \text{ pg/pmol} \times 10^{-3} \text{ ng/pg}) / \text{ADNc ng}$.

y para el ADN genómico,

- ✓ una concentración de ADN marcado con Cy5 de 10 pmoles, y con una actividad específica entre 23,4 y 77,3 pmol/ μg [concentración de Cy5 (pmol/ μl) / concentración de ADN (ng/ μl)] x 1000,

3.10.4.7. Hibridación de las micromatrices 8x15K

Una vez decididos los volúmenes de ADN marcado con Cy5 de las cepas control (común a todas las hibridaciones) y de cada uno de los ADN marcados con Cy3, procedentes de las muestras de las diferentes cepas cultivadas en el correspondiente medio de cultivo durante los distintos tiempos, se aplicaron en cada una de las matrices de los cristales de Agilent Technologies los dos tipos de ácidos nucleicos. Es necesario el uso de guantes sin polvo para evitar el depósito de partículas en las micromatrices que pudieran interferir en la hibridación y en la lectura, así como trabajar en condiciones de luz tenue cuando se maneje el ADN marcado con los fluoróforos.

3.10.4.7.1. Preparación de las mezclas de marcajes para la hibridación

Procedimiento

- ✓ Preparar la mezcla madre para las 8 hibridaciones de un cristal siguiendo el orden de la tabla. Mezclar bien pipeteando.

	Volúmenes para 8 hibridaciones
MES 12X	46,7 μl
NaCl 5 M	112,0 μl
Formamida 100 %	112,0 μl
EDTA 0,5 M	22,4 μl
Tritón 10 %	56,0 μl
Volumen madre	349,0 μl

- ✓ Preparar en microtubos de 1,5 ml las 8 mezclas de marcaje por cristal. Según las indicaciones del protocolo de Invitrogen, 10 pmoles del marcaje con ADN, y 300 ng de ADN marcado con Cy3. En cuanto al ADN, en las hibridaciones de los experimentos con los mutantes *S. clavuligerus claR::aac* y *S. clavuligerus pSCL4⁻*, se añadieron 2,5 pmoles, y en el de expresión heteróloga de *S. clavuligerus::pimM*, 4 pmoles. Completar con agua Milli-Q hasta un volumen de 18,8 μl . En el caso de que las muestras de Cy3-ADN o Cy5-ADN se encontraran muy diluidas, se pueden desecar los marcajes en centrifuga de vacío a temperatura ambiente en un microtubo de 1,5 ml.
- ✓ Desnaturalizar en termobloque a 94 °C durante 3 min.
- ✓ Inmediatamente dar un pulso en microcentrifuga.

- ✓ Añadir 31,2 µl de solución madre a los 18,8 µl de las mezclas de marcajes (volumen final 50 µl). Mezclar bien pipeteando y evitar las burbujas.
- ✓ Centrifugar a velocidad máxima durante 1 min para eliminar las posibles burbujas. Mantener en oscuridad y a temperatura ambiente mientras se prepara el montaje.

Soluciones

- ❖ **Muestras de ADNc marcado con Cy3.**
- ❖ **Muestra de ADNg marcado con Cy5.** Por lo general el ADNg-Cy5 es referencia común y se utiliza el mismo marcaje para todas las hibridaciones de un experimento y para sucesivos experimentos a fin de poder comparar entre ellas.
- ❖ **NaCl 5 M,** Sigma.
- ❖ **MES 12X,** mezclar 17,6 g de MES ácido monohidratado y 48,3 g MES en sal sódica (ambos de Sigma). Añadir agua hasta 200 ml. Ajustar pH a 6,5 con HCl 1 M. Completar con agua hasta 250 ml. Filtrar con un filtro estéril con un diámetro de poro de 0,45 µm.
- ❖ **Tritón 10 %,** Sigma.
- ❖ **Formamida 100 %,** Sigma. Manejar en campana extractora.
- ❖ **EDTA 0,5 M,** Sigma.

3.10.4.7.2. Montaje e incubación de las hibridaciones

Las hibridaciones se aplican sobre el cristal que cubre la matriz y que está compartimentalizado en 8 áreas, correspondientes a las 8 matrices del portaobjetos (en el formato 8x15K). Una vez aplicadas las muestras, se superpone el cristal al portaobjetos con las matrices y el conjunto se encierra en una cámara que evita que el conjunto se mueva. Las hibridaciones se incuban en un sistema rotatorio para asegurar el movimiento de la solución de hibridación por toda el área de la matriz. Los cubres compartimentalizados y las cámaras de hibridación fueron adquiridas a Agilent.

Procedimiento

- ✓ Revisar que tanto el portaobjetos con las micromatrices como el cristal cubreobjetos estén libres de polvo y defectos visibles. Eliminar el polvo con aire comprimido presionando con suavidad el pulverizador. Tener especial cuidado con la cara impresa de la micromatriz.
- ✓ Anotar el número de serie del portaobjetos, así como la procedencia y disposición del ADNc en cada matriz.
- ✓ Encajar el cubreobjetos en la base de la cámara de hibridación.
- ✓ Poner 40 µl de la mezcla de hibridación tomados mediante carga forzada de la pipeta en el centro de cada compartimento. Esto permite que en la punta de la micropipeta quede un pequeño volumen de mezcla para evitar la formación de burbujas al dispensar la muestra. Las burbujas más pequeñas suelen desaparecer tras unos minutos de incubación.
- ✓ Depositadas las 8 muestras sobre el cubreobjetos, posicionar el porta con la cara impresa hacia abajo, sujetándolo por la parte de la etiqueta y acercando el lado contrario al de la etiqueta al cubre. Bajar suavemente en horizontal hasta que ambos cristales contacten.
- ✓ Situar la parte superior de la cámara de hibridación sobre el conjunto previo.
- ✓ No mover el montaje de su posición horizontal hasta deslizar el tornillo de sujeción hacia el centro de la cámara y atornillarlo con firmeza.

- ✓ En orientación vertical, rotar el conjunto 2-3 veces en sentido horario para humedecer las superficies.
- ✓ Inspeccionar la correcta formación de una única burbuja en cada compartimento y su movimiento libre.
- ✓ Soltar las burbujas fijas mediante golpecitos sobre el cubre con el extremo redondeado de un lápiz.
- ✓ Incubar a 55 °C durante 60-67 h en un horno de hibridación con rotación a una velocidad de 4 rpm en horno *HIR10M* (Grant Boekel). Evitar la luz intensa.
- ✓ Es necesario revisar las burbujas y destruir las inmóviles por la mañana de los días intermedios de la incubación.

3.10.4.8. Lavados de la hibridación

Los lavados se realizaron en tubos de 50 ml tipo Falcón, con las soluciones y el protocolo de Agilent. Antes de comenzar el protocolo, se enciende el escáner de lectura e inicia el programa *ScanControl* para que los láseres estén a máximo rendimiento cuando el cristal de la micromatriz esté preparado.

Procedimiento

- ✓ Encender el baño a 37 °C.
- ✓ Rotular y llenar 2 tubos con 50 ml de la solución de lavado I (el tubo para desprender el cubreobjetos del cristal y el tubo para el primer lavado) y 1 tubo con la solución de lavado II. Disponer de gradillas para mantener estos tubos en vertical.
- ✓ Suplementar con 25 µl de Tritón X-102 las soluciones de lavado I y II (no es necesario añadirlo al primer tubo de la solución I).
- ✓ Mantener la solución II a 37 °C durante un mínimo de 30 min.
- ✓ Disponer un tubo de 50 ml con solución de estabilización y secado. Esta solución se reutiliza para 10 cristales. Si tiene precipitados, antes de su uso, centrifugar a velocidad máxima durante 2 min. Si está sucia o amarillenta, descartarla.
- ✓ Desmontar la cámara de hibridación y sumergir en el primer tubo con solución de lavado I el conjunto cristal-cubre, con las etiquetas hacia la superficie del líquido, y desacoplar ambos cristales haciendo palanca entre ambos con las pinzas.
- ✓ Separar ambos cristales evitando que el cubre raye la matriz y transferir el cristal de las micromatrices sujetándolo con las pinzas por el área del código de barras, o los bordes, al tubo de 50 ml que contiene la solución de lavado I a temperatura ambiente. Evitar cualquier contacto con el área impresa de la micromatriz y que la micromatriz sufra desecación (introducir esta lo antes posible en el tubo siguiente).
- ✓ Cerrar el tubo y ponerlo en horizontal y con la cara impresa del cristal hacia arriba en una caja opaca con tapa para mantener el cristal en oscuridad. El largo del tubo se colocará paralelo al movimiento del agitador. Evitar el deslizamiento del tubo dentro de la caja.
- ✓ Agitar durante 5 min a temperatura ambiente en un agitador horizontal a 85 rpm.
- ✓ Sacar el cristal con las pinzas lentamente para evitar burbujas y transferirlo sin demora al tubo con la solución II precalentada a 37 °C.
- ✓ Mantener en agitación horizontal a temperatura ambiente a 85 rpm exactamente durante 1 min.

- ✓ Retirar lentamente el cristal con las pinzas e introducirlo en el tubo con 50 ml de la solución de estabilización y secado durante unos segundos. Sacarlo lentamente de la solución. Se puede volver a introducir si el cristal presentara alguna burbuja o manchas.
- ✓ Guardar el cristal en un contenedor adecuado y en oscuridad hasta la lectura de la fluorescencia que ha de ser inmediata.

Soluciones

- ❖ **Soluciones de lavado I, lavado II y Tritón X-102**, de *Agilent Gene Expression Wash Buffer Kit*.
- ❖ **Solución de estabilización y secado** (Agilent)

3.10.4.9. Lectura de la fluorescencia

Las señales de fluorescencia se leyeron en un equipo *G2565BA* de Agilent. Este escáner posee dos láseres, que excitan, entre otros, los fluoróforos Cy3 y Cy5. El ADN control o de referencia marcado con el fluoróforo Cy5, presenta una longitud de onda de absorción de 532 nm, de excitación de 550-600 nm, y emite luz roja. El ADN muestra marcado con el fluoróforo Cy3, presenta una longitud de onda de absorción de 635 nm, de excitación de 655-695 nm, y emite luz verde. La emisión fluorescente es amplificada y convertida en una señal digital que permite su cuantificación. El programa *Scan Control* genera dos archivos en formato TIFF, uno por cada potencia de los láseres de excitación, que pueden visualizarse mediante cualquier programa de imagen, y donde se muestra en falso color el resultado de la cohibridación de los ácidos nucleicos marcados con las sondas de la micromatriz. Para el análisis de los datos de intensidades se usa el programa *Feature Extraction* (Agilent).

Procedimiento

- ✓ Con aire comprimido, eliminar el polvo del cristal y del estuche del escáner.
- ✓ Introducir cada cristal en su estuche con su cara impresa en el lado opuesto a la bisagra y hacia arriba, ya que el lector capta la fluorescencia a través del cristal.
- ✓ Colocar el estuche con el cristal de la micromatriz en el carrusel del lector e iniciar el análisis.

3.10.4.10. Procesado de las señales fluorescentes de hibridación

El procesamiento de las señales de fluorescencia y el análisis de los datos de micromatrices fueron realizados por el Dr. Antonio Rodríguez García (Instituto de Biotecnología de León, Inbiotec). Los valores de fluorescencia fueron normalizados y analizados con el paquete *limma* de *Bioconductor* (Smyth, 2005). Primero, las intensidades de fluorescencia neta se calcularon como media de la señal principal menos la mediana de la señal de fondo; cuando esta diferencia fue menor que la desviación estándar de la señal de fondo, el último valor fue utilizado como sustituto. Segundo, los logaritmos binarios de las intensidades netas Cy3/Cy5 se normalizaron (valores M_g) con loess cíclico y la mediana global utilizando el peso de los puntos (asignando el

peso de 1 a las sondas de CDS y de 10^{-6} al resto de las sondas), así los únicos valores considerados en la normalización fueron aquellos de los genes cromosomales, mientras que las sondas de pSCL4 fueron prácticamente descartadas. El valor M_g es proporcional a la abundancia de transcrito para un determinado gen (Mehra y col., 2006). Tercero, los valores de puntos que correspondían a la misma secuencia de sonda fueron promediados, y luego los valores de las sondas del mismo *locus* fueron promediados. Los datos de las sondas teseladas incluidas en el diseño de la micromatriz fueron descartados para este análisis. Los valores M_g de transcripción de las seis condiciones experimentales fueron comparados empleando los tres contrastes, la cepa mutante o de estudio frente a la control, en los tres tiempos de muestreo de los cultivos. Para cada gen, se calcularon los valores p y M_c (tres grupos de valores, uno para cada contraste). El valor M_c es el logaritmo binario de la diferencia de transcripción entre las cepas mutante y control. La tasa de corrección de falsos-positivos de Benjamini-Hochberg (BH) fue aplicada a los valores p . Para cada contraste, un resultado fue considerado estadísticamente significativo si el valor p BH-correctado era 0,05 en los estudios de *S. clavuligerus* frente a *S. clavuligerus* $\Delta clcR::aac$ o *S. clavuligerus* pSCL4⁻, y 0,1 en el estudio de *S. clavuligerus*::pIB139 frente a *S. clavuligerus*::pimM. Un valor M_c positivo indica sobreexpresión, y uno negativo, subexpresión del correspondiente gen-condiciones, de este modo, un valor M_c de +1 indica una sobreexpresión de 2 veces y un valor M_c de -1, una subexpresión de 2 veces. Los datos de las micromatrices utilizados en el presente trabajo han sido depositados o serán próximamente depositados en la base de datos *National Center for Biotechnology Information-Gene Expression Omnibus*.

3.11. Recursos informáticos

A lo largo del presente trabajo se emplearon diversas herramientas informáticas específicamente diseñadas para el manejo de información biológica.

El análisis *in silico* y el tratamiento rutinario de las secuencias de ADN ha sido realizado mediante el paquete informático **Vector NTI Advance™ 10 (Invitrogen)**. Los cromatogramas obtenidos tras la secuenciación del ADN, se visualizaron mediante la herramienta **Chromas**. Para el diseño de los oligonucleótidos para los análisis de expresión génica por RT-qPCR se empleó el programa **Primer3 v.0.4.0** (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>).

Las comparaciones de secuencias de ADN y proteínas con las bases de datos disponibles (EMBL) se llevaron a cabo con el motor de búsqueda de secuencias **BLAST** (*Basic Local Alignment*

Search Tool), en el servidor del **NCBI** (*National Center for Biotechnology Information* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)). Los alineamientos globales de secuencias aminoacídicas se obtuvieron con el programa **Pairwise Sequence Alignment (PROTEIN)** (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/). La predicción de estructuras tridimensionales de proteínas se llevó a cabo en el servidor **SWISS-MODEL** (<http://swissmodel.expasy.org/interactive>).

El análisis y las comparaciones de secuencias de ADN y proteínas de *Streptomyces* se realizaron a través de las bases de datos **StrepDB** (<http://strepdb.streptomyces.org.uk/>) y del **Broad Institute** (<http://www.broadinstitute.org/>) por poseer centralizados los genomas de varios *Streptomyces*. Para el estudio de relaciones filogenéticas se utilizó el paquete informático **MEGA 6** (Tamura y col., 2013). La predicción de lantipéptidos en el genoma de *S. clavuligerus* se obtuvo mediante el programa **antiSMASH 3.0.4**. (<http://antismash.secondarymetabolites.org/>) (Blin y col., 2014; Weber y col., 2015).

El diseño de las micromatrices de ADN de *S. clavuligerus* se llevó a cabo utilizando las herramientas **eArray** (<https://earray.chem.agilent.com/earray/helppages/index.htm>) y **chipD** (<http://energy.wisc.edu/chipd/manual.html>). El procesamiento, normalización y tratamiento estadístico de los datos obtenidos de las micromatrices, se realizó con el paquete informático **limma** de Bioconductor. Los datos de las micromatrices generados en el capítulo 4.2 del presente trabajo fueron depositados en la base de datos **National Center for Biotechnology Information-Gene Expression Omnibus** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/info/submission.html>).

Las bases de datos **PubMed** (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/) y **GenBank** (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/) han sido utilizadas principalmente para revisiones bibliográficas y de secuencias.

4. Resultados y discusión

**Capítulo 4.1. Expresión heteróloga de la agrupación
génica de la cefamicina C de *S. clavuligerus* ATCC 27064**

4.1.1. Introducción

La secuenciación del genoma de actinomicetos, aislados tanto de hábitats terrestres como acuáticos, ha permitido el descubrimiento de un gran número de agrupaciones génicas responsables de la producción de metabolitos secundarios que asciende aproximadamente a entre 20 y 30 agrupaciones por genoma. Esta información aumenta las perspectivas de la producción de nuevos y valiosos fármacos. La mayoría de las agrupaciones para metabolitos secundarios o bien son crípticas, y por tanto, el producto que codifican es desconocido (Medema y col., 2010), o bien son agrupaciones génicas silenciadas tales como la de la tienamicina o la del ácido clavulánico en *S. flavogriseus* (Blanco, 2012; Álvarez-Álvarez y col., 2013). La expresión génica heteróloga es una herramienta ampliamente empleada en biología molecular para la expresión de agrupaciones crípticas en hospedadores heterólogos y para la caracterización de los extremos de agrupaciones de metabolitos secundarios conocidos mediante su subclonación y la detección de la producción de los compuestos codificados. Esta técnica es útil también para conocer si la expresión de las agrupaciones génicas es independiente de reguladores globales que están separados de esta (Pérez-Llarena y col., 1997a; Wietzorrek y Bibb, 1997; Martín y Liras, 2010), y si requiere de una γ -butirolactona o proteína receptora de butirolactonas (Ohnishi y col., 1999; Pan y col., 2009; López-García y col., 2010; Salehi-Najafabadi y col., 2014). La expresión heteróloga ha sido igualmente utilizada para expresar agrupaciones génicas pertenecientes a organismos de crecimiento lento en otros de crecimiento más rápido y en aquellos casos en los que el compuesto es inestable o producido a muy bajos niveles (Gomez-Escribano y Bibb, 2011).

Se han construido cepas de *S. coelicolor* carentes de las agrupaciones génicas para sus propios antibióticos con el objetivo de facilitar el flujo metabólico hacia el metabolito expresado heterológamente. Además, algunas cepas hospedadoras presentan mutaciones puntuales en los genes *rpsL* y *rpoB* (Gomez-Escribano y Bibb, 2011) con el propósito de mejorar la maquinaria transcripcional y de traducción (Ochi y Hosaka, 2013). También han sido construidas cepas de *S. avermitilis* desprovistas de grandes fragmentos de ADN dispensable (Komatsu y col., 2010) y una cepa de *S. albus* carente del sistema de restricción-modificación, lo que permite la integración en su genoma de ADN exógeno (Chater y Wilde, 1976; 1980) y que ha sido utilizada con éxito en estudios de expresión heteróloga (Chen y col., 2008a; Olano y col., 2014).

La expresión heteróloga de una agrupación génica y el análisis del producto obtenido implica las siguientes etapas: 1) la clonación de la agrupación en el vector adecuado; 2) la elección de la

cepa hospedadora más apropiada, en función de la agrupación génica que se desea expresar y el producto que se quiere obtener; 3) la introducción y el mantenimiento estable de la agrupación génica en el genoma del hospedador, con la integración como una de las alternativas de mantenimiento más efectivas, ya que no requiere el empleo de antibióticos de selección que podrían interferir en la biosíntesis del compuesto a producir; 4) el cultivo de la cepa recombinante en las condiciones más adecuadas para la producción del compuesto de estudio, por lo que se consideran el crecimiento de la cepa, el rendimiento del compuesto, su facilidad de extracción, entre otros; y, finalmente, 5) el análisis comparativo de la producción del compuesto esperado, esto es, de su actividad biológica y naturaleza química, en el hospedador con y sin la agrupación génica clonada (Gomez-Escribano y Bibb, 2012; 2014).

La cefamicina C es un metabolito de gran atractivo en la industria farmacéutica como molécula base en la elaboración de cefamicinas semisintéticas, por lo que existe un gran interés en el aumento de sus niveles de producción. Los mecanismos de regulación y de resistencia, así como los límites exactos de la agrupación, no están totalmente dilucidados, por lo que la expresión heteróloga de esta agrupación se presenta como una alternativa muy útil para abordar estos objetivos.

Un particular modo de mejorar la expresión heteróloga es la expresión adicional en el hospedador de genes para activadores específicos de la producción de antibióticos en *Streptomyces* (SARP) (Komatsu y col., 2010; Jones y col., 2013). CcaR es una proteína SARP que activa la expresión de las agrupaciones de cefamicina C y ácido clavulánico en *S. clavuligerus* (Pérez-Llarena y col., 1997a). En esta cepa, el gen *ccaR* se localiza en la agrupación de cefamicina C. CcaR_C es una proteína autorreguladora que también se une a secuencias heptaméricas específicas situadas en la región promotora de los genes biosintéticos de cefamicina C *lat*, *cefD-cmcl* y *cefF* (Santamarta y col., 2011). *S. flavogriseus* ATCC 33331 no presenta en su genoma la agrupación de cefamicina C pero sí la de ácido clavulánico. En esta agrupación se incluye un gen (*ccaR_F*) que codifica el regulador CcaR_F, con un 63 % de similitud respecto al CcaR_C de *S. clavuligerus* (Álvarez-Álvarez y col., 2013).

Por todo ello, en este trabajo se planteó el estudio de la expresión heteróloga de la agrupación génica de la cefamicina C de *S. clavuligerus* y el gen regulador *ccaR_C*, expresado constitutivamente, en tres diferentes especies de *Streptomyces*, así como de la funcionalidad del gen *ccaR_F* de *S. flavogriseus* sobre la agrupación de cefamicina C de *S. clavuligerus*.

4.1.2. Obtención del cósmido portador de la agrupación génica de la cefamicina C

En nuestro grupo de trabajo se disponía de una genoteca de *S. clavuligerus* ATCC 27064 en el cósmido SuperCos 1 formada por 1656 clones, con un tamaño de inserto comprendido entre 30 y 42 kb, y mantenida en *E. coli* (Robles-Reglero, 2014). Este tipo de genotecas son muy apropiadas para aislar grandes fragmentos de ADN, como es el caso de la agrupación de aproximadamente 34 kb que codifica la producción de cefamicina C. Nuestra genoteca se encuentra organizada en un sencillo sistema piramidal, en el cual una placa maestra de 96 pocillos aún 18 placas del mismo formato, por lo que contiene en cada pocillo 18 clones diferentes (Martínez-Castro y col., 2009). Esta disposición permite una primera búsqueda, por hibridación *in situ* sobre colonias o por reacción en cadena de la polimerasa, a partir de una placa maestra de 96 pocillos, lo que proporciona robustez y rapidez frente a la laboriosa y lenta búsqueda clásica en múltiples placas.

4.1.2.1. Aislamiento del clon portador de la agrupación génica de la cefamicina C

Con el objetivo de disponer de un cósmido que contuviera íntegramente la agrupación de cefamicina C, se eligió como sonda para el rastreo de la genoteca la región intergénica *cmcH-ccaR*, localizada aproximadamente en la mitad de la agrupación. La sonda de 887 pb se obtuvo por PCR empleando los cebadores *cmcH-ccaR_FD* y *cmcH-ccaR_RP* (tabla 7.1, Anexo) y se marcó con digoxigenina.

La sonda marcada se incubó junto con una membrana de nailon a la que se habían transferido los clones de la placa maestra de la genoteca y en la que, por tanto, estaba representado el genoma de *S. clavuligerus*. Tras la hibridación y el revelado de la señal (apartado 3.5.9), un punto de la membrana, o grupo de 18 cósmidos, que mostró un precipitado oscuro, se consideró candidato a contener la agrupación de la cefamicina C (figura 4.1).

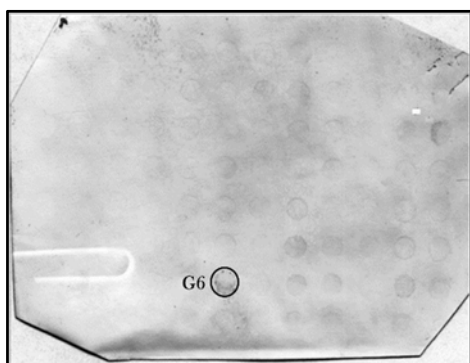


Figura 4.1. Hibridación de la sonda *cmcH-ccaR* con el ADN de las colonias de la placa maestra de la genoteca de *S. clavuligerus* fijado en la membrana. Los 96 pocillos se ordenan en columnas de izquierda a derecha (1-12) y en filas de arriba a abajo (A-H). Se indica la señal positiva marcada con un círculo y su coordenada en la placa de maestra. Los puntos A1 y H12 son controles negativos, esto es, *E. coli* XL1-Blue sin cósmido.

Identificada en la membrana la señal de precipitado (G6), los 18 clones individuales representados en dicho pocillo de la placa maestra se analizaron por PCR. Para ello, se utilizaron los mismos cebadores empleados en la obtención de la sonda y correspondientes a la región *cmcH-ccaR*. De los 18 clones analizados, G6_15 rindió el fragmento de PCR esperado de 887 pb y, por tanto, se consideró candidato a contener la agrupación génica de la cefamicina C (figura 4.2).

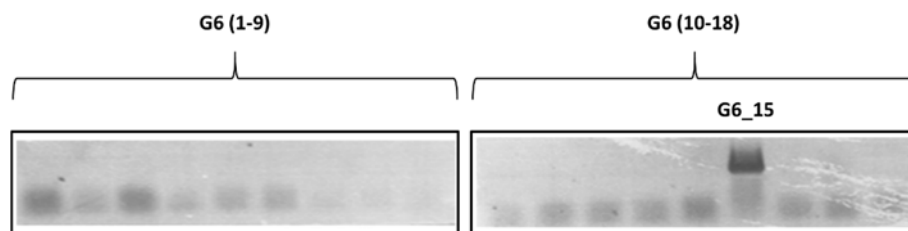


Figura 4.2. PCR de los 18 clones individuales de *E. coli* correspondientes a la señal de la coordenada G6 de la hibridación. Solo el clon G6_15 rindió un fragmento correspondiente a la región *cmcH-ccaR*.

La secuenciación de este producto de PCR con los cebadores mencionados permitió concluir que el clon G6_15 contenía el cósmido portador de la región intergénica *cmcH-ccaR* de la agrupación de la cefamicina C (Kurt y col., 2013).

4.1.2.2. Caracterización del cósmido G6_15

Para conocer la extensión del fragmento de ADN contenido en el cósmido G6_15, se secuenciaron los extremos de la región clonada en SuperCos 1 con los cebadores T3 y T7 (tabla 7.1, Anexo), los cuales hibridan en los extremos del cósmido. Estas secuencias se contrastaron con las publicadas en la base de datos de *S. clavuligerus* del *Broad Institute* y *StrepDB*. Según la nomenclatura de esta última, los extremos del fragmento incorporado en el cósmido correspondían a regiones internas de los genes SCLAV_4215 (*bla*) y SCLAV_4196 (*bls2*). Considerando que la distancia entre estos dos genes es de 35,6 kb, tamaño que se ajusta a la capacidad de empaquetamiento de ADN en SuperCos 1 (entre 30 y 42 kb), y que ambos genes flanquean la agrupación génica de la cefamicina C (apartado 1.2.2), se concluyó que dicha agrupación estaba completa, desde el gen *pbp74* al *pcbR*, en el cósmido G6_15 (figura 4.3).

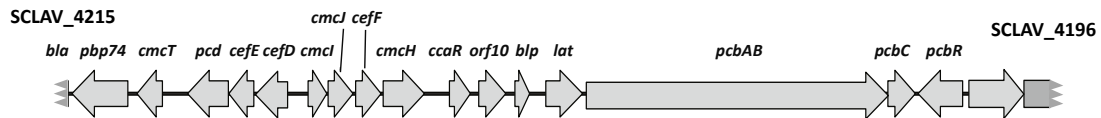


Figura 4.3. Identificación de los extremos de la región clonada en el cósmido G6_15. Se indican, en color oscuro y como genes truncados con el número identificativo SCLAV, los extremos del inserto clonado, y el nombre de los genes de la agrupación biosintética de la cefamicina C.

Tras la secuenciación de los extremos del inserto, se llevó a cabo una caracterización más detallada del cósmido por comparación de patrones de digestión, ya que durante la obtención de las genotecas la inestabilidad de ciertas secuencias puede dar lugar a la aparición de deleciones resultantes de procesos de recombinación independientes de *recA*. La enzima de restricción elegida fue *BamHI* y el patrón de bandas de digestión de G6_15 fue contrastado con el análisis *in silico* obtenido con el programa *Vector NTI*[®] (figura 4.4).

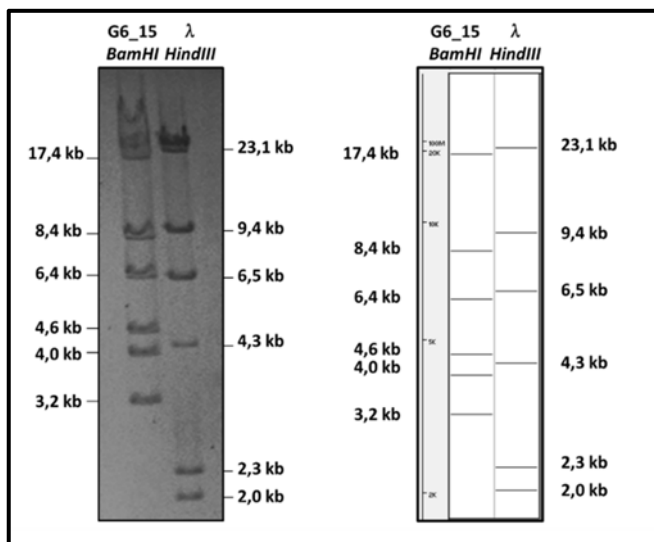


Figura 4.4. Comparación del patrón de digestión del cósmido G6_15 digerido con *BamHI* (imagen izquierda) con el patrón informático obtenido *in silico* (esquema derecho). Se indica el tamaño en kb de los fragmentos de digestión.

Los tamaños de los fragmentos de la digestión de la construcción G6_15 coincidieron con la predicción *in silico*. Además, tanto la suma del tamaño del SuperCos 1 (7,9 kb) y el del fragmento que media entre los dos genes secuenciados con los cebadores T3 y T7 (35,67 kb), como la suma del tamaño de los fragmentos de digestión con *BamHI* experimental u obtenida *in silico* (17,4; 8,4; 6,4; 4,6; 4,0 y 3,2 kb; figura 4.4), dieron un total de 44 kb. Esto confirma la presencia de la agrupación de la cefamicina C completa, desde el gen *pbp74* a *pcbR*, en el cósmido G6_15 (figura 4.3).

4.1.3. Construcción de un plásmido para la integración y expresión constitutiva del gen regulador *ccaR*

Aunque el gen *ccaR* se localiza en la agrupación de cefamicina C, su interrupción provoca la incapacidad para producir cefamicina C y ácido clavulánico en *S. clavuligerus* (Pérez-Llarena y col., 1997b; Alexander y Jensen, 1998).

Ante la posible existencia de un regulador de jerarquía superior que module la transcripción de *ccaR* en *S. clavuligerus*, se diseñó una construcción integrativa en la que *ccaR* se encuentra bajo el control del promotor constitutivo del gen *furS* (Ortiz de Orué Lucana y col., 2003). Con el objetivo de conseguir una mayor estabilidad del gen heterólogo se optó por su integración en el genoma del hospedador. Se eligió, por su eficacia, el vector integrativo pMS82 (Gregory y col., 2003), portador del sitio de integración, *attP*, y la integrasa, *int*, del fago Φ BT1, además del marcador de selección de higromicina (*hpt*). El gen *ccaR* sin su promotor se amplificó desde el ADN total de *S. clavuligerus* mediante una polimerasa de alta fidelidad y los cebadores *ccaR_F* y *ccaR_R* (tabla 7.1, Anexo), obteniéndose un fragmento de 809 pb. Estos cebadores presentan sitios de reconocimiento para *NcoI* y *HindIII*, respectivamente. De este modo, el producto de PCR (*ccaR* sin promotor) y el vector portador del gen constitutivo *furS*, pUFurReg+ (Ortiz de Orué Lucana y col., 2003), se digirieron con estas dos enzimas de restricción. Posteriormente, vector e inserto digeridos fueron ligados, obteniéndose la construcción pUFurReg+_*ccaR* (figura 4.5). La fidelidad de copia del gen *ccaR* subclonado se comprobó por secuenciación usando los cebadores *ccaR_F* y *ccaR_R* (tabla 7.1, Anexo).

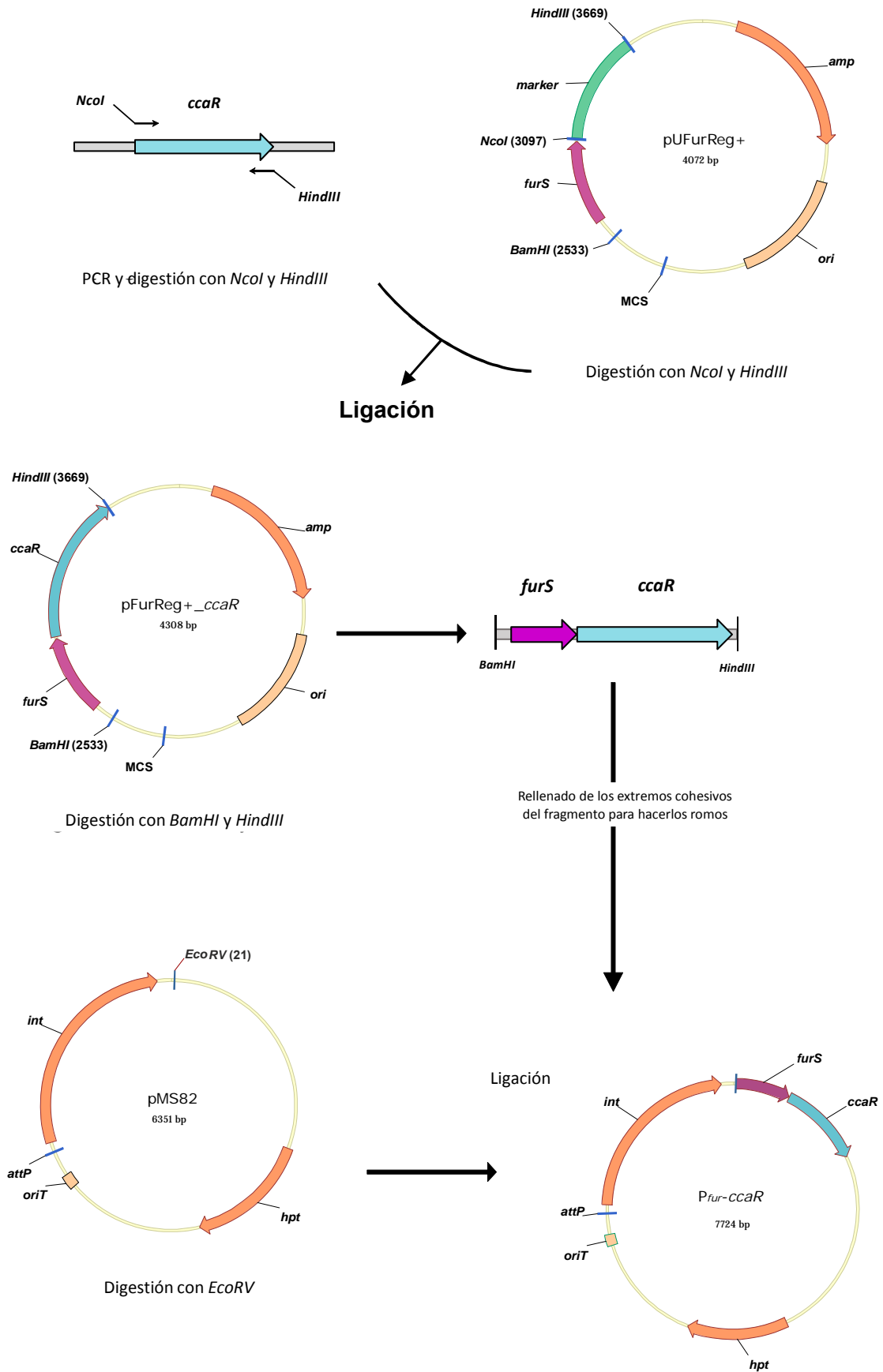


Figura 4.5. Esquema del proceso de construcción del plásmido *P_{fur}-ccaR*.

La construcción pUFurReg+*ccaR* se digirió con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III para obtener el gen *ccaR* fusionado en marco de lectura al gen constitutivo *furS*, obteniendo el fragmento *furS-ccaR* de 1,4 kb. Los extremos cohesivos de este fueron rellenados con la enzima Klenow para obtener un fragmento *furS-ccaR* con extremos romos. El nuevo fragmento se ligó con el vector pMS82 digerido con *Eco*RV, obteniendo así la construcción integrativa *P_{fur-ccaR}* (figura 4.5). El plásmido resultante, *P_{fur-ccaR}* para integrar en el genoma de las cepas hospedadoras de *Streptomyces*, fue caracterizado junto con su antecesor, pUFurReg+*ccaR*, por digestión con *Kpn*I (figura 4.6, panel derecho e izquierdo, respectivamente).

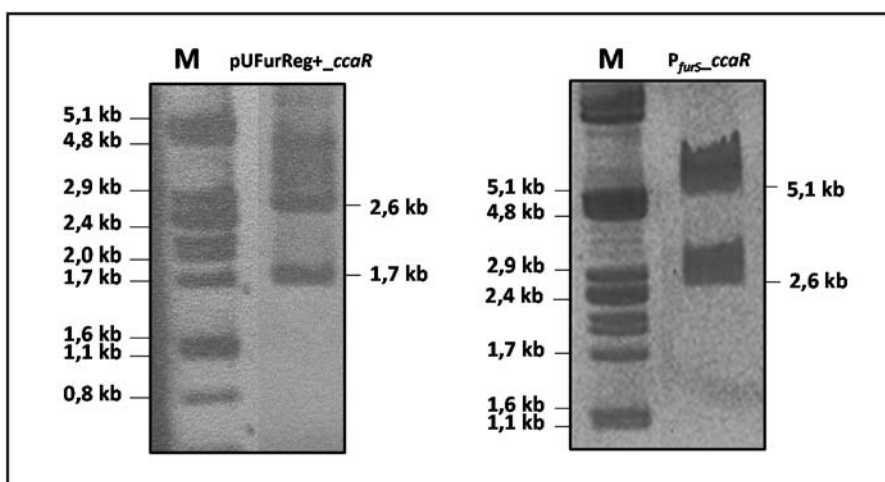


Figura 4.6. Caracterización de las construcciones pUFurReg+*ccaR* (panel izquierdo) y *P_{fur-ccaR}* (panel derecho) por digestión con *Kpn*I. Genoma del fago lambda digerido con *Pst*I (M). Se indica el tamaño en kb de los fragmentos de digestión.

4.1.4. Construcción de un plásmido para la integración de la agrupación de la cefamicina C

Para conseguir el mantenimiento estable de la agrupación de cefamicina C en la cepa hospedadora, esta ha de ser integrada en el genoma. Para ello, en el cósmido con la agrupación de cefamicina C, G6_15 (apartado 4.1.2.2), se subclonó un casete de integración. El casete elegido se compone del sitio *attP* y la integrasa, *int*, del fago ΦC31 (Gregory y col., 2003), el marcador de selección de tetraciclina, *tet*, y un origen de transferencia, *oriT*, y pertenece al vector pFL1272, un derivado de pBluescript. La elección de este casete se debió a la compatibilidad del *attP* del fago ΦC31 con el *attP* del fago ΦBT1 presente en la construcción de integración del gen regulador *ccaR*, *P_{fur-ccaR}* (apartado 4.1.3).

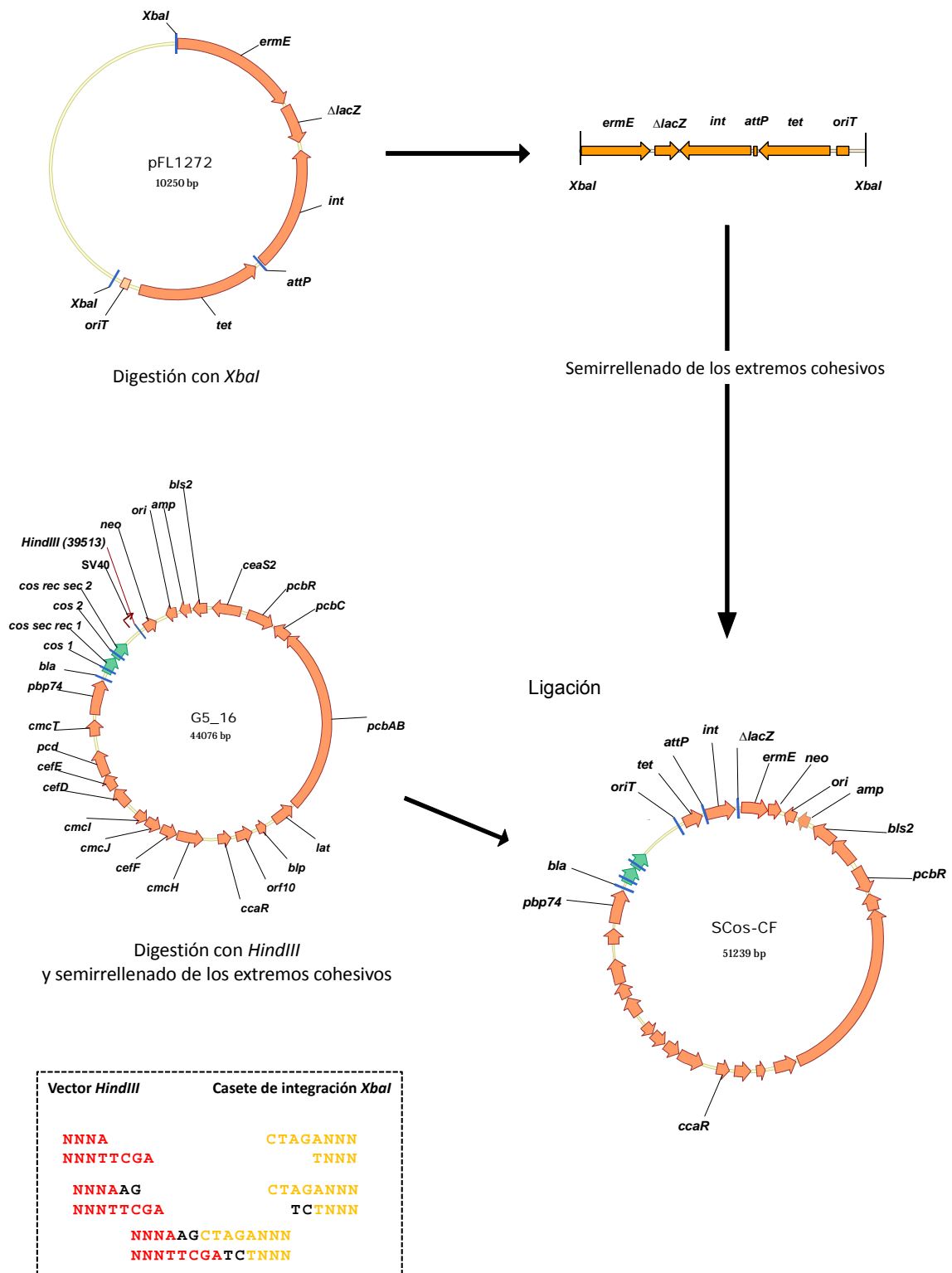


Figura 4.7. Esquema del proceso de obtención de la construcción SCos-CF. En el recuadro se indica el proceso de semirrelleno y ligación de los extremos del vector, en rojo, y del inserto, en amarillo. Los nucleótidos del semirrelleno se señalan en negro.

El casete de integración (de aproximadamente 8 kb) se obtuvo por digestión del vector pFL1272 con *XbaI*. El cósmido G6_15 fue linearizado por el sitio único de corte *HindIII*, situado en el promotor SV40 del SuperCos1. Los extremos generados en ambos casos fueron semirrellenados y ligados, para obtener SCos-CF (figura 4.7).

La digestión con la enzima *BamHI* de SCos-CF originó dos fragmentos de 1,8 kb y 3,8 kb ausentes en G6_15 (figura 4.8, panel izquierdo, carriles 2 y 1, respectivamente), y presentes en pFL1272, plásmido del que se obtiene el casete de integración (figura 4.8, panel derecho, carril 3), con lo que se comprobó la subclonación del casete de integración en el cósmido portador de la agrupación génica de la cefamicina C.

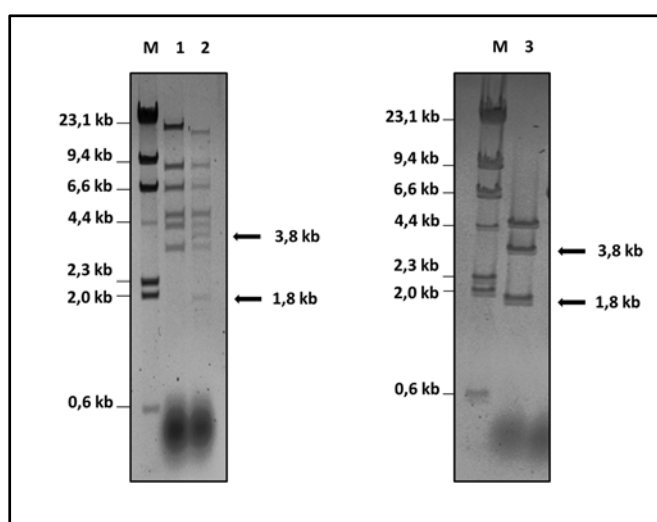


Figura 4.8. Caracterización del cósmido SCos-CF y sus vectores parentales por digestión. Genoma del fago lambda digerido con *HindIII* (M). G6_15 (1), SCos-CF (2) y pFL1272 (3), digeridos con *BamHI*. Se indica el tamaño en kb de los fragmentos de digestión.

4.1.5. Obtención de las cepas de expresión heteróloga: integración de $P_{fur-ccaR}$ y de la agrupación génica de la cefamicina C

4.1.5.1. Elección de las cepas hospedadoras para la expresión heteróloga

Dentro del grupo de los actinomicetos, se ha llevado a cabo con éxito la expresión heteróloga de agrupaciones génicas de interés en diferentes especies de *Streptomyces*. La proximidad filogenética entre cepas y el fondo genético del hospedador respecto al donador, además de la existencia de reguladores específicos de la agrupación como es el CcaR, podrían ser importantes para una expresión génica eficiente.

Las cepas con las que se decidió probar la expresión de los genes de cefamicina C fueron tres: *S. coelicolor* M1146, *S. albus* J1074 y *S. flavogriseus* ATCC 33331. *S. coelicolor* M1146 es una cepa obtenida a partir de *S. coelicolor* M145 tras la eliminación de los genes de las agrupaciones

biosintéticas de actinorrodina, undecilprodigiosina, el antibiótico dependiente de calcio y el antibiótico CPK, lo que facilita la producción heteróloga de agrupaciones de metabolitos secundarios (Gomez-Escribano y col., 2011). *S. albus* J1074 (Chater y Wilde, 1976; 1980) carece de actividad endonucleasa, lo que permite la integración en su genoma de ADN exógeno, y ha sido utilizada con éxito en estudios de expresión heteróloga (Chen y col., 2008a; Olano y col., 2014). *S. flavogriseus* ATCC 33331, especie próxima a *S. clavuligerus*, fue elegida debido a la relación que parece establecerse entre la proximidad filogenética existente entre las cepas donadora y receptora del material genético y el éxito de la producción heteróloga. Tal vínculo se ha observado en las expresiones heterólogas de cefamicina C y de ácido clavulánico de *S. clavuligerus* en *S. avermitilis* (Komatsu y col., 2010) y en *S. flavogriseus* (Álvarez-Álvarez y col., 2013), respectivamente. Como ya se mencionó, esta última especie presenta la agrupación de ácido clavulánico, aunque no se ha detectado su producción, y codifica un regulador CcaR_F con un 63 % de similitud con el de *S. clavuligerus* (Álvarez-Álvarez y col., 2013).

A continuación, con el objeto de conocer la relación de proximidad evolutiva entre las cepas hospedadoras elegidas y el donador, se llevó a cabo un análisis filogenético de sus secuencias del ARNr 16S, además de las de *S. avermitilis* y *Streptomyces platensis*, ambas comentadas en el presente capítulo (figura 4.9). Las siguientes secuencias de ARNr 16S se obtuvieron desde la base de datos GenBank: *S. clavuligerus* ATCC 27064, AY999718; *S. flavogriseus* ATCC 33331, NR_074559.1; *S. coelicolor* A3(2), Y00411.1; *S. albus* J1074, NR_102949; *S. avermitilis*, AF145223.1 y *S. platensis* IFO 12901, AB045882. A partir de estas secuencias, se construyó un cladograma *Neighbor-Joining* con el programa *MEGA6* (Tamura y col., 2013) utilizando una matriz de distancias Tamura-Nei (Tamura y col., 1993). Con el mismo programa se llevó a cabo el alineamiento de las secuencias con el ClustalW y se calcularon los valores de robustez o *bootstrap* de los nodos (en porcentaje) con 1000 muestras. El árbol se enraizó a la secuencia del ARNr 16S de *Streptacidiphilus griseosporus* IS104 (número de acceso, AY530182.1). Como se observa en el cladograma, *S. flavogriseus* es filogenéticamente más próximo a *S. clavuligerus* que *S. coelicolor* y *S. albus* (figura 4.9).

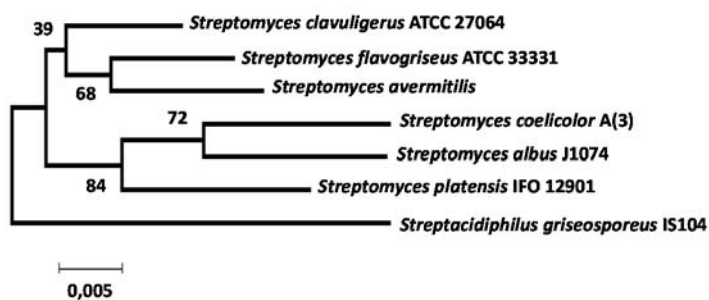


Figura 4.9. Árbol filogenético basado en la secuencia génica del ARNr 16S de los actinomicetos seleccionados. Los valores de robustez o *bootstrap* (en porcentaje) se calcularon con 1000 muestras y se muestran en los respectivos nodos. La barra de escala representa 0,005 % de divergencia entre las secuencias.

4.1.5.2. Integración del gen regulador *ccaR* en el genoma de los hospedadores

El gen regulador *ccaR* bajo el control del promotor del gen constitutivo *furS* fue transferido por conjugación en el plásmido $P_{fur-ccaR}$ (apartado 4.1.3) desde *E. coli* ET12567/pUZ8002 a las cepas de *Streptomyces* de expresión heteróloga. Los exconjugantes se seleccionaron por resistencia a higromicina. La integración de la construcción en el genoma, en el sitio *attB* del fago de Φ BT1, se analizó por PCR empleando como molde el ADN genómico aislado de los exconjugantes o de las cepas originales, y los cebadores *ccaR_F* y *ccaR_R* (tabla 7.1, Anexo) que amplifican el gen *ccaR* sin promotor. El amplicón de 809 pb, que se muestra en el carril 3 de las tres imágenes (figura 4.10), fue recuperado del gel de agarosa y se secuenció con los mismos cebadores para comprobar que su secuencia correspondía al gen *ccaR*. De este modo, se obtuvieron las cepas *S. flavogriseus*::[$P_{fur-ccaR}$], *S. coelicolor* M1146::[$P_{fur-ccaR}$] y *S. albus* J1074:: [$P_{fur-ccaR}$].



Figura 4.10. Comprobación mediante PCR de la integración de *ccaR* en las diferentes cepas de expresión heteróloga: *S. flavogriseus* ATCC 33331, *S. coelicolor* M1146 y *S. albus* J1074. *S. clavuligerus*, control positivo (1). Cepa de expresión heteróloga, control negativo (2). Cepa de expresión heteróloga con el plásmido $P_{fur-ccaR}$ integrado (3).

4.1.5.3. Integración de la agrupación génica de la cefamicina C en el genoma de los hospedadores

El cósmido integrativo con la agrupación de la cefamicina C, SCos-CF (apartado 4.1.4), fue transferido por conjugación desde *E. coli* ET12567/pUZ8002 a las cepas de *Streptomyces* de expresión heteróloga parentales y a las portadoras del gen regulador *ccaR* integrado (apartado 4.1.5.2). Los exconjugantes fueron seleccionados por resistencia a kanamicina.

Por otro lado, con el objetivo de analizar si el regulador endógeno CcaR_F de *S. flavogriseus* podía activar la transcripción de los genes de la agrupación génica de la cefamicina C integrados a través de SCos-CF, se deletionó el gen *ccaR_C* de *S. clavuligerus* en SCos-CF. Para ello, se utilizó el método ReDirect[®] con los cebadores *ccaR_Red_For* y *ccaR_Red_Rev* (tabla 7.1, Anexo) y se sustituyó el gen *ccaR* por el casete de selección de apramicina, *aac(3)IV*, obteniendo así la construcción SCos-CFΔ*ccaR* (no mostrado). Esta construcción fue transferida por conjugación desde *E. coli* ET12567/pUZ8002 a *S. flavogriseus* y se integró en su genoma. Los exconjugantes se seleccionaron por resistencia a apramicina.

La integración de las construcciones, SCos-CF o SCos-CFΔ*ccaR*, en el sitio de *attB* del fago ΦC31 del genoma de las correspondientes cepas, se analizó por PCR empleando el ADN genómico aislado de los exconjugantes como molde y los cebadores *cmcJ_FC* y *cmcJ_RC*, *ccaR_F* y *ccaR_R* y, adicionalmente para SCos-CFΔ*ccaR*, la pareja *Am_F* y QRT-2-D, cebadores que hibridan en el casete de apramicina y en la región intergénica *ccaR-cmcH*, respectivamente (tabla 7.1, Anexo) (no mostrado). El fragmento amplificado de *cmcJ* presentó el tamaño esperado, tanto en los exconjugantes como en el control positivo *S. clavuligerus*. Los fragmentos de 0,6 kb, se aislaron del gel y se secuenciaron con los mismos cebadores para comprobar que su secuencia correspondía a *cmcJ*. Como era de esperar, no hubo amplificación con *ccaR_F* y *ccaR_R* sobre el exconjugante derivado de SCos-CFΔ*ccaR*, pero sí en el control positivo. La pareja de cebadores *Am_F* y QRT-2-D amplificaron un fragmento de 1,5 kb a partir de la construcción SCos-CFΔ*ccaR*. De este modo, se demostró la integración del cósmido SCos-CF en las tres cepas donde ya se había integrado *ccaR* (apartado anterior) y en las tres parentales, así como la de SCos-CFΔ*ccaR* en *S. flavogriseus*. En la tabla 4.1, se indican las diferentes cepas de *Streptomyces* para expresión heteróloga obtenidas y empleadas.

Cepa parental	Cepa con <i>ccaR</i> constitutivo integrado	Cepa con la agrupación de cefamicina C integrada	Cepa con la agrupación de cefamicina C y <i>ccaR</i> constitutivo integrados
<i>S. coelicolor</i> M1146	<i>S. coelicolor</i> M1146::[P _{fur} - <i>ccaR</i>]	<i>S. coelicolor</i> M1146::[SCos-CF]	<i>S. coelicolor</i> M1146::[SCos-CF]::[P _{fur} - <i>ccaR</i>]
<i>S. albus</i> J1074	<i>S. albus</i> J1074::[P _{fur} - <i>ccaR</i>]	<i>S. albus</i> J1074::[SCos-CF]	<i>S. albus</i> J1074::[SCos-CF]::[P _{fur} - <i>ccaR</i>]
<i>S. flavogriseus</i> ATCC 33331	<i>S. flavogriseus</i> ::[P _{fur} - <i>ccaR</i>]	<i>S. flavogriseus</i> ::[SCos-CF]	<i>S. flavogriseus</i> ::[SCos-CF]::[P _{fur} - <i>ccaR</i>]
<i>S. flavogriseus</i> ATCC 33331		<i>S. flavogriseus</i> ::[SCos-CFΔ <i>ccaR</i>]	

Tabla 4.1. Cepas de expresión heteróloga con integración del regulador *ccaR* controlado por P_{fur} y/o las diferentes versiones de la agrupación de la cefamicina C, con o sin *ccaR* controlado por su promotor.

4.1.6. Caracterización de las cepas de expresión heteróloga

La caracterización de las cepas de expresión heteróloga obtenidas consistió en el análisis de: 1) la producción del metabolito obtenido heterológamente y la confirmación de su estructura química por HPLC-MS, 2) la resistencia de los exconjugantes a antibióticos β -lactámicos, y finalmente, 3) los niveles de transcripción de los genes de la agrupación de cefamicina C.

4.1.6.1. Análisis de la producción de cefamicina C

La producción de metabolitos puede verse favorecida por el cultivo del microorganismo en medio sólido frente al medio líquido (Barrios-González y col., 2003; López-Calleja y col., 2012). Por ello, se analizó la producción de cefamicina C en diferentes medios de cultivo con agar al 2 %.

Los medios de cultivo sólidos ensayados fueron: TSA y SA, de producción de cefamicina C en *S. clavuligerus*, TBO, MS, MEY, ME e ISP4, de esporulación de *Streptomyces*, dada la íntima y directa relación entre esporulación y metabolismo secundario en este género, y 2xTY, como medio adicional. Las siete cepas de estudio (tabla 4.1), además de sus controles parentales, se cultivaron en medio líquido TSB durante 48 horas a 220 rpm y a la temperatura óptima para cada especie y, desde este cultivo líquido, se sembraron en medio TSA. Posteriormente, tras 24 horas de crecimiento, con el micelio producido en TSA, se sembraron las placas con los diferentes medios a ensayar. Se tomaron tacos de agar de las placas a las 24, 48, 72 y 96 horas, y se ensayaron frente a *E. coli* Ess22-31 para analizar la producción de cefamicina C. Se introdujeron modificaciones en los parámetros del bioensayo, tales como reducción en el porcentaje de agar hasta 1 % final y el aumento del tiempo de incubación a 4 °C hasta 6 horas, para facilitar la difusión del antibiótico en la placa de bioensayo.

Ningún halo de inhibición se detectó en los exconjugantes derivados de *S. coelicolor* M1146 o *S. albus* J1074 independientemente del medio o del tiempo ensayado (no mostrado). Sólo *S. flavogriseus*::[SCos-CF] (figura 4.11) y *S. flavogriseus*::[SCos-CF>::[P_{fur}-ccaR] (no mostrado) inhibieron el crecimiento de *E. coli* Ess22-31 en todos los medios ensayados, excepto en 2xTY y SA. En las dos diferentes cepas de *S. flavogriseus* que produjeron cefamicina C, los mayores niveles se detectaron en los medios TBO y MEY (figura 4.11), pero también se observaron halos en los otros medios de esporulación, ME, MS e ISP4, y en TSA, por lo que la producción heteróloga de cefamicina C no parece estar especialmente ligada a la esporulación en *S. flavogriseus*.

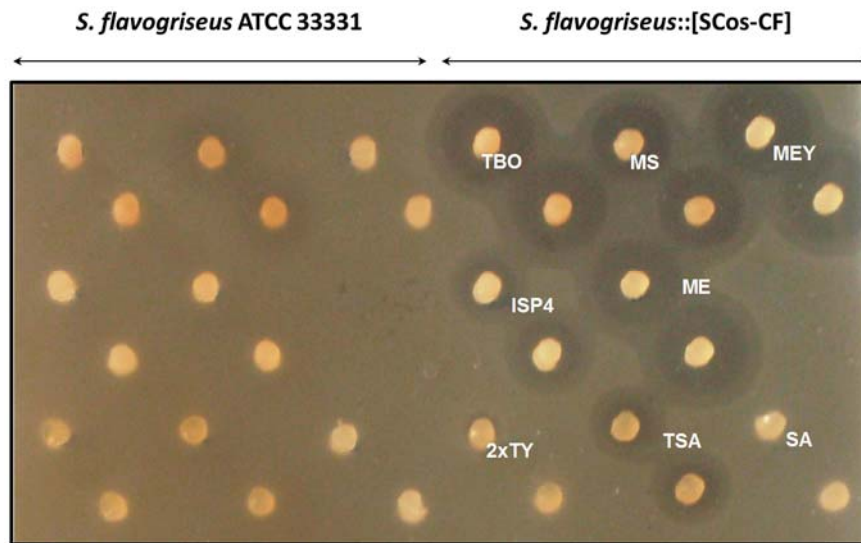


Figura 4.11. Bioactividad frente a *E. coli* supersensible Ess22-31 de los cultivos de *S. flavogriseus* ATCC 33331 y *S. flavogriseus*::[SCos-CF] obtenidos tras crecer durante 48 horas en los diferentes medios de cultivo sólido. Se detecta actividad de la cefamicina C en *S. flavogriseus*::[SCos-CF] en los medios TBO, MS, MEY, ISP4, ME, TSA, pero no en 2xTY y SA.

A diferencia de lo observado en la producción heteróloga de ácido clavulánico en *S. flavogriseus* (Álvarez-Álvarez y col., 2013), la integración de una copia de *ccaR* de *S. clavuligerus* expresada constitutivamente bajo el control del promotor del gen *furS* en *S. flavogriseus*::[*P_{fur}-ccaR*]:[SCos-CF], aumentó la producción de cefamicina C respecto a *S. flavogriseus*::[SCos-CF], que únicamente contiene la agrupación de cefamicina C de *S. clavuligerus* integrada. Sin embargo, y al igual que ocurrió en la producción de ácido clavulánico en *S. flavogriseus* (Álvarez-Álvarez y col., 2013), la copia endógena del regulador *ccaR* propio de *S. flavogriseus*, *ccaR_F*, no fue suficiente para activar la producción de cefamicina C en *S. flavogriseus*::[SCos-CFΔ*ccaR*] (no mostrado).

Tras los resultados obtenidos, la producción del antibiótico en *S. flavogriseus*::[SCos-CF] y *S. flavogriseus* ATCC 33331 fue analizada en medio líquido TBO y MEY. Se observó que la producción de cefamicina C en *S. flavogriseus*::[SCos-CF] era similar en ambos medios (figura 4.12).

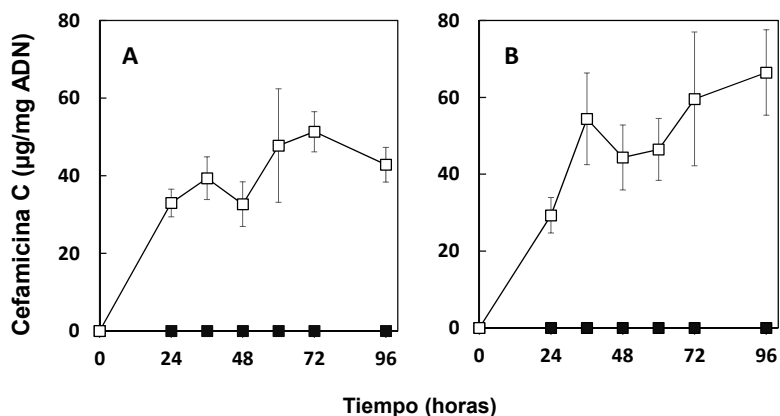


Figura 4.12. Producción específica de cefamicina C en medio líquido TBO (A) y MEY (B) por *S. flavogriseus*::[SCos-CF] (cuadrados blancos) y *S. flavogriseus* (cuadrados negros). La desviación estándar de cada punto se representa mediante líneas verticales.

Para estandarizar el medio de cultivo con el empleado en el estudio de la expresión heteróloga de ácido clavulánico en *S. flavogriseus* (Álvarez-Álvarez y col., 2013), se eligió el medio líquido TBO para los posteriores análisis.

Los niveles más altos de cefamicina C en medio TBO fueron los de *S. clavuligerus* ATCC 27064 (18 mg/mg de ADN a 72 h de cultivo) (figura 4.13, A). *S. flavogriseus* ATCC 33331, los exconjugantes derivados de *S. coelicolor* M1146 y *S. albus* J1074 no produjeron cefamicina C. La agrupación génica de la cefamicina C activada por su propio regulador CcaR_c en *S. flavogriseus*::[SCos-CF] resultó en una producción de cefamicina C de 60 µg/mg de ADN (figura 4.13, C). En presencia de una copia adicional de *ccaR*, expresada desde el promotor P_{fur}, *S. flavogriseus*::[SCos-CF]::[P_{fur}-*ccaR*], se obtuvieron hasta 5,8 mg de cefamicina C/mg de ADN (figura 4.13, B). Esto es casi 100 veces superior a la producción de *S. flavogriseus*::[SCos-CF] pero constituye el 32 % de la de *S. clavuligerus* cultivado en las mismas condiciones. De este modo, se observó que la optimización del medio y las condiciones de cultivo (Flinspach y col., 2010), el aumento de la dosis de genes reguladores activadores o su expresión por promotores fuertes (Komatsu y col., 2010; Goranovič y col., 2012; Álvarez-Álvarez y col., 2013), no mejoraron sustancialmente el rendimiento de la biosíntesis heteróloga de cefamicina C respecto a *S. clavuligerus*, como ha sido descrito en otros casos, tales como en la producción heteróloga de la microbisporicina o pladienolidas (Foulston y Bibb, 2010; Komatsu y col., 2010).

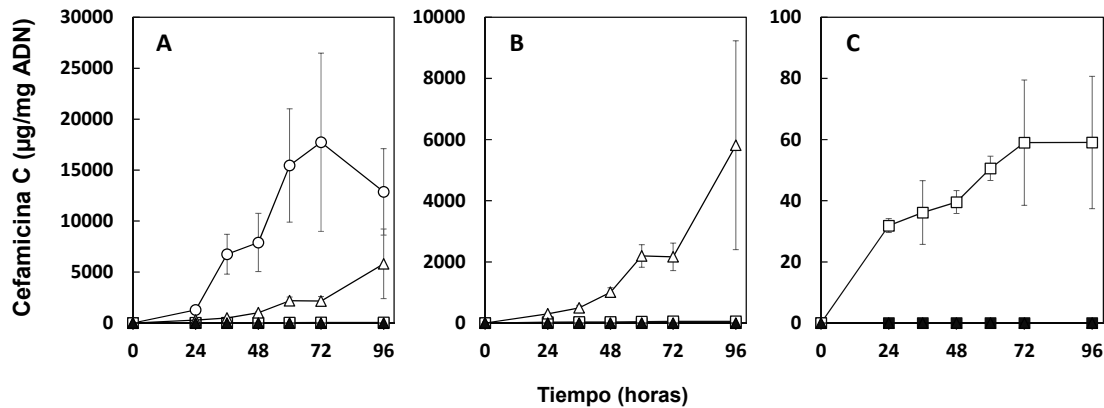


Figura 4.13. Producción específica de cefamicina C en medio líquido TBO por *S. clavuligerus* (círculos blancos), *S. flavogriseus* (cuadrados negros), *S. flavogriseus::[SCos-CF]* (cuadrados blancos), *S. flavogriseus::[SCos-CF::ΔccaR]* (triángulos negros) y *S. flavogriseus::[SCos-CF::Pjur-ccaR]* (triángulos blancos). Las gráficas representan diferentes escalas de la misma producción. La desviación estándar de cada punto se representa mediante líneas verticales.

S. flavogriseus contiene su propio gen *ccaR_F*, que se localiza en la agrupación del ácido clavulánico (Álvarez-Álvarez y col., 2013). Para saber si la proteína CcaR_F endógena era funcional y, por tanto, capaz de activar los genes biosintéticos heterólogos, se contruyó el cósmido SCos-CFΔ*ccaR* que fue integrado en *S. flavogriseus* ATCC 33331 (apartado 4.1.5.3). Como se muestra en la figura 4.13 C, *S. flavogriseus::[SCos-CF::ΔccaR]* no sintetizó cefamicina C a un nivel detectable. Esto confirma que el regulador CcaR_F de *S. flavogriseus* no es eficiente en la activación de la expresión heteróloga de la agrupación génica de la cefamicina C, como se mostró previamente para la expresión heteróloga de ácido clavulánico (Álvarez-Álvarez y col., 2013).

S. flavogriseus, así como *S. avermitilis*, en el que los niveles de producción heteróloga de cefamicina C son buenos (Komatsu y col., 2010) son cepas filogenéticamente más próximas a *S. clavuligerus* que *S. albus* J1074 o *S. coelicolor* A3(2) (Zhou y col., 2011) (figura 4.9). Esto podría explicar la ausencia de producción heteróloga observada en estas dos últimas especies, tanto para cefamicina C, según se ha mostrado, como para el ácido clavulánico (Álvarez-Álvarez y col., 2013). A la distancia filogenética se puede deber también la ausencia de producción heteróloga de pladienolida en *S. avermitilis* a partir de la agrupación de *S. platensis* Mer-11107 (Komatsu y col., 2010) o de frederamicina de *S. griseus* en *S. albus*, pero no en *S. lividans* (Chen y col., 2008a). Un ejemplo particularmente interesante es el de la holomicina en *S. clavuligerus*. La holomicina se superproduce en cepas carentes del plásmido pSCL4 que probablemente contiene un gen que codifica un represor de la holomicina (Álvarez-Álvarez y col., 2014a). Se esperaría

que la expresión heteróloga en ausencia de esta proteína represora resultara en una producción de holomicina muy eficiente; sin embargo, la holomicina es pobremente producida en *S. albus* o *S. coelicolor* (Huang y col., 2011; Robles-Reglero y col., 2013) y moderadamente producida en la cepa filogenéticamente próxima *S. avermitilis* (Ikeda y col., 2014). Por todo ello, el fondo genético propio de cada cepa parece afectar a la expresión de la agrupación génica de estudio y a la producción del compuesto codificado heterológamente.

En general, la expresión heteróloga de agrupaciones para metabolitos secundarios rinde una baja producción del compuesto obtenido. Esto es aplicable tanto para pequeñas agrupaciones génicas, del orden de 30 kb, como las de holomicina (Huang y col., 2011; Robles-Reglero y col., 2013), ácido clavulánico (Álvarez-Álvarez y col., 2013), o cefamicina C (Martínez-Burgo y col., 2013), como para agrupaciones grandes tales como la agrupación de tacrolimus, de 83 kb, que ha sido introducida en *S. coelicolor* (Jones y col., 2013). En todos estos ejemplos la producción heteróloga fue inferior al 10 % de la obtenida en la cepa donadora. En pocos casos los niveles de producción fueron similares a los de la cepa parental, como ocurre con la cumermicina A1, la clorobiocina tras mejorar las condiciones de cultivo (Flinspach y col., 2010) o el indolocarbazol (Li y col., 2013). Sin embargo, en general, la obtención de títulos de producción del metabolito similares a los del donador no son lo común (Komatsu y col., 2010, 2013).

4.1.6.2. Validación por HPLC-MS de la producción de cefamicina C por *S. flavogriseus*::[SCos-CF]

La confirmación de que el compuesto bioactivo producido por *S. flavogriseus*::[SCos-CF] era cefamicina C se realizó a partir del caldo de cultivo en medio TBO a las 96 horas. El análisis por HPLC-MS utilizó como estándar cefamicina C purificada por HPLC a partir de un cultivo de *S. clavuligerus* y fue realizado por el Dr. Alfredo F. Braña en la Universidad de Oviedo (apartado 3.9.4.1). La detección se realizó por absorción a 264 nm (PDA) y espectrometría de masas (MS) por monitorización del ion seleccionado m/z 447,2. En el caldo de *S. flavogriseus*::[SCos-CF] se detectó un pequeño pico que no estaba presente en el caldo del cultivo de *S. flavogriseus* ATCC 33331 (no mostrado). Este pico tiene un tiempo de retención de 14 minutos y una m/z de 447,3, valores ambos que coinciden con los de la cefamicina C pura (figura 4.14).

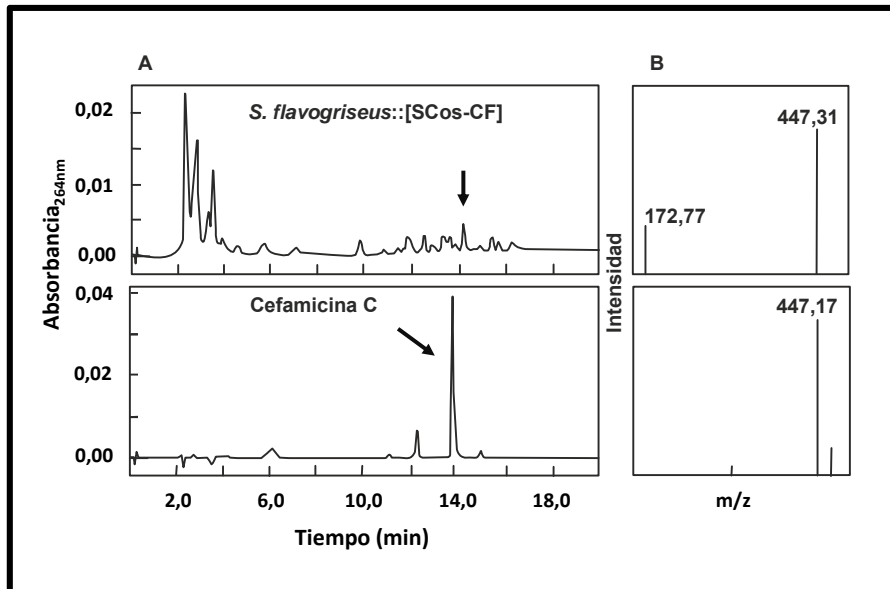


Figura 4.14. Análisis por HPLC-MS de cefamicina C. (A) Cromatograma del caldo de cultivo de *S. flavogriseus*::[SCos-CF] en TBO a las 96 h (panel superior) y cefamicina C pura (panel inferior). (B) Espectro de masas obtenido por monitorización del ion seleccionado m/z 447,17 del pico señalado en el panel superior A (panel superior) y espectro de masas del pico de la cefamicina C pura mostrado en el panel inferior A (panel inferior).

4.1.6.3. Caracterización del nivel de resistencia a antibióticos β -lactámicos

Las penicilinasas y cefalosporinasas se dan en muchas especies de *Streptomyces* (Forsman y col., 1990; Sendouda y col., 1993). Algunas están codificadas por genes localizados en las agrupaciones de cefamicina C de *S. clavuligerus* (Pérez-Llarena y col., 1997b) y *Amycolatopsis lactamdurans* (Kumar y col., 1996). Dada la menor producción de cefamicina C en los exconjugantes de *S. flavogriseus* respecto a *S. clavuligerus*, y la no detección del metabolito en los de *S. coelicolor* M1146 y *S. albus* J1074 (apartado 4.1.6.1), se analizó la resistencia de todas las cepas construidas en el presente trabajo y de sus respectivos controles para crecer en medio sólido TSA suplementado con penicilina G (100 a 400 $\mu\text{g/ml}$), cefoxitina (0,25 a 1,25 mg/ml) o cefalosporina C (2 a 7 mg/ml).

Las cepas de *Streptomyces* estudiadas fueron siempre más sensibles a penicilina G que a cefoxitina (figura 4.15). Todas las cepas parentales crecieron bien en 100 $\mu\text{g/ml}$ de penicilina G. *S. clavuligerus* y *S. flavogriseus* fueron incapaces de desarrollarse a 200 $\mu\text{g/ml}$, pero las cepas derivadas de *S. flavogriseus* mostraron un buen crecimiento en 200 $\mu\text{g/ml}$ de penicilina G (figura 4.15, B, números 3 al 5). Un resultado similar se observó con *S. coelicolor* M1146 que fue sensible a 300 $\mu\text{g/ml}$ de penicilina G mientras *S. coelicolor*::[SCos-CF] y *S. coelicolor*::[SCos-CF]::[P_{fur-ccaR}] fueron capaces de crecer en presencia de 300 $\mu\text{g/ml}$ (figura 4.15, B, 6 a 8). Por el contrario,

S. albus J1074 y sus derivados resistieron a 300 µg/ml de penicilina G (figura 4.15, B, 9 a 11) y hasta 400 µg/ml (no mostrado).

S. clavuligerus creció hasta 1,25 mg/ml de cefoxitina, una cefamicina semisintética, pero *S. coelicolor* M1146, *S. albus* J1074 y las cepas derivadas de estas fueron incapaces de crecer en 0,25 mg/ml de cefoxitina. Sin embargo, *S. flavogriseus* creció hasta en 0,25 mg/ml y sus derivados crecieron hasta en 1,25 mg/ml de cefoxitina (figura 4.15, C).

Todas las cepas fueron más resistentes a cefalosporina C que a cefoxitina (no mostrado). *S. clavuligerus* es completamente insensible a la cefalosporina C, creciendo hasta en 7 mg/ml, mientras que *S. albus* J1074, las cepas derivadas de *S. albus* J1074 y *S. flavogriseus* ATCC 33331 no se desarrollaron en 2 mg/ml de cefalosporina C, y *S. coelicolor* M1146 creció en 2 mg/ml pero no en 3 mg/ml de cefalosporina C. Tanto los exconjugantes de *S. coelicolor* como los de *S. flavogriseus* que llevaban integrado [SCos-CF] o [SCos-CF_ΔccaR], crecieron en presencia de 2 mg/ml de cefalosporina C.

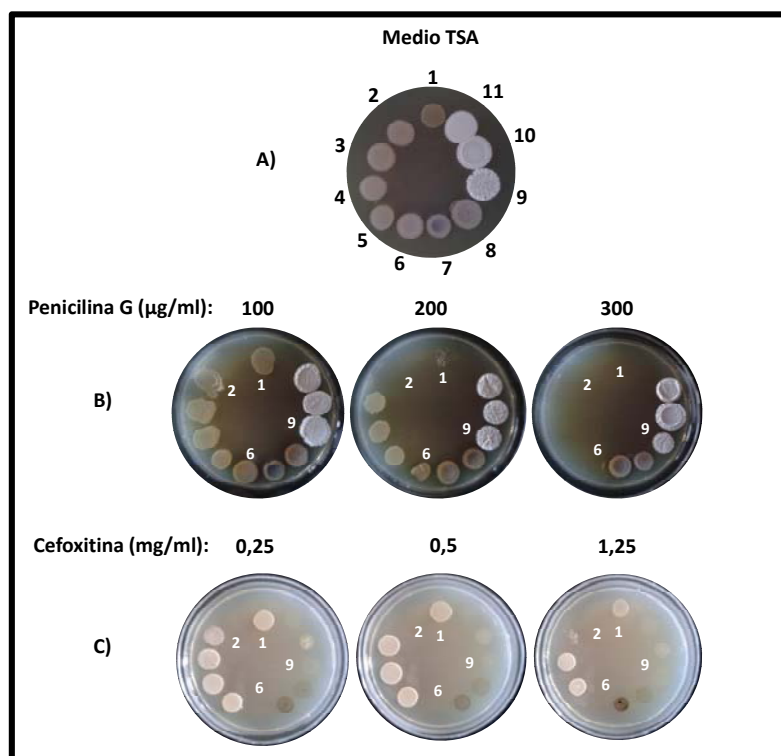


Figura 4.15. Resistencia a penicilina G y cefoxitina de las cepas de expresión heteróloga y sus parentales. (A) Crecimiento en medio TSA sin antibiótico. (B) Efecto de la penicilina G suplementada a: 100, 200 y 300 µg/ml. (C) Efecto de la cefoxitina suplementada a: 0,25, 0,5 y 1,25 mg/ml. Las cepas utilizadas son: (1) *S. clavuligerus* ATCC 27064, (2) *S. flavogriseus* ATCC 33331, (3) *S. flavogriseus*::[SCos-CF], (4) *S. flavogriseus*::[SCos-CF]::[P_{fur}-ccaR], (5) *S. flavogriseus*::[SCos-CFΔccaR], (6) *S. coelicolor* M1146, (7) *S. coelicolor*::[SCos-CF], (8) *S. coelicolor*::[SCos-CF]::[P_{fur}-ccaR], (9) *S. albus* J1074, (10) *S. albus*::[SCos-CF], (11) *S. albus*::[SCos-CF]::[P_{fur}-ccaR]. Para mayor claridad de la figura en los cultivos suplementados sólo se señalan los números de las cuatro cepas parentales.

Esto confirma que algunos genes en la agrupación de cefamicina C confieren resistencia a penicilina y cefalosporina. Estos genes parecen ser expresados independientemente de la presencia de un gen *ccaR_C* activo como ocurre en la cepa de *S. flavogriseus* que porta el cósmido SCos-CF_Δ*ccaR* (figura 4.15).

4.1.6.4. Análisis de la expresión heteróloga de los genes integrados

Para comprender el origen de la baja producción de cefamicina C en las cepas de expresión heteróloga se llevaron a cabo análisis mediante RT-qPCR. La cuantificación de los transcritos se realizó sobre el ARN de los exconjugantes derivados de *S. flavogriseus* ATCC 33331 y *S. coelicolor* M1146 y del donador *S. clavuligerus*, cultivados en medio TBO líquido a las 48 horas. Se analizó la expresión del regulador *ccaR*, de los genes biosintéticos de la cefamicina C y de los supuestos genes de resistencia *cmcT*, *pcbR* y *pbp74* (tabla 7.1, Anexo). La expresión en los exconjugantes se comparó con la de los genes endógenos de *S. clavuligerus*, a la que se asignó el valor relativo 1 (figura 4.16).

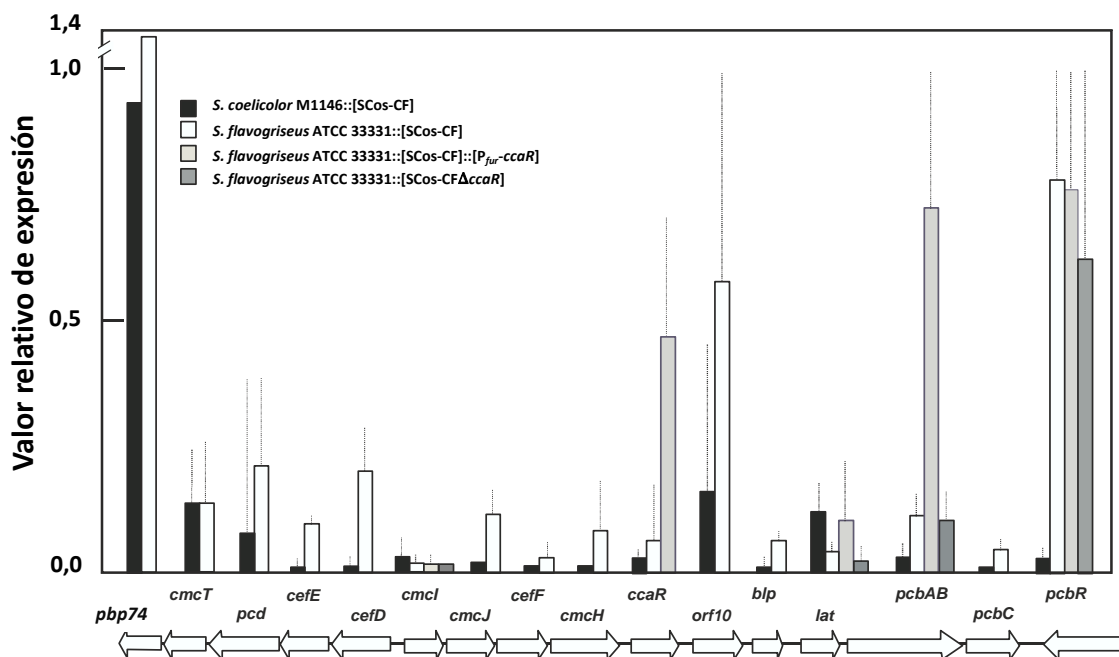


Figura 4.16. Análisis de la expresión de los genes de la agrupación de la cefamicina C a las 48 de cultivo en medio líquido TBO mediante RT-qPCR. Los valores relativos de expresión están referidos al nivel de expresión de cada gen en *S. clavuligerus*, tomado como valor 1, y se indican mediante barras para *S. coelicolor* M1146::[SCos-CF] (negra), *S. flavogriseus*::[SCos-CF] (blanca), *S. flavogriseus*::[SCos-CF]::[P_{fur}-*ccaR*] (gris claro) y *S. flavogriseus*::[SCos-CF]Δ*ccaR* (gris oscuro). No todos los genes fueron analizados en los cuatro exconjugantes. Las líneas punteadas representan la desviación estándar. En la parte inferior se muestra la organización de la agrupación génica de la cefamicina C integrada en los exconjugantes.

La expresión del gen *ccaR* en *S. coelicolor*::[SCos-CF] y *S. flavogriseus*::[SCos-CF] fue del 4 % y del 7 %, respectivamente, respecto a *S. clavuligerus*. Esto confirma la importancia de reguladores de rango superior específicos de especie en la expresión de *ccaR*. Los genes biosintéticos (*pcd*, *cefE*, *cefD*, *cefF*, *cmcl*, *cmcl*, *cmcH*, *lat*, *pcbAB*, y *pcbC*) se expresaron en *S. coelicolor*::[SCos-CF] con un nivel medio de 3,4 % en relación a su expresión en *S. clavuligerus*, siendo *lat* el gen mejor expresado (12 %). En general, la expresión de los genes biosintéticos de la cefamicina C fue mayor en *S. flavogriseus*::[SCos-CF] que en *S. coelicolor*::[SCos-CF], con un nivel medio de 9,6 % en relación a *S. clavuligerus*, siendo *pcd* y *cefD* los genes con mayor expresión (21 %) (figura 4.16). Este mayor nivel de transcripción, que puede deberse a la proximidad filogenética entre *S. flavogriseus* y *S. clavuligerus*, es consistente con la detección de cefamicina C en *S. flavogriseus* y su ausencia en *S. coelicolor* M1146 (apartado 4.1.6.1).

El gen *ccaR* se expresó bien desde el promotor P_{fur} (47 %) en el exconjugante *S. flavogriseus*::[SCos-CF]:: $P_{fur-ccaR}$. La expresión de los genes biosintéticos tempranos *pcbAB* y *lat* aumentó en esta cepa hasta un 72 % y 11 %, respectivamente. Aunque carecemos de los datos de transcripción de la mayor parte del resto de los genes biosintéticos en *S. flavogriseus*::[SCos-CF]:: $P_{fur-ccaR}$, podemos suponer que al menos serán similares a los de *S. flavogriseus*::[SCos-CF], y que este incremento explica la mayor producción de cefamicina C en esta cepa (figura 4.13, B). Sin embargo, no hay una correlación proporcional entre los niveles de la expresión de *ccaR* (47 %; figura 4.16) y de la producción de cefamicina C (32 %, figura 4.13, A), probablemente porque la expresión de algunos genes de la agrupación, como ocurre con *cmcl*, es limitante (figura 4.16). La expresión génica no es estrictamente dependiente de la dosis de *ccaR* que contiene la cepa, por ejemplo, una copia adicional de *ccaR_C* expresada desde el promotor P_{fur} en *S. flavogriseus* mejoró la producción de cefamicina C alcanzando un nivel casi 100 veces superior respecto de *S. flavogriseus*::[SCos-CF] (figura 4.13), pero que representa el 32 % respecto al de *S. clavuligerus*, probablemente debido a la pobre expresión de muchos genes; sin embargo, copias adicionales de *ccaR* resultan en la duplicación de la producción tanto de cefamicina C como de ácido clavulánico en *S. clavuligerus* (Pérez-Llarena y col., 1997a).

Se han descrito varios genes como responsables de la alta resistencia a cefalosporina C observada en *S. clavuligerus*. Algunos de ellos, como *cmcT*, *pbp74* o *pcbR*, han sido relacionados con la biosíntesis de cefamicina u otros antibióticos β -lactámicos (Paradkar y col., 1996; Pérez-Llarena y col., 1998; Ishida y col., 2006), mientras el papel de *orf10* y *blp* parece estar más relacionado con la producción de ácido clavulánico (Thai y col., 2001). La expresión de *cmcT* fue

similar en las cepas de *S. flavogriseus* y *S. coelicolor* portadoras de SCos-CF. El gen *pcbR* presentó un nivel de expresión relativa de 78 % en *S. flavogriseus* frente al 0,65 % en *S. coelicolor*, lo que indicaría que *pcbR* tiene un papel importante en la resistencia a antibióticos β -lactámicos. Esta expresión génica fue similar en *S. flavogriseus*::[SCos-CF] y *S. flavogriseus*::[SCos-CF]::[P_{fur}-*ccaR*] (figura 4.16). El gen *pbp74* fue expresado en ambas cepas de expresión heteróloga, *S. coelicolor* M1146::[SCos-CF] y *S. flavogriseus*::[SCos-CF], a niveles similares o superiores a los de *S. clavuligerus*. La resistencia a penicilina G de *S. coelicolor* M1146::[SCos-CF] parece deberse a la expresión de *pbp74* (93 %), dado que *pcbR*, que codifica la otra proteína de unión a penicilinas de la agrupación, prácticamente no se transcribió (figura 4.16). La fuerte expresión de *pcbR* y *pbp74*, que codifican proteínas de unión a penicilina, podría explicar la alta resistencia a penicilina G y a cefoxitina observada en las cepas derivadas de *S. flavogriseus* (figura 4.15, B y C). Además, *S. flavogriseus*::[SCos-CF] mostró un nivel de transcripción superior de los genes de resistencia *orf10* y *blp* respecto a *S. coelicolor* M1146::[SCos-CF]. Los genes de resistencia *pbp74*, *cmcT*, *orf10* y *pcbR*, en *S. flavogriseus*, y *pbp74*, *cmcT*, *orf10* en *S. coelicolor* M1146, presentaron unos niveles de transcripción superiores respecto a los genes biosintéticos. Esto sugiere que la expresión de los genes de resistencia, excepto *blp*, es independiente de *ccaR*. Por otro lado, las diferencias en la resistencia a penicilina o cefalosporina no se debieron al gen *bla* de *S. clavuligerus*, que codifica una β -lactamasa de tipo I (Pérez-Llarena y col., 1997b), ya que este gen no está completo en el cósmido SCos-CF.

La ausencia de expresión de *ccaR* en los exconjugantes *S. flavogriseus*::[SCos-CF Δ *ccaR*], que carece de CcaR_C, no afectó notablemente a la expresión de los genes analizados (tales como *cmcI* o *pcbAB*), pero la de *lat* y *pcbR* disminuyó ligeramente (figura 4.16).

En resumen, el análisis cuantitativo por RT-qPCR de la expresión heteróloga de la agrupación de cefamicina C de *S. clavuligerus* mostró una gran variabilidad en la transcripción entre genes. Los genes relacionados con la resistencia a antibióticos se expresaron bien, lo que resultó en el crecimiento de los exconjugantes de *S. flavogriseus* y *S. coelicolor* a altas concentraciones de penicilina y cefoxitina. Sin embargo, la mayoría de los genes biosintéticos se expresaron pobremente en las cepas de expresión heteróloga (figura 4.16). Por lo tanto, si bien el uso de un huésped optimizado para la aceptación de ADN exógeno y/o por la carencia de rutas competidoras que resulta en el drenaje de moléculas precursoras podría ser útil, la proximidad filogenética de la cepa de *Streptomyces* debería también ser considerada cuando se lleve a cabo la expresión heteróloga de una agrupación génica.

Capítulo 4.2. El regulador específico de ruta ClaR de *S. clavuligerus*: efecto global en la expresión de genes del metabolismo secundario y la diferenciación morfológica

4.2.1. Introducción

El gen *claR*, localizado en la agrupación génica del ácido clavulánico en *Streptomyces clavuligerus*, codifica un regulador de tipo LysR (Paradkar y col., 1998; Pérez-Redondo y col., 1998). Los reguladores transcripcionales de tipo LysR (LTTR, del inglés *LysR-type transcriptional regulator*) presentan el patrón de este regulador modelo que controla la expresión de *lysA* en enterobacterias (Maddocks y Oyston, 2008). Los reguladores LTTR actúan sobre genes implicados en rutas metabólicas, pero también se ha descrito su papel en la percepción del cuórum, virulencia, motilidad, fijación de nitrógeno, respuesta a estrés oxidativo y en otros sistemas (Schlaman y col., 1992; Lehnen y col., 2002; Maddocks y Oyston, 2008). Estos reguladores transcripcionales globales actúan principalmente como activadores, sin embargo, también pueden comportarse como represores, y controlar tanto genes individuales como operones. Las proteínas LysR son tetrámeros, tienen un motivo HTH próximo al extremo N-terminal y unen secuencias palindrómicas identificadas como T-N₁₁-A (Parsek y col., 1994). La afinidad de unión está determinada generalmente por una molécula que actúa como ligando coinductor (Tropel y van der Meer, 2004).

La presencia de un regulador de tipo LysR en las agrupaciones génicas de biosíntesis de antibióticos es relativamente frecuente (Martínez-Costa y col., 1999; Rodríguez y col., 2008; Martín y Liras, 2010). En la producción de undecilprodigiosina y actinorrodina, StgR, además de autorregularse, controla negativamente la expresión de *redD* y *actII-orf4*, genes que codifican los activadores específicos de ruta (Mao y col., 2013).

El gen *clara* de *S. clavuligerus* se expresa como un transcrito monocistrónico que codifica una proteína de 431 aminoácidos (Mr 47080 Da). ClaR contiene dos motivos HTH: en el extremo N-terminal el motivo HTH (aminoácidos 3 al 51) poco conservado, y, próximo a la región C-terminal de la proteína, un motivo adicional HTH que se ajusta a la secuencia conservada en la mayoría de los reguladores de tipo LysR: ³⁵²SQ(X)₃T(X)₅LE³⁶⁴ (Paradkar y col., 1998; Pérez-Redondo y col., 1998).

La delección del gen *clara* resulta en la pérdida de la producción de ácido clavulánico y la acumulación del intermediario ácido clavamínico (Paradkar y col., 1998). El análisis transcripcional mediante la técnica *Northern*, empleando ARN aislado de la cepa silvestre y del mutante *clara* obtenido en el laboratorio de la Dra. S. Jensen mostró que la expresión de los genes para las etapas tempranas de la ruta, desde *ceaS2* a *cas2*, es similar en ambas cepas; estos resultados, junto con la acumulación del intermediario ácido clavamínico en el mutante *clara*,

apoyan la hipótesis de un control ejercido por ClaR sobre la expresión de los genes implicados en las etapas tardías de la ruta del ácido clavulánico (Paradkar y col., 1998). El mutante *claR::aph* obtenido en nuestro laboratorio no produce ácido clavulánico e incrementa la síntesis de cefamicina C (Pérez-Redondo, 2000). Por otra parte, la amplificación del gen *claR* en un plásmido multicopia aumenta tres veces la producción de ácido clavulánico, mientras que la producción de cefamicina C se reduce notablemente (Pérez-Redondo y col., 1998).

La expresión de *claR* está sujeta al control por CcaR, el regulador de la superagrupación de cefamicina C-ácido clavulánico. Tanto la hibridación por *Northern* (Pérez-Redondo y col., 1998), como el análisis con la nucleasa S1 (Paradkar y col., 1998) no detectaron transcripción de *claR* en los mutantes interrumpidos en *ccaR*. Los análisis con micromatrices mostraron que el mutante interrumpido en *ccaR* expresaba *claR* en un nivel entre 16 y 24 veces inferior al de la cepa silvestre (Álvarez-Álvarez y col., 2014b). Por otro lado, la proteína recombinante CcaR purificada a partir de *E. coli* formó, en EMSA, dos complejos electroforéticamente retrasados al interactuar con sondas que contienen el promotor de *claR*, mostrando CcaR mayor especificidad por el complejo de menor movilidad, como se detectó por estudios de competición (Santamarta y col., 2011). Sin embargo, el avance en el conocimiento de la función del gen *claR* se ha visto obstaculizado por la dificultad para purificar proteína ClaR recombinante en su forma activa.

Durante el desarrollo de la presente tesis doctoral, el análisis global de la expresión génica de una cepa obtenida años atrás en nuestro grupo, el mutante *S. clavuligerus oppA2::aph* (Lorenzana y col., 2004), mostró un número de copias de los plásmidos pSCL2 y pSCL4 entre 25000 y 10000 veces inferior, respectivamente, al de la cepa silvestre (Álvarez-Álvarez y col., 2014a). La obtención de un nuevo mutante *oppA2*, con una dotación normal de plásmidos, demostró que, de los caracteres fenotípicos observados en *S. clavuligerus oppA2::aph*, relativos a la biosíntesis de metabolitos secundarios y a la ausencia de esporulación (Lorenzana y col., 2004), esta última no estaba asociada a la mutación en *oppA2*, sino que era debida a la pérdida del plásmido pSCL4 (Álvarez-Álvarez y col., 2014a). Con el propósito de distinguir si la pérdida de plásmidos era un hecho aislado, se analizó el número de copias de los plásmidos pSCL2 y pSCL4 mediante qPCR en nuestra colección de mutantes (Álvarez-Álvarez R., comunicación personal). En las cepas analizadas, *S. clavuligerus ccaR::aph*, *S. clavuligerus cyp::tsr*, *S. clavuligerus orf13::apr*, *S. clavuligerus orf14::aph*, *S. clavuligerus oppA1::acc*, *S. clavuligerus relA::neo* y *S. clavuligerus ΔadpA* (Pérez-Llarena y col., 1997a; Li y col., 2000; Mellado y col.,

2002; Lorenzana y col., 2004; Gomez-Escribano y col., 2008; López-García y col., 2010) se estimó que el número de copias de los plásmidos lineales era similar al de la cepa silvestre. Sin embargo, el mutante de interrupción del gen *claR*, *S. clavuligerus claR::aph*, obtenido por transformación de protoplastos (Pérez-Redondo, 2000), presentó una amplificación muy baja en el análisis por qPCR de los genes localizados tanto en el pSCL2 como en el pSCL4 respecto a la cepa silvestre (ver más adelante en la figura 4.18), lo que sugiere que este mutante tiene un bajo número de copias de ambos plásmidos. Un estudio global con micromatrices, similar al llevado a cabo por Álvarez-Álvarez y col. (2014b), confirmó que los genes localizados en los plásmidos pSCL2 y pSCL4 presentaban una pobre señal de transcripción en *S. clavuligerus claR::aph* (Álvarez-Álvarez R., comunicación personal). Por lo tanto, la cepa *S. clavuligerus claR::aph* obtenida por Pérez-Redondo R. (2000) ha sido renombrada como *S. clavuligerus claR::aph pSCL^{low}*.

Este descubrimiento planteó la duda sobre si los efectos producidos por la carencia de ClaR en el mutante *claR::aph pSCL^{low}* se deben realmente a la falta de este regulador o a la ausencia de los plásmidos pSCL2 y pSCL4. Para diferenciar entre ambos casos se construyó un nuevo mutante deleciónado en *claR*, *S. clavuligerus ΔclaR::aac*, con un número normal de copias de pSCL2 y pSCL4. Por ello, el presente capítulo se centra en analizar la producción de ácido clavulánico, cefamicina C y holomicina, la diferenciación morfológica, así como el transcriptoma de la cepa *S. clavuligerus ΔclaR::aac* en comparación con *S. clavuligerus* ATCC 27064.

4.2.2. Obtención del mutante *S. clavuligerus ΔclaR::aac*

S. clavuligerus ΔclaR::aac se obtuvo a partir de la cepa silvestre *S. clavuligerus* empleando el cósmido D11_7, un SuperCos 1 que contiene la agrupación completa del ácido clavulánico (Álvarez-Álvarez y col., 2013), modificado mediante la tecnología ReDirect[®] con los cebadores *claR-F* y *claR-R* (apartado 3.8; tabla 7.1, Anexo). El mutante *S. clavuligerus ΔclaR::aac* se obtuvo por conjugación y fue seleccionado por resistencia a apramicina. La deleción de *claR* en esta cepa se confirmó por: 1) PCR con los cebadores *cyp-F* y *Am-R* que, respectivamente, hibridan en el gen *cyp*, próximo a *claR*, y en el gen de resistencia a apramicina del casete de deleción (tabla 7.1, Anexo) y amplifican un fragmento de 3,5 kb (figura 4.17), y 2) la secuenciación de un segmento de este amplicón.

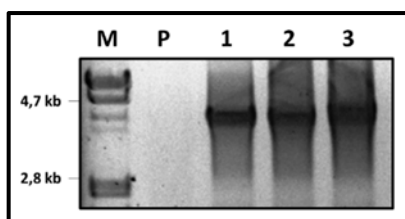


Figura 4.17. Comprobación por PCR de la deleción del gen *claR*. Genoma del fago lambda digerido con *PstI* (M), *S. clavuligerus* (P) y tres clones exconjugantes de *S. clavuligerus ΔclaR::aac* (1-3).

4.2.3. Estimación del número de copias de los plásmidos pSCL1, pSCL2 y pSCL4 en *S. clavuligerus* Δ *claraR::aac*

La detección y estimación del número de copias de los plásmidos pSCL1, pSCL2 y pSCL4 en *S. clavuligerus* Δ *claraR::aac* se llevó a cabo por qPCR (apartado 3.10.3) empleando 20 ng de ADN genómico y cebadores que amplificaban una región de los genes SclaA2_010100027570 y SclaA2_010100027590 localizados en pSCL1, *para*_{pSCL2} situado en pSCL2, y *brp*, *parB* y *traA* codificados en pSCL4 (figura 4.18; tabla 7.1, Anexo). Los genes cromosomales *adpA* y *rpoD* fueron empleados como referencia (tabla 7.1, Anexo). En la comparación también se incluyó como control de bajo número de copias de plásmidos *S. clavuligerus* *oppA2::aph* pSCL^{low}.

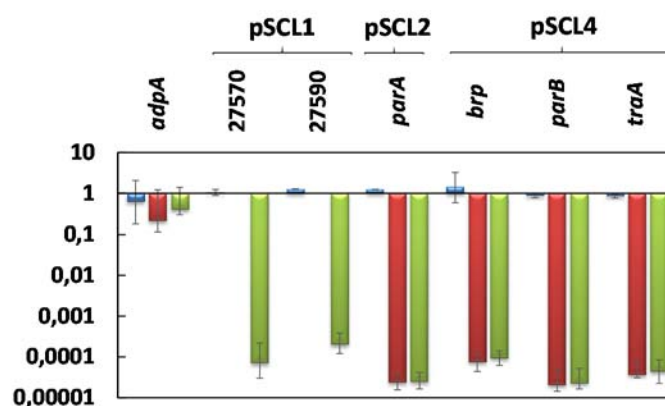


Figura 4.18. Análisis del número de copias de los plásmidos pSCL1, pSCL2 y pSCL4. Cantidad relativa de ADN (escala logarítmica en base 10) medida por qPCR de los genes cromosomal *adpA* y plasmídicos SclaA2_010100027570 y SclaA2_010100027590 (pSCL1), *para* (pSCL2), *brp*, *parB* y *traA* (pSCL4), en *S. clavuligerus* Δ *claraR::aac* (barras azules), *S. clavuligerus* *claraR::aph* pSCL^{low} (barras rojas; no hay datos de pSCL1), *S. clavuligerus* *oppA2::aph* pSCL^{low} (barras verdes). La cantidad relativa de ADN en las tres cepas mutantes fue determinada por comparación con la cepa silvestre *S. clavuligerus*, tomada como valor 1. Para simplificar la figura, la denominación de los genes de pSCL1 se abrevió usando sus cinco últimos dígitos. La desviación estándar se representa mediante líneas verticales.

Este análisis permitió confirmar en el nuevo mutante *S. clavuligerus* Δ *claraR::aac* la presencia de un número de copias de pSCL1, pSCL2 y pSCL4 similar al de la cepa silvestre y la reducción de esta dotación en *S. clavuligerus* *claraR::aph* pSCL^{low} (figura 4.18). El bajo número de copias de los plásmidos pSCL2 y pSCL4 en el mutante *S. clavuligerus* *claraR::aph* pSCL^{low} indica que la pérdida de plásmidos grandes en *Streptomyces* es bastante frecuente (Álvarez-Álvarez y col., 2014a) y está probablemente asociado a su inestabilidad (Medema y col., 2010), a mutaciones en genes implicados en la replicación de estos elementos extracromosomales o bien a la segregación plasmídica durante la obtención del mutante mediante regeneración de protoplastos. El control de los niveles de estos plásmidos grandes es esencial para evitar errores en la interpretación del

fenotipo de los mutantes, especialmente aquellos obtenidos por mutagénesis clásica y métodos que utilizan protoplastos.

4.2.4. Construcción de un plásmido para la complementación de *S. clavuligerus* Δ *claR::aac*

Con el objetivo de confirmar el efecto de la ausencia de ClaR sobre el fenotipo de *S. clavuligerus*, en relación a la producción de antibióticos y diferenciación, se complementó la cepa *S. clavuligerus* Δ *claR::aac*. Para ello, el gen *claR* con su propio promotor fue amplificado por PCR en un fragmento de 1,5 kb empleando los cebadores *claR_cF* y *claR_cR* (tabla 7.1, Anexo). Asimismo, el amplicón fue secuenciado con *claR_cF*, *claR_cR* y el cebador interno *claR_R* (tabla 7.1, Anexo) e insertado en el sitio *EcoRV* del plásmido integrativo pMS83 (Gregory y col., 2003), para obtener la construcción pMS83-*claR*. Mediante conjugación del plásmido y selección por resistencia a apramicina e higromicina, se obtuvo el mutante complementado *S. clavuligerus* Δ *claR::aac* [pMS83-*claR*]. La presencia de *claR* en esta cepa se confirmó por PCR, utilizando los cebadores *claR_cF* y *claR_cR* (tabla 7.1, Anexo), y por secuenciación del fragmento amplificado. *S. clavuligerus* Δ *claR::aac* [pMS83] fue empleado como control de la cepa complementada.

4.2.5. Análisis de la producción de antibióticos en *S. clavuligerus* Δ *claR::aac* y en la cepa complementada

S. clavuligerus *claR::aph* pSCL^{low} no produce ácido clavulánico, sin embargo, produce una mayor cantidad de cefamicina C y de holomicina que la cepa silvestre (Pérez-Redondo, 2000; de la Fuente y col., 2002). Para comprobar el fenotipo del nuevo mutante *claR*, *S. clavuligerus* Δ *claR::aac*; su parental, *S. clavuligerus*; la cepa complementada, *S. clavuligerus* Δ *claR::aac* [pMS83-*claR*]; y su control, *S. clavuligerus* Δ *claR::aac* [pMS83], fueron cultivadas en medio SA con dos matraces por cada cepa (réplicas biológicas), se tomaron muestras cada 12 horas, aproximadamente, y los sobrenadantes de los cultivos fueron analizados por bioensayo.

Para *S. clavuligerus* Δ *claR::aac*, círculos negros en la figura 4.19, se observó la ausencia de ácido clavulánico en los cinco tiempos de estudio, cantidades significativas de holomicina, y una producción de cefamicina C que fue aproximadamente 5 veces superior, en relación con la cepa silvestre a las 60 horas de fermentación (figura 4.19, paneles A, B y C, respectivamente). La complementación de *claR* en *S. clavuligerus* Δ *claR::aac* [pMS83-*claR*], cuadrados blancos, restauró parcialmente la producción de ácido clavulánico, entre el 7 % y el 46 % en relación a la de su cepa parental, y anuló la de holomicina (figura 4.19, paneles A y B, respectivamente). Los

niveles de cefamicina C se elevaron por encima de los de la cepa silvestre, a las 60 y 71,5 horas, tiempos en los que de la delección del *cl*aR aumentó notablemente la producción de este metabolito.

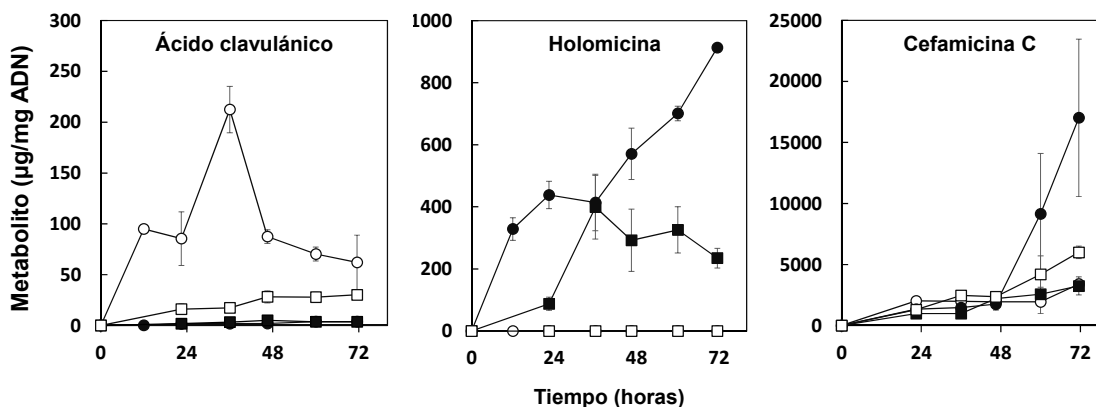


Figura 4.19. Producción específica de ácido clavulánico, holomicina y cefamicina C en medio SA por *S. clavuligerus* (círculos blancos), *S. clavuligerus* Δ *clR::aac* (círculos negros), *S. clavuligerus* Δ *clR::aac* [pMS83-*cl*aR] (cuadrados blancos) y *S. clavuligerus* Δ *clR::aac* [pMS83] (cuadrados negros). La desviación estándar de cada punto se representa mediante líneas verticales.

Tras observar el mismo patrón de producción de antibióticos en ambos mutantes *cl*aR, *S. clavuligerus* Δ *clR::aac* y *S. clavuligerus* *cl*aR::*aph* pSCL^{low}, y la restauración del fenotipo silvestre en la cepa complementada, *S. clavuligerus* Δ *clR::aac* [pMS83-*cl*aR], se concluyó que los efectos en la producción de los tres metabolitos, ácido clavulánico, cefamicina C y holomicina, eran debidos a la pérdida del regulador ClR.

4.2.6. Análisis de la expresión global en *S. clavuligerus* Δ *clR::aac* mediante micromatrices en comparación con la cepa silvestre

Como se indicó en el apartado 3.10.4.1, las micromatrices diseñadas para la realización de este trabajo incluyen sondas para 5688 regiones de ADN codificantes (CDS) cromosomales, 1570 CDS de pSCL4, 7 ARNr, 51 ARNt, 157 ARNnc del cromosoma y 29 ARNnc del plásmido pSCL4. El ARN empleado para la hibridación de las micromatrices se extrajo del micelio de los cultivos de *S. clavuligerus* Δ *clR::aac* y de la cepa silvestre cultivados en medio definido SA, a las 22,5; 46,5 y 60 horas. El análisis para cada condición, dos cepas y tres tiempos de estudio, se llevó a cabo con dos réplicas biológicas. El marcaje del ARN con Cy3-dCTP y del ADN genómico, como muestra de referencia, con Cy5-dCTP se realizó como se indica en los apartados 3.10.4.3 y 3.10.4.4.

Tras la hibridación, el lavado y la lectura de las micromatrices se procedió a la normalización y análisis de los datos (apartado 3.10.4). Los resultados se expresaron con los valores M_g y M_c . El valor M_g es proporcional a la abundancia del transcrito para cada gen particular (Mehra y col., 2006). El valor M_c es el logaritmo binario de la transcripción diferencial entre la cepa de estudio y la cepa control. Un valor de M_c igual a +1 indica que un determinado gen se está transcribiendo dos veces más en el mutante, o cepa de estudio, que el mismo gen en el control. Un valor M_c negativo equivale a una disminución del nivel de transcrito del gen en la cepa de estudio respecto al control. La tasa de corrección de falsos positivos de Benjamini y Hochberg (BH) fue aplicada para el valor p asociado a cada valor M_c .

Los valores de transcripción M_g de las seis condiciones experimentales, dos cepas y tres tiempos, se compararon utilizando los tres contrastes correspondientes a los tres tiempos de estudio (22,5; 46,5 y 60 horas) para la cepa mutante, *S. clavuligerus* Δ *cl**aR::aac*, frente a la control, *S. clavuligerus*. Para cada gen, se calcularon los valores p BH-correctados y los valores M_c (tres grupos de dos valores, uno para cada contraste). Para cada contraste, un resultado fue considerado como estadísticamente significativo si el valor p BH-correctado era $\leq 0,05$. Los datos de las micromatrices obtenidos fueron depositados en la base de datos *National Center for Biotechnology Information-Gene Expression Omnibus* bajo el número de acceso GSE66683.

Con el objetivo de restringir los datos analizados a aquellos transcritos que se vieron significativamente afectados por la pérdida del regulador *Cl**aR*, los resultados se filtraron aplicando el criterio $M_c \geq 1,0$ (genes sobreexpresados) o $M_c \leq -1,0$ (genes subexpresados) y un valor p BH-correctado $\leq 0,05$ para los tres tiempos del análisis. De este modo, 64 genes se activaron y 127 genes se reprimieron en el mutante *S. clavuligerus* Δ *cl**aR::aac* respecto de la cepa silvestre en los tres tiempos analizados (figura 4.20).

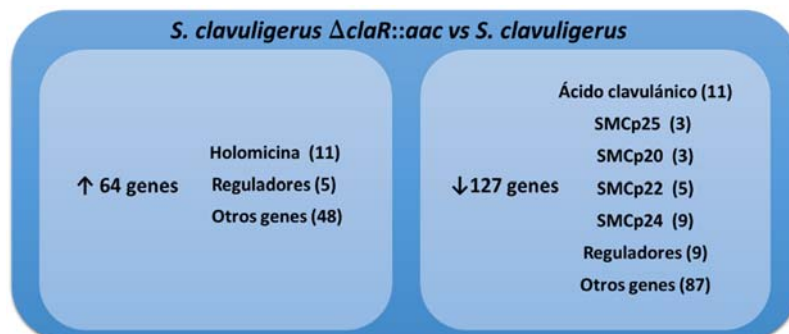


Figura 4.20. Esquema de los genes diferencial y significativamente expresados en la comparación de *S. clavuligerus* Δ *cl**aR::aac* con *S. clavuligerus*. Número de genes sobreexpresados (panel izquierdo, flecha hacia arriba) y subexpresados (panel derecho, flecha hacia abajo). Se indica el número de genes afectados pertenecientes a las agrupaciones génicas de metabolismo secundario, al grupo de reguladores o con funciones diversas en la célula.

De los 64 genes sobreexpresados, 57 son cromosomales y 7 se localizan en el megaplásmido pSCL4, mientras que de los 127 genes subexpresados, 91 se localizan en el megaplásmido y 36 en el cromosoma.

En la figura 4.20 se indica el número de genes significativamente afectados en cada agrupación génica de metabolismo secundario; sin embargo, en los siguientes apartados se muestra el efecto de la ausencia de *Cl*aR en todo el conjunto de la agrupación. El nivel de significación, *p* BH-correctado, así como los valores M_c y el cambio de expresión en número de veces para cada gen de las agrupaciones comentadas en los siguientes apartados se indican en la tabla 7.2 del anexo. El cambio de expresión de los genes descritos a continuación en el presente capítulo es indicada siempre mostrando el valor en el mutante *S. clavuligerus* Δ *cl*aR::*aac* respecto a la cepa parental o silvestre a las 46,5 horas, a no ser que se indique otro de los tiempos analizados.

4.2.6.1. Transcripción diferencial de las agrupaciones génicas de ácido clavulánico, clavamas y SMCp25

Todos los genes de la agrupación de ácido clavulánico se vieron subexpresados, excepto *pbpA* y *pbp2*, implicados en resistencia a antibióticos β -lactámicos, que fueron ligeramente sobreexpresados (figura 4.21). Los genes para las etapas tempranas de la ruta (*ceaS2*, *bls2*, *pah2*, *cas2*) presentaron un nivel intermedio de subexpresión (entre 0,4 y 0,6 veces), mientras que todos los genes para las etapas tardías de biosíntesis de ácido clavulánico (*gcas*, *orf16*, *orf14*, *orf13*, *orf12*, *cyp-fd*, *car*) tuvieron un bajo nivel de expresión, entre 0,01 y 0,08 veces (*orf16* y *car*, respectivamente). Los valores de fluorescencia para la sonda *cl*aR, gen que no está presente en la cepa mutante, indicaron un nivel de señal de fondo de 0,01 veces en relación a los valores derivados de la cepa silvestre. Por lo tanto, podríamos concluir que los genes de las etapas tardías de la biosíntesis del ácido clavulánico, así como *oppA1* y *oppA2*, que codifican las dos oligopéptido permeasas (Lorenzana y col., 2004) y presentaron una transcripción diferencial de 0,03 y 0,01 veces, respectivamente, a efectos prácticos no se expresan en el mutante Δ *cl*aR. Solamente *car*, que codifica la enzima para el último paso de la ruta, fue parcialmente expresado (0,08 veces).

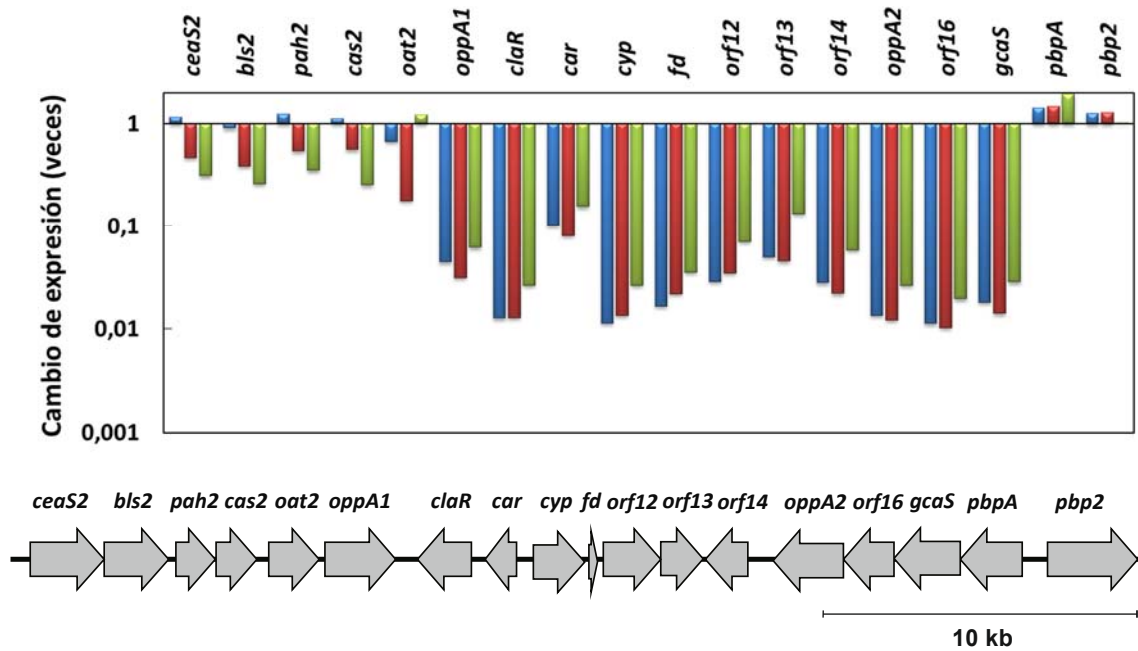


Figura 4.21. Efecto de la ausencia de *ClaR* en la transcripción de los genes de la agrupación del ácido clavulánico en *S. clavuligerus* Δ *claR::aac* comparada con *S. clavuligerus*. Las barras representan la media de los niveles de expresión relativa (escala logarítmica en base 2) a las 22,5 horas (barras azules), 46,5 horas (barras rojas) y 60 horas (barras verdes). El nombre o código SCLAV del gen correspondiente se indica en la parte superior de las barras. Cada valor se compara con el correspondiente en la cepa control, *S. clavuligerus*, tomado como valor 1. En la parte inferior de la figura se indica la organización de la agrupación génica del ácido clavulánico en *S. clavuligerus*.

La construcción de una nueva cepa, *S. clavuligerus* Δ *claR::aac*, que contiene una dotación de los plásmidos pSCL1, pSCL2 y pSCL4 similar a la de la cepa silvestre, nos ha permitido confirmar los resultados obtenidos previamente por *Northern* y análisis transcripcional de alta resolución S1 (Paradkar y col., 1998). Estos autores describen que *ClaR* controla genes de enzimas para etapas tardías de biosíntesis de ácido clavulánico (*oppA1*, *car* y *cyp*). Nuestro análisis transcriptómico muestra que también los genes tardíos *gcaS*, *oppA2*, *orf12*, *orf13*, *orf14*, *orf16* y *fd* de la agrupación del ácido clavulánico se subexpresaron en el mutante Δ *claR* con una media de transcripción de 0,02 veces (figura 4.21). Previamente, se había descrito que los genes para las etapas tempranas de la ruta del ácido clavulánico no se veían afectados por la mutación *claR* (Paradkar y col., 1998); sin embargo, en el presente trabajo, se ha observado que estos genes están también subexpresados aunque en menor medida (entre 0,4 y 0,6 veces) que los de las etapas tardías (figura 4.21).

Las agrupaciones génicas de clavamas, paróloga de clavamas y SMCp25, esta última posiblemente implicada en la biosíntesis de un nuevo antibiótico β -lactámico (Medema y col., 2010), están relacionadas con la agrupación de ácido clavulánico en cuanto a la ruta biosintética

que codifican y la naturaleza química de los compuestos que producen. Por ello, a pesar de que las dos primeras no pasaron el filtro estadístico establecido (apartado 4.2.6), se analizó el efecto de la ausencia de ClaR en estas tres agrupaciones.

La agrupación génica de las clavamas (SCLAV_2921 a SCLAV_2935), localizada lejos de la agrupación del ácido clavulánico, no mostró notables diferencias en la expresión de la mayoría de los genes (figura 4.22). Sin embargo, *cvm5* y *cvm7* se sobreexpresaron (2 y 2,4 veces, respectivamente) y *cvm3* y *cvmP* se sobreexpresaron (2,4 y 2 veces, respectivamente).

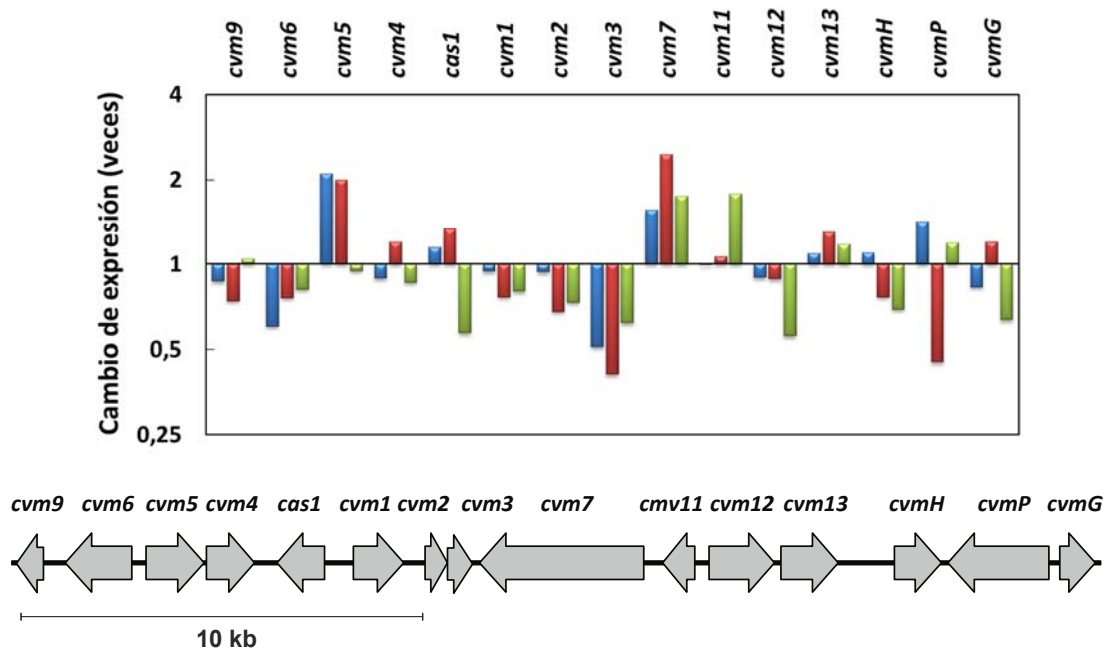


Figura 4.22. Efecto de la ausencia de ClaR en la transcripción de los genes de la agrupación de clavamas en *S. clavuligerus* Δ *claR::aac* comparada con *S. clavuligerus*. Ver el pie de la figura 4.21. En la parte inferior de la figura se indica la organización de la agrupación génica de clavamas en *S. clavuligerus*.

En la agrupación génica paráloga de clavamas (SCLAV_p1069 a SCLAV_p1082), localizada en el megaplásmido pSCL4, los genes *orfB*, *bls1*, *pah1* y *cvm6P*, se sobreexpresaron de 2 a 6 veces (figura 4.23).

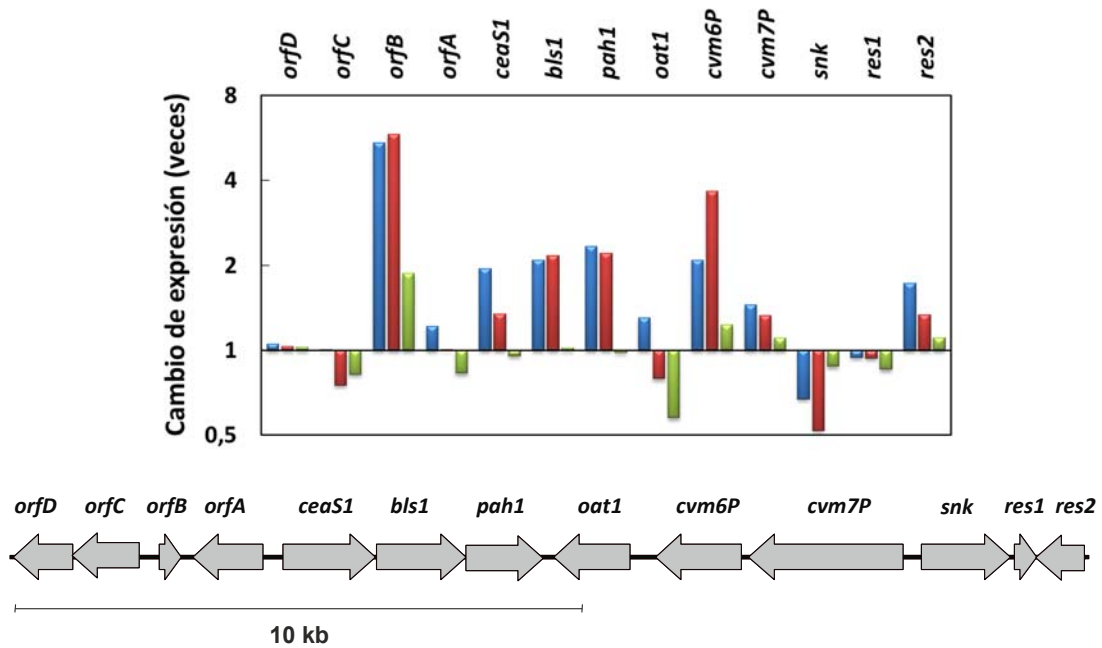


Figura 4.23. Efecto de la ausencia de *ClaR* en la transcripción de los genes de la agrupación paróloga de clavamas en *S. clavuligerus* Δ *claR::aac* comparada con *S. clavuligerus*. Ver el pie de la figura 4.21. En la parte inferior de la figura se indica la organización de la agrupación génica paróloga de clavamas en *S. clavuligerus*.

El nivel de expresión de los genes biosintéticos de las etapas tempranas del ácido clavulánico permite un flujo parcial desde estas hacia el ácido clavamínico. Esto, junto con la sobreexpresión de los parálogos tempranos *ceaS1*, *bls1* y *pah1* (figura 4.23), la pequeña variación de la expresión de *cas1* y la débil derivación de la ruta desde ácido clavamínico hacia clavamas 5S en el mutante Δ *claR* (figura 4.22), explicarían que la acumulación de este intermediario en *S. clavuligerus* Δ *claR::aac* cultivado en el medio SA sea ligeramente superior a la encontrada en la cepa silvestre (figura 4.24), como se detectó por HPLC (apartado 3.9.4.2).

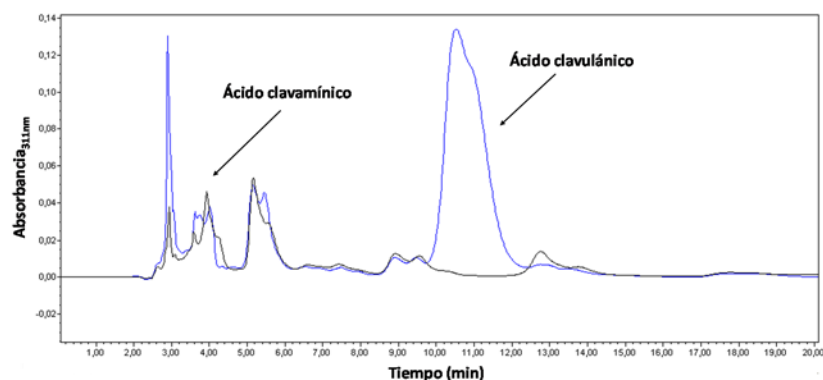
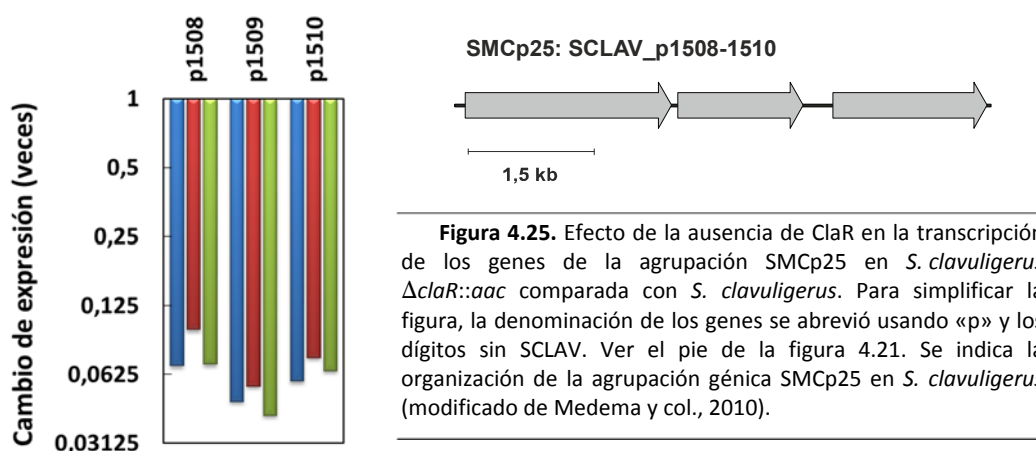


Figura 4.24. Análisis por HPLC a 311 nm de la producción de ácido clavamínico (3,9 min) y ácido clavulánico (10,5 min) en cultivo en medio SA a las 42 horas por *S. clavuligerus* (línea azul) y *S. clavuligerus* Δ *claR::aac* (línea negra). La asignación del pico de ácido clavamínico se hizo a través del tiempo de retención publicado por Paradkar y col. (1998) ya que no disponíamos de este compuesto para ser usado como patrón.

La agrupación SM Cp25 (SCLAV_p1508 a SCLAV_p1510) (Medema y col., 2010) mostró una subexpresión significativa de 0,05 veces de media (figura 4.25). Esta agrupación contiene genes para una clavaminato sintasa-oxigenasa (SCLAV_p1509) y una posible carbamoiltransferasa (SCLAV_p1508). SM Cp25 podría ser la responsable de la producción de un nuevo antibiótico β -lactámico (Medema y col., 2010, apartado 1.2.2) dado que la clavaminato sintasa codificada por SCLAV_p1509 presenta cierta similitud con Cas2 y Cas1 (42 %) de la agrupación de ácido clavulánico y clavamas, respectivamente.



La subexpresión de las agrupaciones de SM Cp25 y ácido clavulánico en todos los genes biosintéticos en ausencia del regulador ClaR (figuras 4.25 y 4.21) parece indicar una regulación conjunta de ambas, diferente a la que modula la expresión de las agrupaciones de clavamas y paráloga de clavamas, donde el efecto no es tan acusado (figuras 4.22 y 4.24).

4.2.6.2. Transcripción diferencial de la agrupación génica de la cefamicina C

Los genes biosintéticos de la agrupación génica de la cefamicina C se vieron sobreexpresados una media de 1,7 veces a las 22,5 horas; sin embargo, su transcripción disminuyó a las 46,5 y 60 horas de cultivo (figura 4.26). En todo caso, estas diferencias en la expresión no son estadísticamente significativas (apartado 4.2.6).

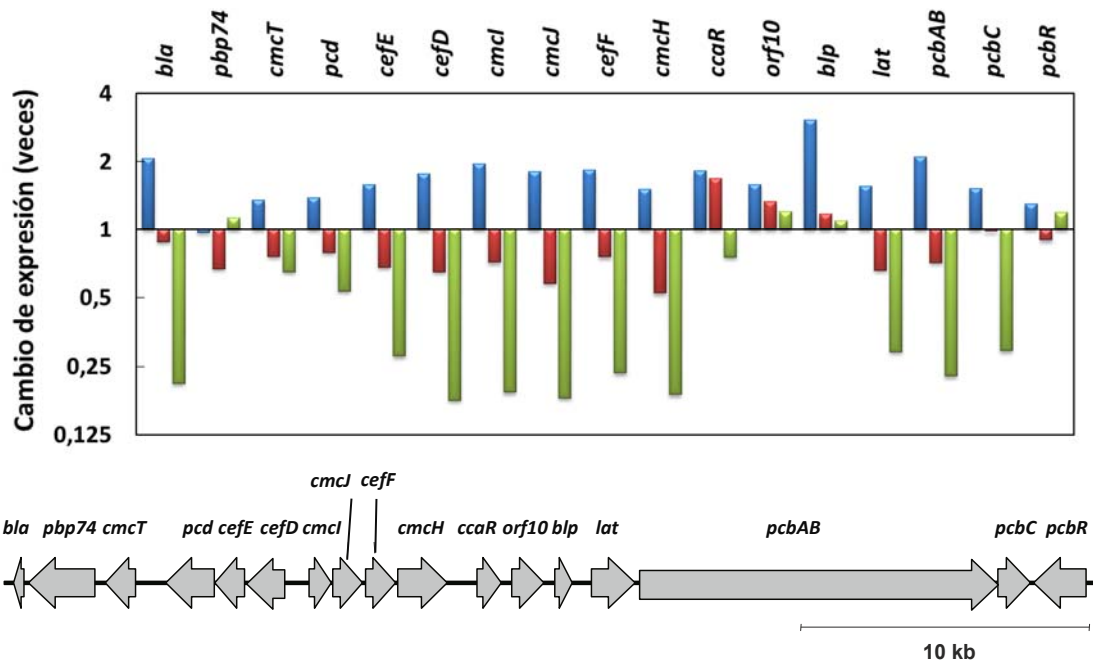


Figura 4.26. Efecto de la ausencia de *Cl**aR* en la transcripción de los genes de la agrupación de la cefamicina C en *S. clavuligerus* Δ *claR::aac* comparada con *S. clavuligerus*. Ver el pie de la figura 4.21. En la parte inferior de la figura se indica la organización de la agrupación génica de la cefamicina C en *S. clavuligerus*.

Pérez-Redondo y col., (1998) describen que el aumento del número de copias de *claR* resulta en una producción inferior de cefamicina C en *S. clavuligerus*. Además, el mutante *claR::aph* pSCL^{low} obtenido en nuestro laboratorio presenta aumentada la síntesis de cefamicina C (Pérez-Redondo, 2000), de forma similar a lo que ocurre en *S. clavuligerus* Δ *claR::aac* (figura 4.19). Por lo tanto, a pesar del perfil temporal de transcripción descendente en *S. clavuligerus* Δ *claR::aac* (figura 4.26), el aumento de la expresión de los genes de cefamicina C (hasta 1,7 veces) en los tiempos tempranos de la fermentación (22,5 horas) y los valores de expresión (M_g) próximos a cero o positivos en los tres tiempos de análisis para los genes de la agrupación (no mostrado) que indican que los genes se están transcribiendo aunque lo hagan a un nivel menor respecto a la cepa silvestre, podría explicar en parte el aumento de la producción de cefamicina C en los tiempos tardíos del cultivo (figura 4.19).

Por otro lado, los genes de la superagrupación cefamicina C-ácido clavulánico presuntamente implicados en la resistencia a antibióticos β -lactámicos (*pbpA*, *pbp2*, *pcbR*) fueron ligeramente sobreexpresados (figuras 4.21 y 4.26), resultado coherente con el aumento de producción de cefamicina C (figura 4.19).

4.2.6.3. Transcripción diferencial de la agrupación génica de la holomicina

El efecto de la delección de *claR* fue mucho más notable en la expresión de la agrupación génica de la holomicina, un metabolito que superproduce tanto el mutante *S. clavuligerus* $\Delta claR::aac$ (figura 4.19) como *S. clavuligerus claR::aph pSCL^{low}* (de la Fuente y col., 2002), que en los casos anteriores.

Los genes *hlmABCDEFGF* presentaron una media de sobreexpresión de 289 veces a las 22,5 horas de cultivo, que se redujo considerablemente a las 46,5 horas y en menor grado a las 60 horas. Sin embargo, el aumento de la expresión fue menor para *hlmK*, *hlmL* y *hlmM* (14 veces de media a la 22,5 horas), genes que codifican una tioesterasa, una proteína que contiene un dominio de condensación y un regulador transcripcional de tipo AmphRI, respectivamente. Solo dos genes, *hlmI* y *hlmH*, mostraron una alta y mantenida sobreexpresión a todos los tiempos de muestreo con máximas diferencias en relación a la cepa silvestre a las 46,5 horas (555 veces de media) y 60 horas (329 veces de media) (figura 4.27). El gen *hlmI* codifica una enzima similar a la tiorredoxina ditiol oxidasa dependiente de flavina que emplea oxígeno como cosustrato, forma el enlace disulfuro que cicla el segundo anillo en la holomicina (Li y Walsh, 2011) y podría formar parte del regulón RpoE (apartado 4.2.6.5.1). El gen *hlmH* codifica un transportador de tipo MFS pero su papel en la producción de holomicina aún se desconoce (Liras, 2014); la S- metilación de holomicina ha sido descrita como un mecanismo de resistencia de holomicina en *S. clavuligerus* (Li y col., 2012), sin embargo, la alta expresión de *hlmH* cuando la cepa está produciendo activamente holomicina, sugiere que el bombeo de holomicina hacia el exterior de la célula podría ser un mecanismo de resistencia alternativo.

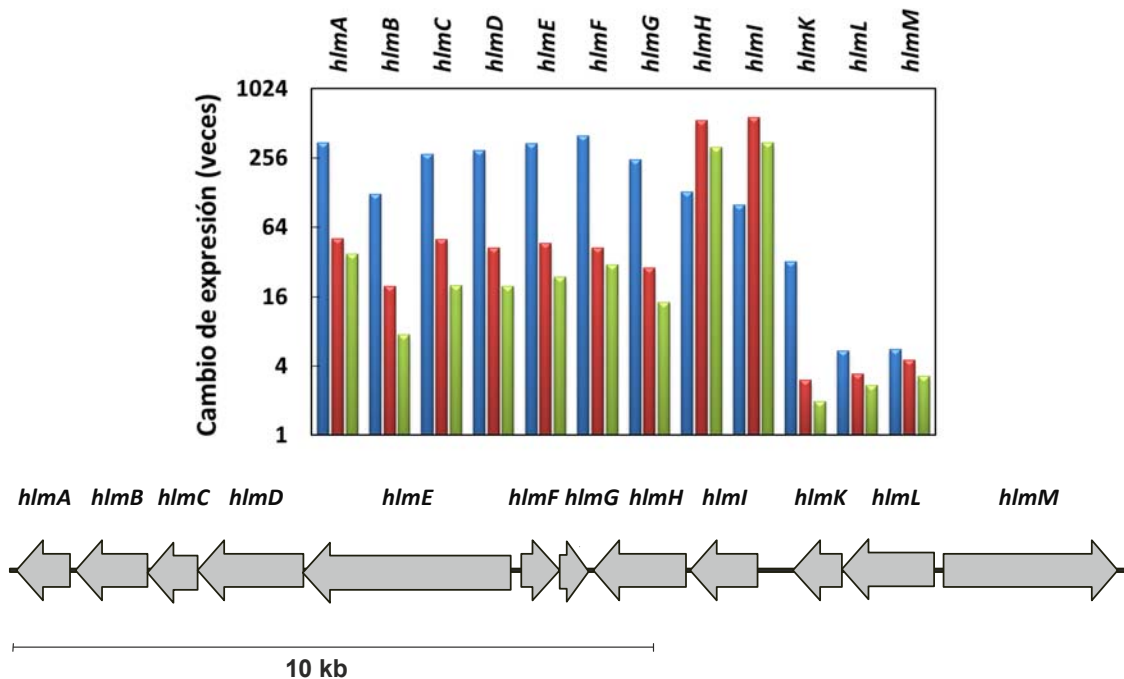


Figura 4.27. Efecto de la ausencia de ClaR en la transcripción de los genes de la agrupación de holmicina en *S. clavuligerus* $\Delta claR::aac$ comparada con *S. clavuligerus*. Ver el pie de la figura 4.21. En la parte inferior de la figura se indica la organización de la agrupación génica de la holmicina en *S. clavuligerus*.

4.2.6.4. Otras agrupaciones génicas de metabolitos secundarios afectadas por la pérdida de ClaR

Tres agrupaciones, SMCp20, SMCp22 y SMCp24, presuntamente implicadas en la producción de metabolitos secundarios (Medema y col., 2010) y localizadas en el megaplásmido pSCL4, se vieron especialmente afectadas por la pérdida del regulador ClaR. Como se indicó al inicio del apartado 4.2.6, para cada gen de las agrupaciones de metabolitos secundarios, los valores M_c , p BH-correctado y el cambio de expresión en número de veces se indican en la tabla 7.2 del anexo.

4.2.6.4.1. Agrupación SMCp20

Esta agrupación génica parece estar implicada en la biosíntesis de péptidos no ribosomales que contienen una unidad derivada del ácido cafeico, dada la presencia de tres sintetetas de péptidos no ribosomales (SCLAV_p1339 a SCLAV_p1341) y una cafeoil-O-metiltransferasa (SCLAV_p1336) (Medema y col., 2010). El bloque de genes SCLAV_p1334 a SCLAV_p1337 se encontró fuertemente subexpresado, con un nivel de transcripción relativo entre 0,03 y 0,38 veces (figura 4.28). Estos genes codifican proteínas con un dominio UPF0089, una acil-CoA sintetasa, la cafeoil metiltransferasa y una histidina/tirosina amonio liasa, respectivamente. Los genes para las sintetetas de péptidos no ribosomales y SCLAV_p1338 no vieron afectada su expresión (figura 4.28).

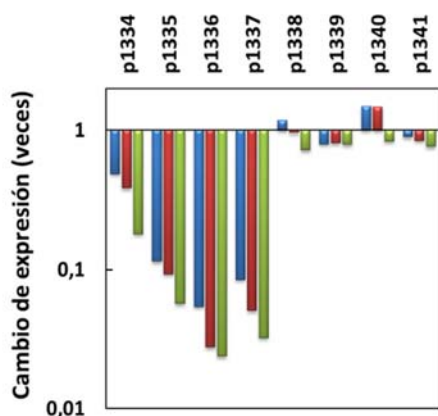
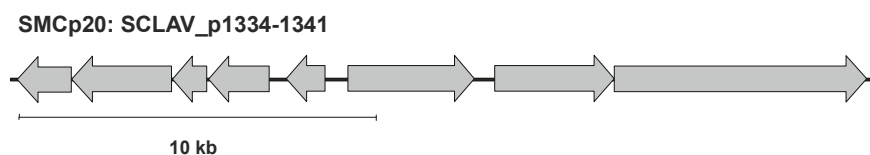


Figura 4.28. Efecto de la ausencia de *ClaR* en la transcripción de los genes de la agrupación SMCp20 en *S. clavuligerus* Δ *claR::aac* comparada con *S. clavuligerus*. Para simplificar la figura, la denominación de los genes se abrevió usando «p» y los dígitos sin SCLAV. Ver el pie de la figura 4.21. En la parte inferior de la figura se indica la organización de la agrupación génica SMCp20 en *S. clavuligerus* (modificado de Medema y col., 2010).



4.2.6.4.2. Agrupación SM Cp22

Esta agrupación génica parece estar relacionada con la biosíntesis de terpenos, dada la presencia de una pentaleneno sintasa (SCLAV_p1407) (Medema y col., 2010). Todos los genes de la agrupación se vieron subexpresados, especialmente SCLAV_p1407, SCLAV_p1410, que codifica una proteína con un dominio DUF397, y SCLAV_p1415, que codifica una posible hidrolasa (subexpresión de 0,01 veces). Los otros seis genes de la agrupación, entre ellos SCLAV_p1409, que codifica un citocromo P450, se subexpresaron de 0,1 a 0,6 veces (figura 4.29). La reducción del nivel de transcripción de los citocromos codificados por SCLAV_p1409, SCLAV_p1451 y *cyp* (apartado 4.2.6.1) podría estar contribuyendo al estrés oxidativo generado en la célula descrito en el apartado 4.2.6.5.1.

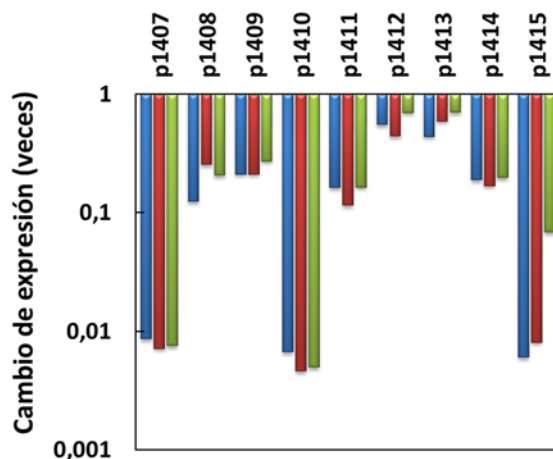
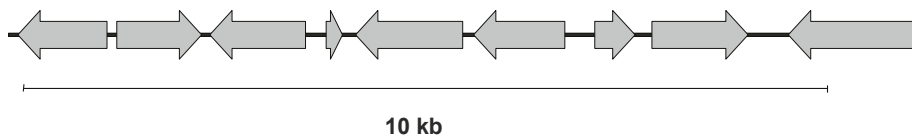


Figura 4.29. Efecto de la ausencia de ClaR en la transcripción de los genes de la agrupación SM Cp22 en *S. clavuligerus* Δ *clar::aac* comparada con *S. clavuligerus*. Para simplificar la figura, la denominación de los genes se abrevió usando «p» y los dígitos sin SCLAV. Ver el pie de la figura 4.21. En la parte inferior de la figura se indica la organización de la agrupación génica SM Cp22 en *S. clavuligerus* (modificado de Medema y col., 2010).

SM Cp22: SCLAV_p1407-1415



4.2.6.4.3. Agrupación SM Cp24

Esta agrupación parece estar implicada en la biosíntesis de un péptido no ribosomal debido a la presencia de una supuesta indigoidina sintasa (SCLAV_1474) (Medema y col., 2010). Todos los genes en esta agrupación génica se vieron subexpresados entre 0,01 y 0,6 veces, siendo especialmente afectados: SCLAV_p1474 y SCLAV_p1475, para la supuesta indigoidina sintasa y un posible transportador, y SCLAV_p1478, SCLAV_p1482 y SCLAV_p1483 que codifican una proteína hipotética y dos proteínas con dominios DUF, respectivamente (figura 4.30).

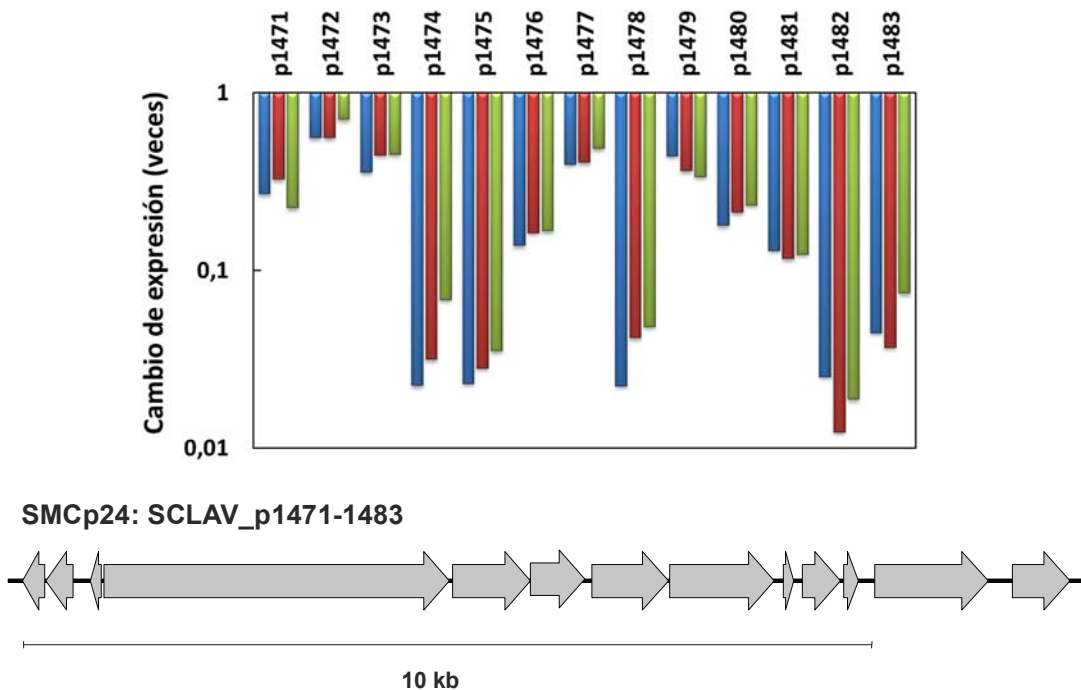


Figura 4.30. Efecto de la ausencia de *ClAR* en la transcripción de los genes de la agrupación SM Cp24 en *S. clavuligerus* $\Delta clAR::aac$ comparada con *S. clavuligerus*. Para simplificar la figura, la denominación de los genes se abrevió usando «p» y los dígitos sin SCLAV. Ver el pie de la figura 4.21. En la parte inferior de la figura se indica la organización de la agrupación génica SM Cp24 en *S. clavuligerus* (modificado de Medema y col., 2010).

4.2.6.4.4. Agrupación SMC6

Esta agrupación comprende los genes SCLAV_1942-SCLAV_1955 y parece estar implicada en la biosíntesis de un sideróforo (Medema y col., 2010). Dentro de esta agrupación, los genes SCLAV_1948-SCLAV_1951 son ortólogos de *desABCD*, los cuales constituyen la agrupación génica de la desferroxiamina E o nocardamina de *S. coelicolor* (Barona-Gómez y col., 2004). A pesar de que los valores *p* BH-correctados asociados a sus valores M_c de expresión no pasaron el filtro establecido, este bloque de genes (SCLAV_1948-SCLAV_1951), se vio notablemente afectado presentando una expresión media de 0,6 a las 22,5 horas y de 0,01 veces a las 46,5 horas (figura 4.31). Además, SCLAV_1947, que codifica una proteína de interacción con sideróforos, presentó un perfil de cambio de expresión similar al de la agrupación SCLAV_1948-SCLAV_1951. El bloque de genes SCLAV_1942-SCLAV_1946 se vio subexpresado 0,12 veces de media a las 60 horas (figura 4.31).

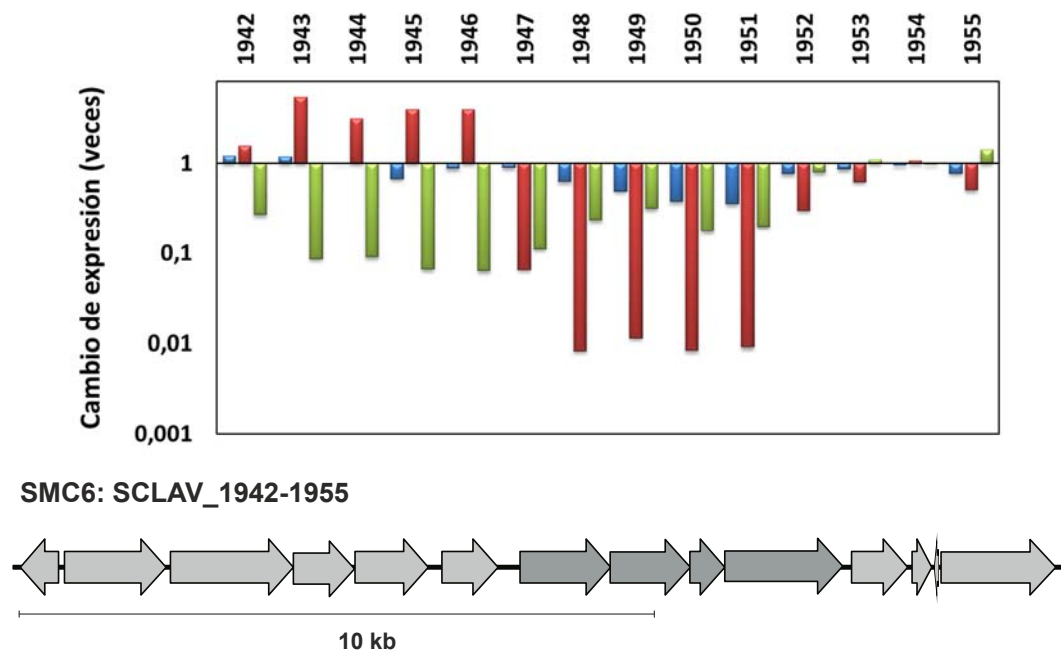


Figura 4.31. Efecto de la ausencia de *Clr* en la transcripción de los genes de la agrupación SMC6 en *S. clavuligerus* $\Delta clr::aac$ comparada con *S. clavuligerus*. Para simplificar la figura, la denominación de los genes se abrevió usando los dígitos sin SCLAV. Ver el pie de la figura 4.21. En la parte inferior de la figura se indica la organización de la agrupación génica SMC6 en *S. clavuligerus* (modificado de Medema y col., 2010). En gris oscuro se indican los cuatro genes ortólogos de los que constituyen la agrupación de nocardamina en *S. coelicolor* (Barona-Gómez y col., 2004).

4.2.6.5. Otros genes afectados en *S. clavuligerus* Δ *claR::aac*

ClaR ha sido descrito como un regulador implicado en el control de la biosíntesis de ácido clavulánico y relacionado con la superproducción de holomicina; sin embargo, en este trabajo se demuestra que este regulador ejerce además un efecto global afectando a otras agrupaciones génicas supuestamente implicadas en la producción de metabolitos secundarios (las ya descritas SMCp20, SMCp22, SMCp24, SMCp25, SMC6), y a bloques de genes no directamente relacionados con los anteriores donde se codifican reguladores o funciones diversas para la célula.

4.2.6.5.1. Genes reguladores

En el mutante *S. clavuligerus* Δ *claR::aac* se vieron significativamente activados o reprimidos catorce genes que codifican proteínas reguladoras (tabla 7.3, Anexo). De estos catorce reguladores, cinco fueron sobreexpresados entre 2 y 8 veces, y nueve subexpresados entre 0,02 y 0,4 veces.

➤ Respuesta al estrés oxidativo: el regulón RpoE

En *S. coelicolor* los genes *sigR-rsrA* codifican, respectivamente, el factor sigma SigR de la ARN polimerasa y un factor antisigma RsrA, que en coordinación controlan el regulón de SigR formado por 160 genes con un amplio espectro de funciones en la célula. Este regulón permite la homeostasis redox del tiol y reacciones redox dependientes de flavoproteínas o proteínas del hierro-azufre para controlar el estrés oxidativo, así como el correcto plegamiento de las proteínas, entre otras funciones (figura 4.32) (Kim y col., 2012a).

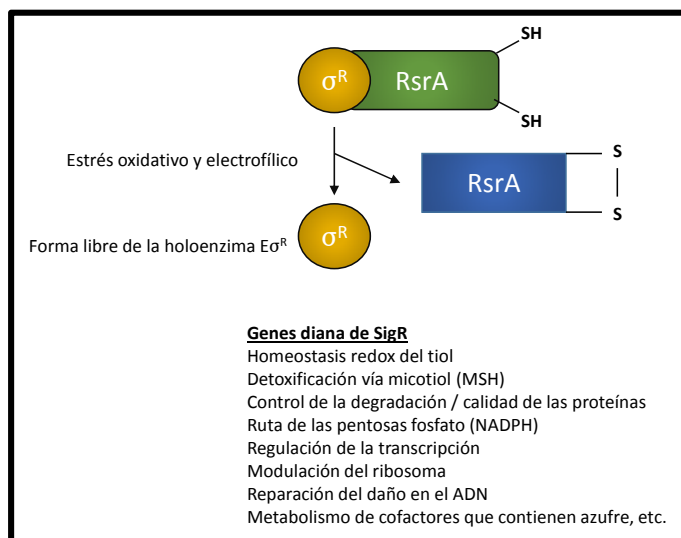


Figura 4.32. Activación del regulón SigR. El factor sigma SigR se encuentra asociado con el factor antisigma RsrA. En respuesta al estrés oxidativo y electrofílico, los grupos tiol de RsrA se oxidan y forman un puente disulfuro, liberando el factor sigma SigR. En su forma libre, SigR activa una serie de genes con funciones diversas relacionadas con el mantenimiento de la homeostasis redox del tiol en la célula, entre otras. (Modificado de Kim y col., 2012a).

SCLAV_4082, un marco de lectura anotado como *rpoE* que codifica el factor sigma de la ARN polimerasa RpoE, fue el gen con función reguladora más afectado por la ausencia de ClaR. Los genes SCLAV_4082 y SCLAV_4083 son ortólogos del sistema *sigR-rsrA* de *S. coelicolor* y se sobreexpresaron en el mutante Δ *claR*, 6 y 4 veces, respectivamente (tabla 7.3, Anexo). Además, los genes *trxB* (SCLAV_2898) y *trxA* (SCLAV_2899), que forman parte del regulón RpoE y que codifican dos tiorredoxinas implicadas en la eliminación del puente disulfuro de RsrA y, por tanto, en el reciclaje de este factor antisigma (Kang y col., 1999; Paget y col., 2001), se encontraron también sobreexpresados 5 y 7 veces, respectivamente (tabla 7.4, Anexo).

De los 160 genes del regulón SigR de *S. coelicolor*, 117 presentan un ortólogo en *S. clavuligerus*. En el mutante *S. clavuligerus* Δ *claR* se observó la sobreexpresión de 73 de estos 117 genes con un nivel igual o superior a 1,5 veces en alguno de los 3 tiempos de muestreo, estando sobreexpresados en los 3 tiempos 31 de los genes (tabla 7.4, Anexo). En la cepa silvestre la producción de ácido clavulánico podría ayudar a controlar el estrés oxidativo ya que varios pasos de la ruta (aquellos en los que interviene la clavaminato sintasa) consumen oxígeno. Sin embargo, *S. clavuligerus* Δ *claR::aac* no produce ácido clavulánico, por lo que el exceso oxidativo podría activar a RpoE. La activación del regulón RpoE causaría la sobreexpresión de la tiorredoxina reductasa (SCLAV_5275) para la biosíntesis de holomicina (apartado 4.2.6.3) y también la transcripción diferencial de muchos genes que codifican oxidasas, oxidorreductasas y reductasas mostrados en la tabla 7.5 del anexo.

➤ Agrupación de biosíntesis de la estaurosporina

El gen *staR* (SCLAV_p1122) que codifica el activador transcripcional de biosíntesis de la estaurosporina, con un 67,2 % de similitud con el regulador StaR de *Streptomyces* sp. TP-A0274 (Onaka y col., 2002), mostró un aumento de expresión de 7,7 veces en el mutante (figura 4.33; tabla 7.3, Anexo). Sorprendentemente los genes biosintéticos de la estaurosporina no se vieron afectados, con la excepción de SCLAV_p1123, que codifica una metiltransferasa, sobreexpresada en los tres tiempos analizados, con un máximo de cambio de 70 veces a las 46,5 horas (figura 4.33; tabla 7.5, Anexo). Este dato arroja luz sobre algunos aspectos de la regulación de la agrupación de estaurosporina, ya que indica que la sobreexpresión del regulador *staR* no es suficiente para activar a la agrupación.

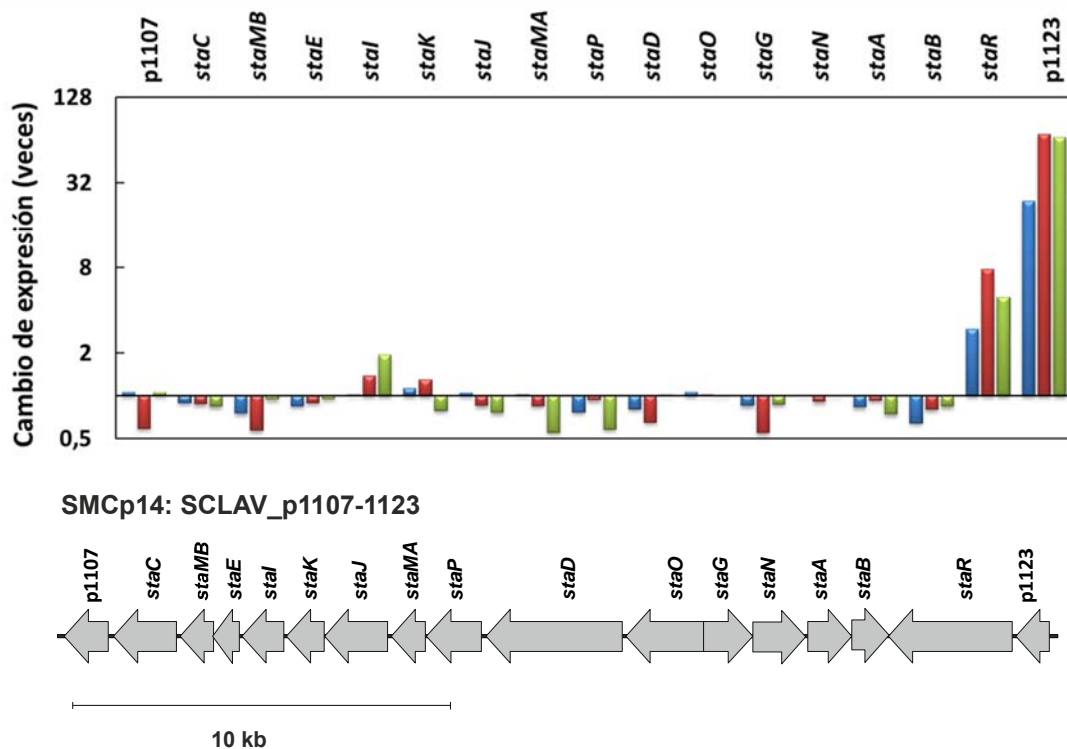


Figura 4.33. Efecto de la ausencia de *ClrA* en la transcripción de los genes de la agrupación de estaurosporina (SMCp14) en *S. clavuligerus* $\Delta clrA::aac$ comparada con *S. clavuligerus*. Para simplificar la figura, la denominación de algunos genes se abrevió usando «p» y los dígitos sin SCLAV. Ver el pie de la figura 4.21. En la parte inferior de la figura se indica la organización de la agrupación génica de estaurosporina en *S. clavuligerus* (modificado de Medema y col., 2010).

➤ **Diferenciación celular: el operón *amfTSBAR***

La diferenciación celular requiere la expresión del operón *amfTSBAR* en *S. griseus* o de su ortólogo *ramCSABR* en *S. coelicolor* y *S. lividans*, responsable de la formación del péptido surfactante SapB maduro que permite la formación del micelio aéreo (apartado 1.1.3.1). La activación de este operón está modulada por los reguladores AmfR en *S. griseus* y RamR en *S. coelicolor* y *S. lividans* (figura 4.34; Keijser y col., 2002; O'Connor y col., 2002; Yamazaki y col., 2003; O'Connor y Nodwell, 2005), todos ellos de tipo NarL/FixJ.

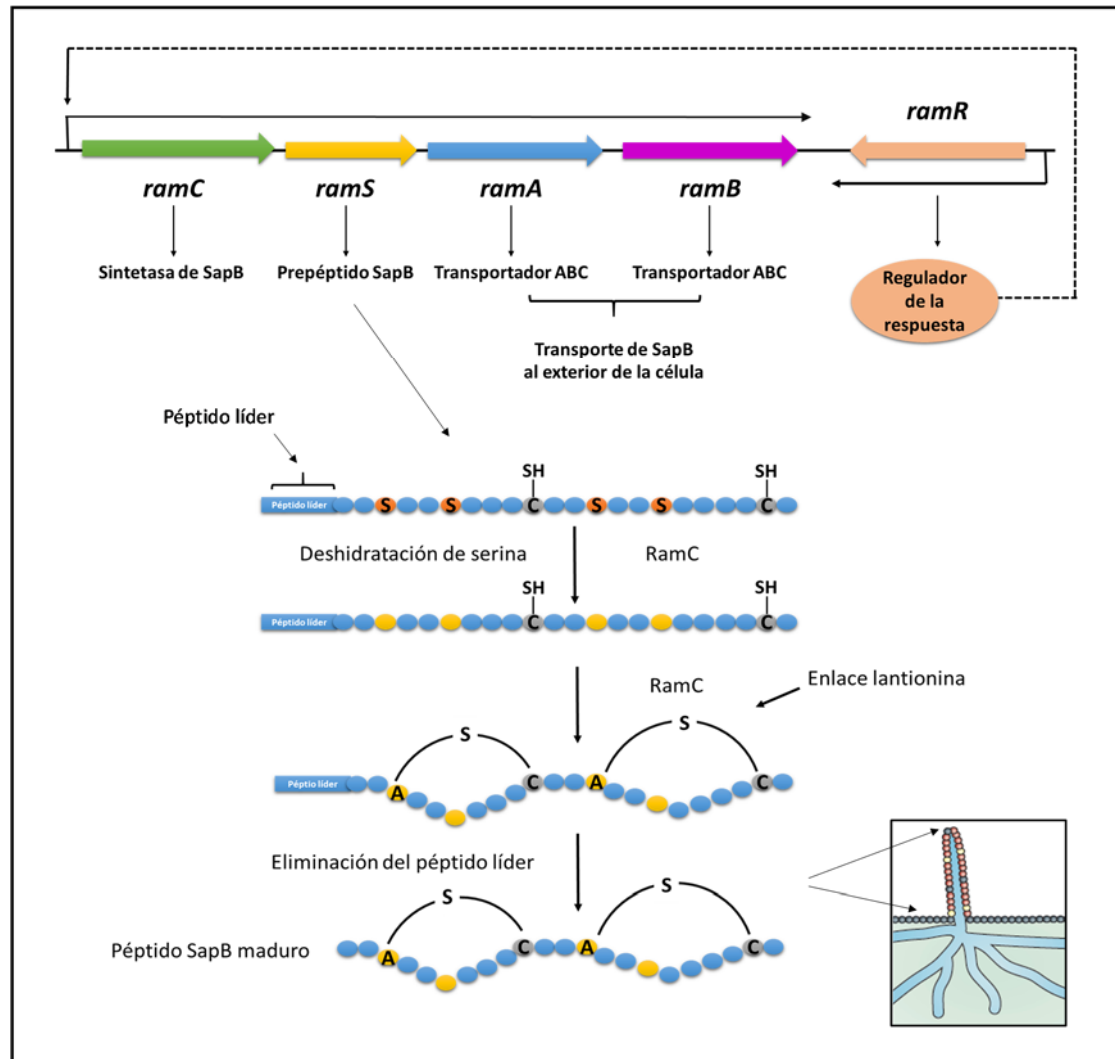


Figura 4.34. Biosíntesis del péptido surfactante SapB. En este operón, el gen *ramS* codifica un prepéptido, SapB, que es modificado postraduccionalmente por la proteína RamC. Esta enzima primero deshidrata los cuatro residuos de serina (círculos naranjas) del prepéptido SapB convirtiéndolos en dehidroalaninas (círculos amarillos), y, posteriormente, cataliza el enlace lantionina entre los grupos sulfhidrilo de las cisteínas y dos de las dehidroalaninas. Finalmente, el péptido líder es eliminado y el péptido SapB maduro es transportado al exterior de la célula por las proteínas RamA y RamB, permitiendo de este modo la formación del micelio aéreo y la esporulación. La activación de la expresión de este operón está controlada por el regulador RamR. En la esquina inferior derecha se muestran las hifas sustrato (azules) en el entorno acuoso (verde) y una hifa aérea. Las flechas indican la localización del péptido surfactante SapB (esferas verdes), tanto en la hifa aérea como en la interfase agua-aire, donde actúa facilitando la emergencia de la hifa aérea a la atmósfera. (Modificado de Flärdh y Buttner, 2009).

El regulador AmfR, ortólogo de RamR, y codificado por el gen SCLAV_4956, fue el gen regulador con mayor nivel de represión en *S. clavuligerus* $\Delta claR::aac$, estando casi completamente silenciado en el mutante (subexpresión de 0,02 veces). La carencia de transcrito de *amfR* en *S. clavuligerus* $\Delta claR::aac$ reprime fuertemente la expresión del gen *amfT* (subexpresado 0,01 veces), para una supuesta quinasa ortóloga a RamC, y de *amfA* y *amfB*, que

codifican subunidades de un transportador ABC, aunque no de manera tan acusada (0,14 y 0,17 veces, respectivamente) (tabla 7.5, Anexo).

Para comprobar que la disminución en la expresión de *amfR* y del operón *amfTBA* concuerda con la incapacidad para formar micelio aéreo observada en *S. clavuligerus* Δ *clAR::aac*, se sembró este mutante junto con su cepa parental en medio ME y se observó la evolución de la esporulación (figura 4.35). A los 12 días de cultivo, *S. clavuligerus* Δ *clAR::aac* no formó micelio aéreo excepto en el margen sembrado más próximo a la cepa silvestre, probablemente por difusión del péptido SapB desde esta última (figura 4.35, placa central). La complementación del mutante Δ *clAR* restableció la esporulación (figura 4.35, placa 2, D).



Figura 4.35. Efecto de la ausencia de *ClAR* sobre la diferenciación morfológica. 1) *S. clavuligerus* (A) y *S. clavuligerus* Δ *clAR::aac* (B) en medio ME tras 7 días (placa 1-izquierda) y 12 días (placa 1-derecha) de cultivo. 2) Complementación de la mutación Δ *clAR*. *S. clavuligerus* (A), *S. clavuligerus* Δ *clAR::aac* (B), cepa control de la complementación *S. clavuligerus* Δ *clAR::aac* [pMS83] (C) y cepa complementada *S. clavuligerus* Δ *clAR::aac* [pMS83-*clAR*] (D).

Los genes *amfTBAR* de *S. clavuligerus* son ortólogos de los del operón *ramCSABR* de *S. coelicolor* y *S. lividans*, o *amfTSBAR* de *S. griseus* y *S. avermitilis*, y conservan además la sintenia con los de estos *Streptomyces* (figura 4.36). Sin embargo, en la base de datos de *S. clavuligerus* StrepDB o del *Broad Institute* no existe un ortólogo anotado de *amfS* o *ramS*.

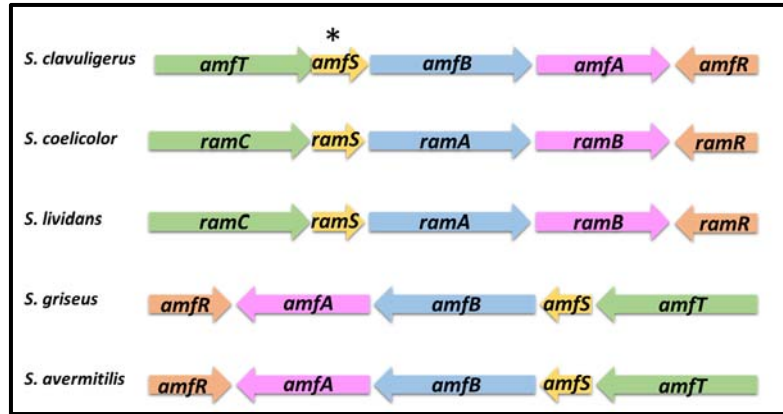


Figura 4.36. Organización de los operones *amf* en *S. clavuligerus*, *S. griseus*, *S. avermitilis* y *ram* en *S. coelicolor* y *S. lividans* según la base de datos StrepDB. En los cinco operones se observa la presencia del regulador de respuesta (*amfR/ramR*), la enzima responsable de las modificaciones postraduccionales del prepéptido SapB (*amfT/ramC*), los dos transportadores de tipo ABC que exportan el péptido SapB (*amfA-amfB/ramA-ramB*) y el gen *amfS* que codifica el prepéptido SapB. Los genes ortólogos se indican con el mismo color. El asterisco (*) indica el gen *amfS* localizado en *S. clavuligerus* en el presente trabajo.

Por ello y con el fin de localizar el marco de lectura responsable de la síntesis del prepéptido SapB en *S. clavuligerus*, se tomó la secuencia aminoacídica de RamS de *S. coelicolor* (42 aa) y se hizo un alineamiento local con el genoma de *S. clavuligerus* empleando el buscador BLAST. De este modo, entre el gen *amfT* y *amfB*, se identificó una secuencia con una identidad de entre el 48 y el 60 % para un péptido de 43 aminoácidos de, a su vez, entre el 64 y el 76 % de similitud con las cuatro especies de *Streptomyces* analizadas (figura 4.36). Además, este péptido presenta los residuos aminoacídicos S²⁴, S²⁷, C³¹, S³⁵, S³⁸ y C⁴² (figura 4.37) implicados en el procesamiento del prepéptido codificado por *amfS* o *ramS* de los cuatro *Streptomyces* según Kodani y col. (2004). Por ello, la secuencia nucleotídica identificada parece tratarse del gen *amfS* que codificaría el prepéptido surfactante SapB en *S. clavuligerus*.

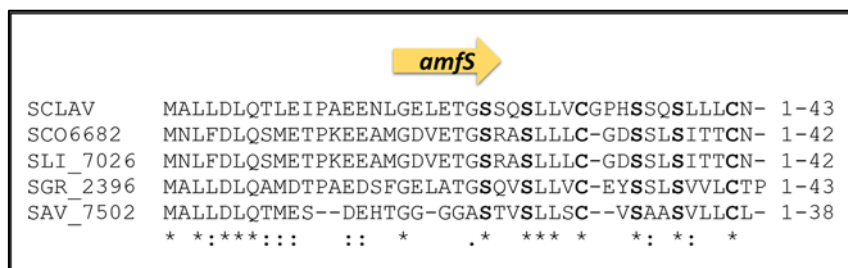


Figura 4.37. Alineamiento del prepéptido SapB identificado en *S. clavuligerus* (SCLAV) y los codificados por *ramS*, en *S. coelicolor* (SCO6682) y *S. lividans* (SLI_7026), y *amfS* en *S. griseus* (SGR_2396) y *S. avermitilis* (SAV_7502). Los residuos aminoacídicos conservados en las cinco secuencias se resaltan en negrita. Los asteriscos indican aminoácidos conservados. El punto (.) y los dos puntos (:) indican sustituciones menos o más conservativas, respectivamente.

El marco de lectura *amfS* que se ha identificado, y carente por tanto de código SCLAV, se localiza en el genoma en la posición 5822261-5822392 según la base de datos StrepDB (figura 4.38, A). Esta localización entre los genes *amfT* y *amfB* en *S. clavuligerus* mantiene la sintenia que *ramS* o *amfS* presenta dentro del operón en las otras cuatro especies de *Streptomyces* anteriormente mencionadas (figura 4.36). A diferencia del gen que codifica el prepéptido SapB en estas otras cuatro especies, el marco de lectura identificado en *S. clavuligerus* solapa en 14 nucleótidos con el final de la secuencia de *amfT* (figura 4.38, B). Tras un análisis *in silico* de los genes *amfT* y *amfS* en diferentes especies de *Streptomyces*, se observó que este solapamiento de 14 nucleótidos se da también en *Streptomyces roseus* (figura 4.38, B). Tras este análisis, se concluye que el marco de lectura identificado entre el gen *amfT* y *amfB* de *S. clavuligerus* debería ser anotado como *amfS* en las bases de datos.

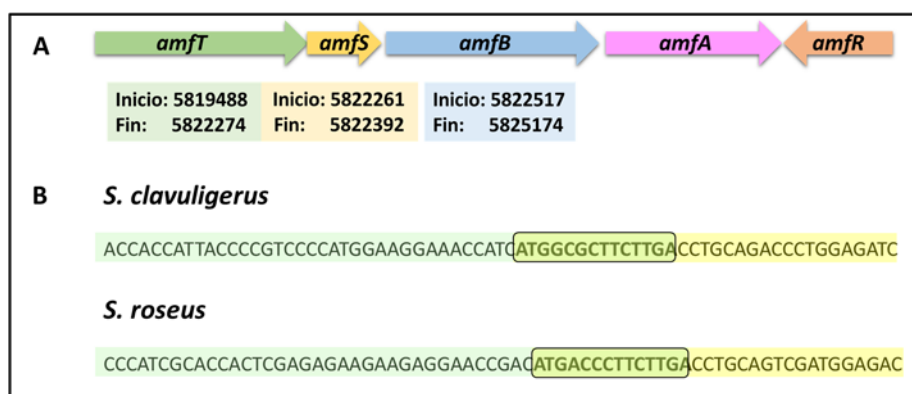


Figura 4.38. A) Localización del marco de lectura *amfS* en el genoma de *S. clavuligerus*. Se indica la posición del nucleótido de inicio y fin de *amfS*, así como la de los genes flanqueantes *amfT* y *amfB*. B) Solapamiento de los genes *amfT* y *amfS* en *S. clavuligerus* y en *S. roseus*. Final de la secuencia del gen *amfT* en verde e inicio de la secuencia en amarillo. Los 14 nucleótidos del inicio del marco de lectura *amfS* que solapan con el gen anterior (*amfT*) se presentan en el recuadro y en letra negra.

La secuencia de *amfS*, al no estar anotada como gen en la base de datos StrepDB, no se incluyó en el diseño de las sondas de la micromatriz para el análisis de expresión, por lo que no se tienen datos de su transcripción. Sin embargo, considerando que forma parte de un operón subexpresado, *amfS* podría estar también reprimido en *S. clavuligerus* Δ *clAR::aac*.

En resumen, el gen *ramS* codifica un péptido de 42 aminoácidos que, tras la modificación postraduccional, produce SapB, un lantipéptido requerido para la formación de micelio aéreo en *S. coelicolor* (Flårdh y Buttner, 2009). RamC, inicialmente descrito como una proteína quinasa (Hudson y col., 2002), es ahora considerada una enzima que deshidrata y cicla el prepéptido SapB o péptido RamS (Kodani y col., 2004; figura 4.34). Tras lo descrito anteriormente en cuanto

a la identificación de *amfS* en el genoma de *S. clavuligerus*, esta especie ha de estar produciendo un péptido similar a RamS que difunde e induce la formación de micelio aéreo en *S. clavuligerus* Δ *clAR::aac* cuando ambas cepas crecen próximas (figura 4.35, placa central). Este fenómeno de complementación extracelular o *cross-feeding* entre la cepa silvestre y el mutante *amfS*, ya ha sido observado también en cocultivos de la cepa silvestre y el mutante *amfS* en *S. griseus* (Ueda y col., 2002). Un fenómeno similar ocurre en *S. coelicolor* cuando el péptido RamS es añadido al cultivo sólido de un mutante *ramS* (Willey y col., 1991).

La reducción de la transcripción observada en *amfT* parece ser característica de ClaR y no de AdpA o BldD, reguladores cuyo papel en la regulación de la expresión de *amfT* ha sido descrito en *S. griseus* (Yamazaki y col., 2003; Ueda y col., 2005), ya que la expresión de SCLAV_0719 (*bldD*) no se vio afectada en *S. clavuligerus* Δ *clAR::aac* y SCLAV_1957 (*adpA*) se sobreexpresó (3,7 veces) solamente a etapas muy tardías de cultivo (60 horas). La formación de micelio aéreo y la esporulación fue totalmente restaurada en la cepa complementada en *clAR* (figura 4.35, placa derecha) confirmando el efecto de ClaR sobre la expresión del operón *amfTBAR*.

➤ Sistema de dos componentes CutR-CutS

Los genes SCLAV_4787 y SCLAV_4788 son ortólogos de *cutS-cutR*, dos genes que codifican un sistema de dos componentes que reprime la producción de actinorrodina en *S. lividans* y *S. coelicolor* (Tseng y Chen, 1991; Chang y col., 1996). Además, este sistema podría estar implicado en la regulación del metabolismo del cobre en *Streptomyces* (Tseng y Chen, 1991). SCLAV_4787 y SCLAV_4788 no modificaron su expresión en el mutante Δ *clAR*, sin embargo, los genes SCLAV_p1438 y SCLAV_p1439, presuntamente parálogos a SCLAV_4787 y SCLAV_4788, con un 48,9 % y un 69,7 % de similitud, se expresaron 0,05 y 0,1 veces, respectivamente (tabla 7.3, Anexo).

4.2.6.5.2. Genes con funciones diversas en la célula

Además de los genes ya mencionados, en el mutante Δ *clAR* se vieron significativamente afectados 135 genes que codifican proteínas con funciones diversas en la célula, de los cuales 48 se activaron de 2 a 70 veces y 87 se reprimieron de 2 a 302 veces, respecto de la cepa silvestre (tabla 7.5, Anexo). La distribución de estos 135 genes, en las diferentes categorías según su función en la célula de acuerdo a la base de datos COG (*Clusters of Orthologous Groups*), fue la siguiente:

Categoría	Número de genes
Transporte y metabolismo de lípidos	9
Biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolismo secundario	8
Transporte y metabolismo de iones inorgánicos	6
Transporte y metabolismo de coenzimas	5
Formación de envueltas celulares	5
Conversión de energía	4
Modificaciones postraduccionales, chaperonas y reciclaje de proteínas	4
Mecanismo de defensa	3
Transcripción	3
Transporte y metabolismo de carbohidratos	3
Transporte y metabolismo de aminoácidos	2
Mecanismos de transducción de señal	1
Replicación, recombinación y reparación del ADN	1
Traducción y estructura ribosomal	1
Transporte y metabolismo de nucleótidos	1
Proteínas hipotéticas	36
Función desconocida	2
Función general predicha	7
Genes no clasificados	34

Tabla 4.2. Número de genes con funciones diversas en la célula afectados en Δ *cllR* agrupados según su categoría funcional de acuerdo a la base de datos COG.

Los genes con mayor grado de activación fueron una proteasa Clp dependiente de ATP (SCLAV_0526), que podría estar implicada en el control de calidad de las proteínas necesario debido al estrés oxidativo que se da en el mutante, y la ya mencionada metiltransferasa de la agrupación de estaurosporina (SCLAV_p1123), con sobreexpresiones de 22 y 70 veces, respectivamente. Los que experimentaron una sobreexpresión de entre 10 y 20 veces fueron una enzima de la superfamilia de las ATP-grasp (SCLAV_1184), una posible hidrolasa (SCLAV_5199), una supuesta acetiltransferasa (SCLAV_0254), una oxidasa de cobre (SCLAV_5198), una flavodoxina (SCLAV_p0560) y una fumarato hidratasa (SCLAV_3946), las tres últimas presuntamente relacionadas con el control del estrés oxidativo requerido en la célula en ausencia de ClrR. Los genes con mayor grado de represión fueron SCLAV_p1381, que codifica una proteína que contiene un dominio CnaB, y SCLAV_p1431, una supuesta proteína de superficie de membrana. Ni uno ni otro gen parecen transcribirse en ninguno de los tres tiempos del muestreo (tabla 7.5, Anexo).

De estos 135 genes afectados, 17 codifican oxidorreductasas, oxidasas, flavodoxinas, peroxidasas o reductasas. De estos 17 genes, SCLAV_1808 y SCLAV_4869 constituyen parte del regulón RpoE y se vieron sobreexpresados, y de los 15 restantes, que podrían estar regulados por RpoE, SCLAV_5583, SCLAV_5198, SCLAV_p0560 y SCLAV_p0842 se activaron y los otros 11 se reprimieron (tabla 7.5, Anexo).

4.2.6.6. Validación de los datos transcriptómicos

Los datos transcriptómicos obtenidos con micromatrices han sido validados utilizando RT- qPCR sobre las mismas muestras de ARN de 46,5 horas empleadas para los estudios de análisis global. Fueron validados quince genes (figura 4.39) pertenecientes a las agrupaciones del ácido clavulánico, cefamicina C, holomicina y estaurosporina, varios que codifican proteínas reguladoras, así como cinco para proteínas con diferentes funciones (tablas 7.1 y 7.6, Anexo).

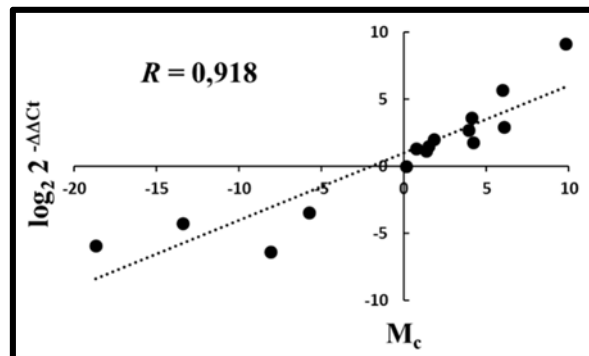


Figura 4.39. Validación de los resultados del análisis transcriptómico. Representación de la correlación para cada gen de los valores obtenidos por micromatrices, y mostrados en la tabla 7.6 (Anexo), y por RT-qPCR en la comparación entre *S. clavuligerus* $\Delta claR::aac$ respecto de *S. clavuligerus*.

Dada la proximidad a 1 de la pendiente de la recta obtenida al correlacionar los datos de ambas técnicas (valor de correlación de Pearson de 0,918) (figura 4.39), los valores de RT-qPCR confirmaron los resultados obtenidos en las micromatrices.

En resumen, la delección del gen *claR* reprime la expresión de los genes de la biosíntesis del ácido clavulánico, especialmente a los implicados en las etapas tardías de la ruta, así como a los de la biosíntesis de la cefamicina C, aunque a estos últimos en menor medida. Este regulador activa, y muy notablemente, la transcripción de los genes de la biosíntesis de holomicina. Además, en este trabajo se ha observado que ClaR presenta un efecto más amplio que el previamente descrito, desempeñando un importante papel sobre la expresión de agrupaciones de metabolitos secundarios crípticos de *S. clavuligerus* recientemente descritas SMCp20, SMCp22, SMCp24, SMCp25 y la de nocardamina. Asimismo, este regulador interviene en el desarrollo del micelio y en la expresión de genes del regulón RpoE implicados en estrés oxidativo.

Análogamente a lo observado para el regulador ClaR, un regulador específico de agrupación (CSRs) cuyo efecto sobre la expresión génica en *S. clavuligerus* es más amplio del previamente

descrito, estudios con micromatrices han revelado que el regulador RedZ, el cual modula la expresión de la agrupación de undecilprodigiosina de *S. coelicolor*, afecta también a la expresión de los genes de las agrupaciones de la actinorrodina, el antibiótico dependiente de calcio y el policétido de tipo I (Huang y col., 2005). De este modo, se muestra la habilidad de los reguladores localizados en una determinada agrupación génica para influir sobre la expresión tanto de los genes de su misma agrupación como de la de otras agrupaciones génicas, así como para modular el efecto de otros reguladores que pueden incluso tener un papel regulador de nivel superior, como en nuestro caso es el efecto de ClaR sobre el gen *ccaR*. Por lo tanto, la compleja red de interacciones funcionales que parece existir entre diferentes rutas biosintéticas en *Streptomyces* refuerza la necesidad de revisar el paradigma según el cual los reguladores de mayor jerarquía actúan sobre los reguladores específicos de ruta de metabolismo secundario en las especies de este género.

**Capítulo 4.3. El megaplásmido pSCL4 de *S. clavuligerus*:
efecto global en la expresión de genes del metabolismo
secundario y la diferenciación**

4.3.1. Introducción

La secuenciación del genoma de *S. clavuligerus* ha permitido identificar un total de 49 agrupaciones génicas de metabolismo secundario en esta especie, 24 de ellas cromosómicas, incluyendo la de tunicamicina (Chen y col., 2010), y 25 localizadas en el megaplásmido pSCL4 (Medema y col., 2010). Este es el mayor de los plásmidos de *S. clavuligerus* (1,8 Mb) y constituye un cuarto del total de su genoma. Sin embargo, es dispensable para la supervivencia del organismo, al menos en condiciones experimentales, aunque sí podría conferirle una gran ventaja ecológica (Medema y col., 2010; Álvarez-Álvarez y col., 2014a; apartado 1.2.1). Este megaplásmido tiene un importante papel en la producción de metabolitos secundarios conocidos, como la holomicina, cuya agrupación génica se localiza en el cromosoma (Li y Walsh, 2010; Huang y col., 2011) y podría estar reprimida en presencia del megaplásmido, así como en la diferenciación morfológica en esta especie (Álvarez-Álvarez y col., 2014a).

Por ello, con el objetivo de profundizar en el conocimiento del efecto de pSCL4, el presente capítulo se centra en el análisis transcriptómico de la cepa carente del megaplásmido, *S. clavuligerus* pSCL4⁻, comparándola con la cepa silvestre, *S. clavuligerus* ATCC 27064, y aborda el efecto de la ausencia de pSCL4 sobre las agrupaciones génicas cromosómicas de metabolitos secundarios, genes reguladores y con funciones diversas en la célula.

4.3.2. Obtención del mutante *S. clavuligerus* pSCL4⁻

S. clavuligerus pSCL4⁻ (Álvarez-Álvarez y col., 2014a) se obtuvo a partir *S. clavuligerus* ATCC 27064 por sustitución de los genes *parA-parB* del megaplásmido pSCL4 por un casete de apramicina mediante la técnica de ReDirect[®]. Esta mutación sólo afecta a la segregación del megaplásmido, por lo que el número de copias de los plásmidos pSCL1 y pSCL2 es similar al de la cepa parental (Álvarez-Álvarez y col., 2014a). Como se ha descrito y se detallará a continuación, la delección de pSCL4 altera el metabolismo secundario y el desarrollo del micelio aéreo (Álvarez-Álvarez y col., 2014a, apartados siguientes).

4.3.3. Análisis de la producción de antibióticos en *S. clavuligerus* pSCL4⁻

Las cepas *S. clavuligerus* pSCL4⁻ y *S. clavuligerus* fueron cultivadas en medio SA con dos matraces por cada cepa (réplicas biológicas) y se tomaron muestras a las 22,5; 36; 46,5; 60 y 71,5 horas. Los sobrenadantes fueron analizados por bioensayo para cuantificar la producción de ácido clavulánico, cefamicina C y holomicina (figura 4.40) y corroborar lo descrito por Álvarez-Álvarez y col. (2014a).

En relación a la producción de ácido clavulánico por parte de *S. clavuligerus* pSCL4⁻ se observó su disminución hasta un 55 % respecto al máximo de producción de la cepa parental (a las 36 horas). El nivel máximo de producción de holomicina se registró a las 71,5 horas en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ y fue de 885 µg/mg de ADN, mientras que la cepa silvestre no produjo este metabolito. La falta del megaplásmido en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ apenas afectó a la producción final de cefamicina C (figura 4.40). Estos resultados coinciden con los publicados por Álvarez-Álvarez y col. (2014a).

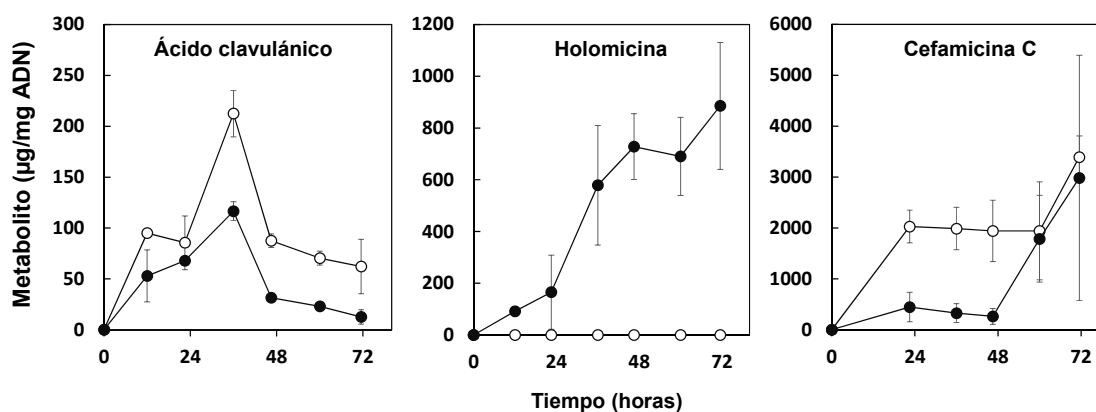


Figura 4.40. Producción específica de ácido clavulánico, holomicina y cefamicina C en medio SA por *S. clavuligerus* (círculos blancos) y *S. clavuligerus* pSCL4⁻ (círculos negros). La desviación estándar de cada punto se representa mediante líneas verticales.

4.3.4. Análisis de la expresión global en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ mediante micromatrices en comparación con la cepa silvestre

El diseño de las micromatrices empleadas, la toma de muestra del ARN de las cepas *S. clavuligerus* pSCL4⁻ y silvestre, el marcaje de los ácidos nucleicos, la hibridación de los mismos, el lavado y la lectura de las micromatrices, así como la normalización y el análisis de los datos obtenidos se describe en el apartado 4.2.6.

Los valores de transcripción M_g de las seis condiciones experimentales, dos cepas y tres tiempos, se compararon utilizando tres contrastes: la cepa mutante, *S. clavuligerus* pSCL4⁻ frente a la cepa control, *S. clavuligerus*, en los tres tiempos de estudio (22,5; 46,5 y 60 horas). Para cada gen, se calcularon los valores p BH-correctados y los valores M_c (tres grupos de valores, uno para cada contraste). Como se indicó en el apartado 4.2.6, un valor de M_c igual a +1 indica que un determinado gen se está transcribiendo dos veces más en el mutante, o cepa de estudio, que el mismo gen en el control, y un valor M_c negativo equivale a una disminución del nivel de

transcrito del gen en la cepa de estudio respecto al control. Para cada contraste, un resultado fue considerado como estadísticamente significativo si el valor p BH-correctado era $\leq 0,05$. Los datos de las micromatrices obtenidos en este estudio de expresión diferencial entre *S. clavuligerus* pSCL4⁻ y *S. clavuligerus* serán próximamente depositados en la base de datos *National Center for Biotechnology Information-Gene Expression Omnibus*.

Con el objetivo de restringir los datos analizados a aquellos transcritos que se vieron significativamente afectados por la ausencia del megaplásmido, los resultados se filtraron aplicando el criterio $M_c \geq 1,0$ (genes sobreexpresados) o $M_c \leq -1,0$ (genes subexpresados) y un valor p BH-correctado $\leq 0,05$ para los tres tiempos del análisis. De este modo, 210 genes se activaron y 467 se reprimieron en el mutante *S. clavuligerus* pSCL4⁻ respecto de la cepa silvestre en los tres tiempos analizados (figura 4.41).

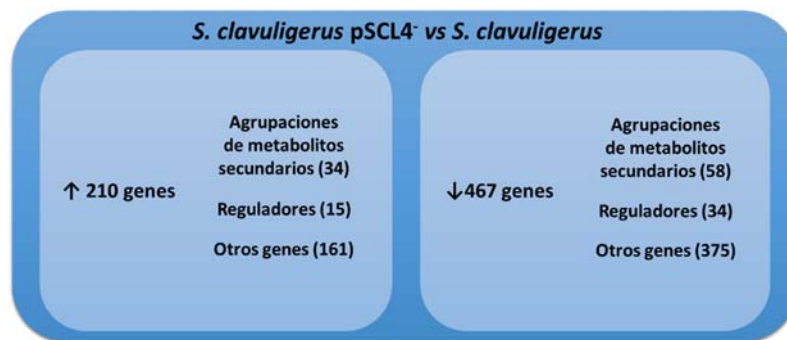


Figura 4.41. Esquema de los genes diferencial y significativamente expresados en la comparación de *S. clavuligerus* pSCL4⁻ con *S. clavuligerus*. Número de genes sobreexpresados (panel izquierdo, flecha hacia arriba) y subexpresados (panel derecho, flecha hacia abajo). Se indica el número de genes afectados pertenecientes a las agrupaciones génicas de metabolismo secundario, al grupo de reguladores o con funciones diversas en la célula.

En la figura 4.41 se indica el número de genes significativamente afectados que, o bien pertenecen a alguna de las agrupaciones cromosómicas de metabolitos secundarios, o bien presentan una función reguladora o diversa en la célula. Sin embargo, además de estos genes de transcripción diferencial significativa, y para evaluar la expresión global de las 24 agrupaciones génicas cromosómicas de metabolitos secundarios y de otros operones, también se analizaron aquellos genes con expresión diferencial sólo en alguno de los tres tiempos de muestreo y sin considerar el valor p BH-correctado. El nivel de significación, p BH-correctado, así como los valores M_c y el cambio de expresión en número de veces para cada gen comentado en el presente apartado, se indican en el anexo, tabla 7.7, para los genes de agrupaciones de metabolitos secundarios, y tablas 7.8, 7.9 y 7.10 para los genes reguladores, del regulón RpoE y de diferenciación morfológica, respectivamente. El cambio de expresión de los genes descritos

en este capítulo es indicado siempre mostrando el valor en el mutante *S. clavuligerus* pSCL4⁻ respecto a la cepa parental o silvestre a las 46,5 horas, a no ser que se indique otro de los tiempos analizados.

4.3.4.1. Transcripción diferencial de las agrupaciones génicas de ácido clavulánico y clavamas

Los genes de la agrupación de ácido clavulánico presentaron una subexpresión media de 0,54 veces (figura 4.42), resultado coherente con la reducción a la mitad de la producción de este inhibidor de β-lactamasas debido a la ausencia del megaplásmido pSCL4 (figura 4.40). El menor grado de represión correspondió a los genes para las etapas tempranas de la ruta (*ceaS2*, *bls2*, *pah2*, *cas2*) (entre 0,3 y 1,2 veces), mientras que los genes para las etapas tardías de biosíntesis de ácido clavulánico (*gcaS*, *orf16*, *orf14*, *orf13*, *orf12*, *cyp-fd*, *car*), y *oppA1* y *oppA2*, que codifican dos oligopéptido permeasas (Lorenzana y col., 2004), presentaron un bajo nivel de expresión, entre 0,28 y 0,45 veces (*orf14* y *fd*, respectivamente) (figura 4.42).

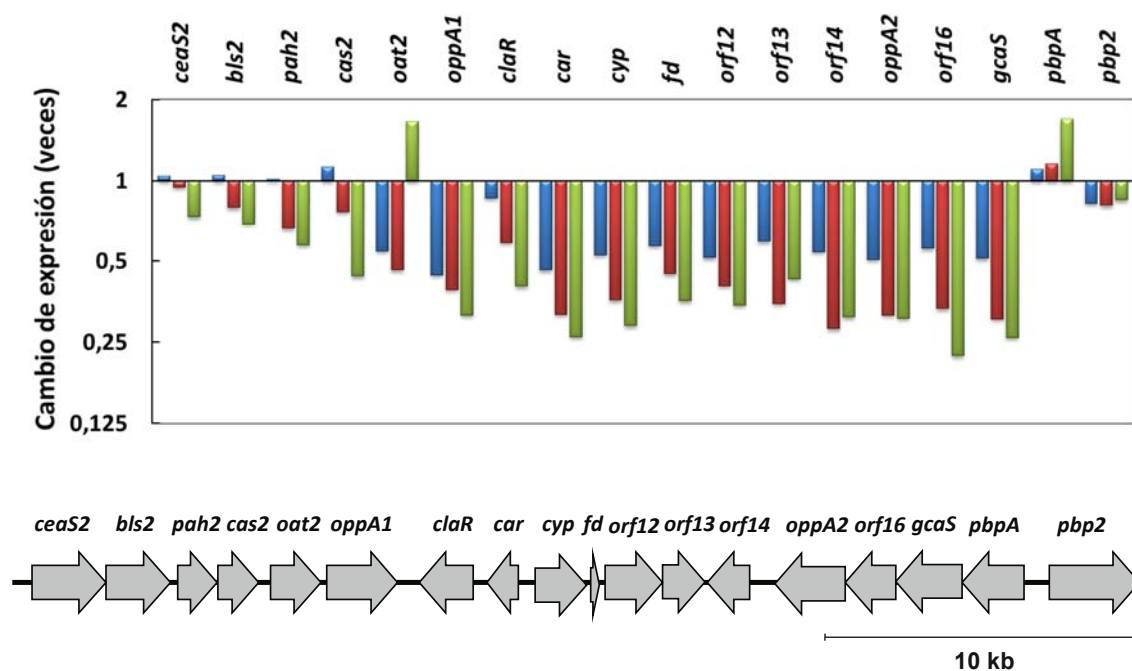


Figura 4.42. Efecto de la ausencia de pSCL4 en la transcripción de los genes de la agrupación del ácido clavulánico en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ comparada con *S. clavuligerus*. Las barras representan la media de los niveles de expresión relativa (escala logarítmica en base 2) a las 22,5 horas (barras azules), 46,5 horas (barras rojas) y 60 horas (barras verdes). El nombre o código SCLAV del gen correspondiente se indica en la parte superior de las barras. Cada valor se compara con el correspondiente en la cepa control, *S. clavuligerus*, tomado como valor 1. En la parte inferior de la figura se indica la organización de la agrupación génica del ácido clavulánico en *S. clavuligerus*.

La agrupación génica de las clavamas (SCLAV_2921 a SCLAV_2935) se vio afectada por la ausencia de pSCL4, aunque no de manera uniforme entre los diferentes genes ni en los diferentes tiempos (figura 4.43). Entre los genes sobreexpresados se encontraron *cvm7*, *cvm11*, *cvm12*, *cvmH* y *cvmP*, con valores de 1,5 (*cvm11*) y 2,9 (*cvm7*) veces, y entre los subexpresados *cvm9*, *cvm1*, *cvm2* y *cvm13*, con valores de 0,3 (*cvm2*) y 0,6 (*cvm1*) veces (figura 4.43).

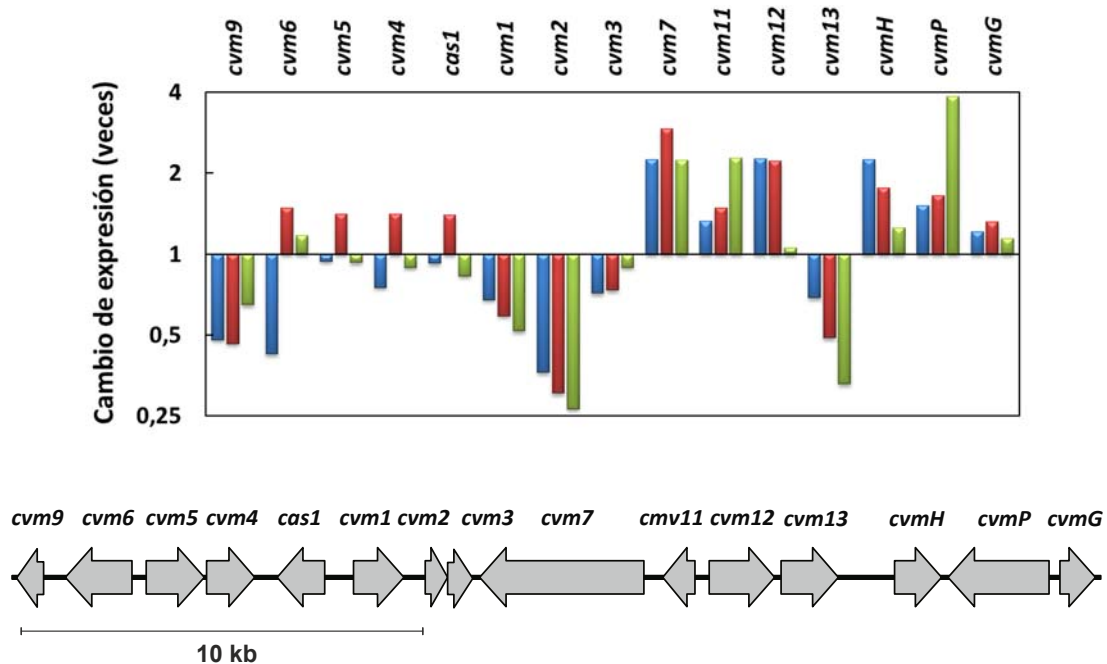


Figura 4.43. Efecto de la ausencia de pSCL4 en la transcripción de los genes de la agrupación de clavamas en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ comparada con *S. clavuligerus*. Ver el pie de la figura 4.42. En la parte inferior de la figura se indica la organización de la agrupación génica de clavamas en *S. clavuligerus*.

4.3.4.2. Transcripción diferencial de la agrupación génica de la cefamicina C

Todos los genes de la agrupación génica de la cefamicina C se vieron reprimidos en los tres tiempos de análisis, con una subexpresión media de 0,4 veces a las 46,5 horas (figura 4.44). Sin embargo, los valores de expresión (M_g) fueron positivos o próximos a cero, siguiendo el mismo perfil de transcripción descendente que los genes de la cepa silvestre (no mostrado). Esto concuerda con una curva de producción de cefamicina C paralela entre ambas cepas, pero retardada y disminuida en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ respecto de la cepa parental (figura 4.40).

Con respecto a los genes de resistencia de esta agrupación, la expresión de *pbp74* no se modificó en los dos primeros tiempos, aunque aumentó 1,7 veces a las 60 horas, y los genes *blp* y *pcbR* se vieron ligeramente subexpresados (0,7 y 0,6 veces, respectivamente; figura 4.44). La ligera reducción en la transcripción de los genes presuntamente implicados en la resistencia a

antibióticos β -lactámicos *pbp2* y *pcbR* (figuras 4.42 y 4.44, respectivamente) puede correlacionarse con la disminución de la producción de cefamicina C al 40 % en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ (figura 4.40).

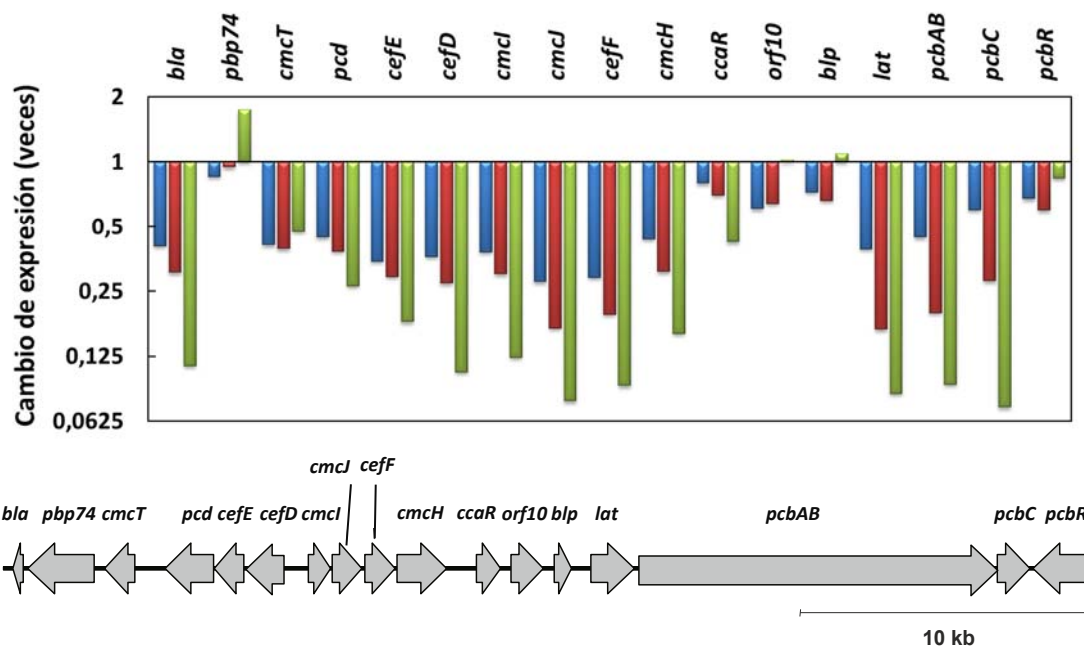


Figura 4.44. Efecto de la ausencia de pSCL4 en la transcripción de los genes de la agrupación de cefamicina C en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ comparada con *S. clavuligerus*. Ver el pie de la figura 4.42. En la parte inferior de la figura se indica la organización de la agrupación génica de la cefamicina C en *S. clavuligerus*.

4.3.4.3. Transcripción diferencial de la agrupación génica de la holomicina

La eliminación del megaplásmido en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ provocó un aumento de la transcripción de todos los genes *hlm*, aunque a diferente nivel en los distintos genes de esta agrupación (figura 4.45). Así, el aumento de la expresión fue menor para *hlmK*, *hlmL* y *hlmM* (3,8 veces de media), mientras que los otros genes *hlm* tuvieron un mayor aumento de expresión (26 veces de media). La ausencia del megaplásmido pSCL4 resultó en una producción de holomicina de 675 μ g/mg de ADN a las 60 horas (figura 4.40), lo que parece coherente con la sobreexpresión de todos sus genes en los tres tiempos analizados y, especialmente, con la de *hlmH* (34 veces), que podría constituir un mecanismo alternativo de resistencia a holomicina (apartado 4.2.6.3), y de *hlmI* (44 veces), implicado en la ciclación de segundo anillo de la holomicina (Li y Walsh, 2011), de manera similar a lo que ocurre en el mutante productor de holomicina *S. clavuligerus* *clAR::aac* (Martínez-Burgo y col., 2015). La activación de esta agrupación podría deberse a la ausencia de un represor codificado en el megaplásmido, como

describen Álvarez-Álvarez y col. (2014a) para el aumento de la producción de holomicina en este mutante.

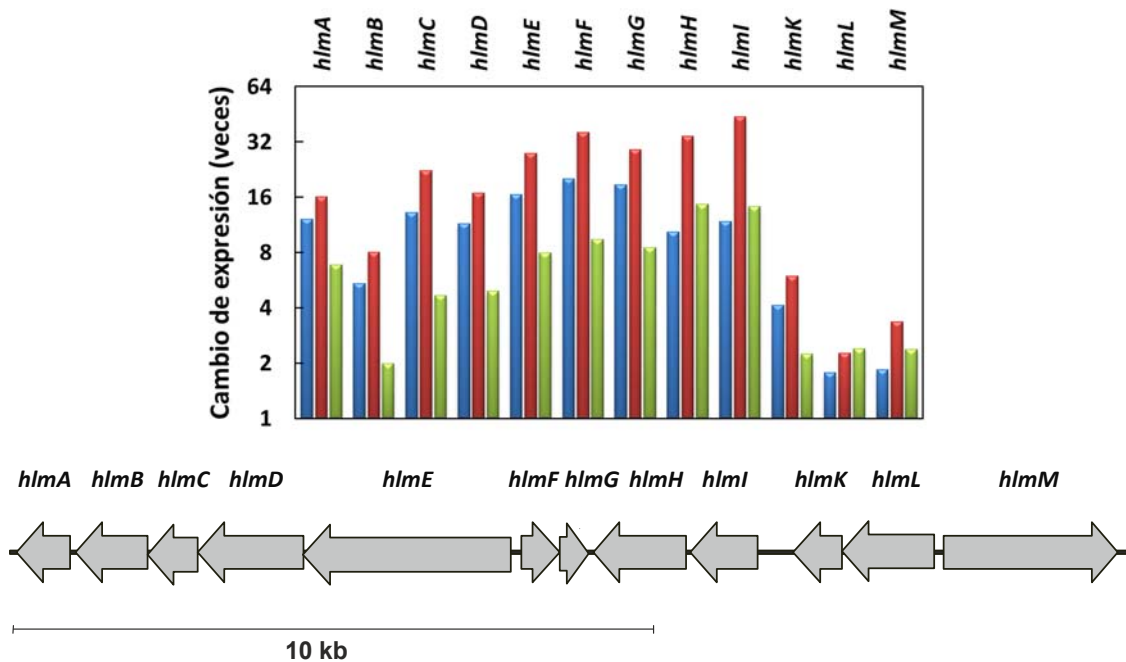


Figura 4.45. Efecto de la ausencia de pSCL4 en la transcripción de los genes de la agrupación de holomicina en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ comparada con *S. clavuligerus*. Ver el pie de la figura 4.42. En la parte inferior de la figura se indica la organización de la agrupación génica de la holomicina en *S. clavuligerus*.

4.3.4.4. Otras agrupaciones génicas de metabolitos secundarios afectadas por la eliminación de pSCL4

La eliminación de pSCL4 supone la ausencia de 25 agrupaciones génicas para metabolitos secundarios en *S. clavuligerus* pSCL4⁻. De las 24 agrupaciones cromosómicas, una vez analizadas SMC9, SMC10, SMC11 y SMC18, que codifican la biosíntesis de clavamas, ácido clavulánico, cefamicina C y holomicina, respectivamente, se procedió a estudiar el efecto de la ausencia del megaplásmido en la expresión génica de las 19 agrupaciones restantes descritas por Medema y col. (2010), de la de tunicamicina (Chen y col., 2010) y de los genes para biosíntesis de naringenina (Álvarez-Álvarez y col. 2015; tabla 4.3).

Cromosoma		
Agrupación	Genes	Producto
Medema y col., 2010		
SMC1	SCLAV_0001-0026	Macrólido PKS tipo I
SMC2	SCLAV_0082-0105	No identificado
SMC3	SCLAV_0148-0152	Sideróforo
SMC4	SCLAV_0153-0172	Terpeno sintasa
SMC5	SCLAV_0446-0497	PKS tipo I
SMC6	SCLAV_1942-1955	Sideróforo
SMC7	SCLAV_2274-2302	NRPS
SMC8	SCLAV_2456-2469	Lantibiótico
SMC9	SCLAV_2920-2935	Clavamas
SMC10	SCLAV_4178-4197	Ácido clavulánico
SMC11	SCLAV_4198-4217	Cefamicina C
SMC12	SCLAV_4387-4392	Lantibiótico
SMC13	SCLAV_4460-4486	PKS-NRPS
SMC14	SCLAV_4740-4758	NRPS
SMC15	SCLAV_4911-4921	PKS tipo II
SMC16	SCLAV_5142-5148	NRPS
SMC17	SCLAV_5227-5255	Fitoeno/escualeno
SMC18	SCLAV_5267-5278	Holomicina
SMC19	SCLAV_5325-5347	NRPS
SMC20	SCLAV_5463-5497	PKS tipo III
SMC21	SCLAV_5608-5638	PKS-NRPS
SMC22	SCLAV_5670-5674	Terpeno sintasa
SMC23	SCLAV_5702-5710	Sideróforo
Álvarez-Álvarez y col., 2015		
	SCLAV_5491-5492, 5472	Naringenina
Chen y col., 2010		
Tunicamicina	SCLAV_4276-4287	Tunicamicina

Tabla 4.3. Agrupaciones génicas cromosómicas para metabolitos secundarios. Se indica el nombre de la agrupación génica, los genes que incluye y el tipo de compuesto o producto génico codificado. (Modificado de Medema y col., 2010).

De las 20 agrupaciones génicas a analizar en el presente apartado, 16 vieron afectados el nivel de transcripción ($M_c \geq 1,0$ o $M_c \leq -1,0$) de más de la mitad de sus genes en alguno de los tres tiempos de muestreo debido a la eliminación del megaplásmido pSCL4. Estas agrupaciones fueron SMC1, SMC2, SMC3, SMC4, SMC5, SMC6, SMC7, SMC8, SMC12, SMC13, SMC19, SMC20, SMC21, SMC22, SMC23 y la de tunicamicina. Los productos de estas SMC no han sido aún caracterizados. Como ya se indicó anteriormente en el apartado 4.3.4, en la tabla 7.7 del anexo se indican los valores de cambio de expresión para cada gen de estas agrupaciones, así como los valores M_c y p BH-correctado, en los tres tiempos analizados.

4.3.4.4.1. Agrupación SMC1

En esta agrupación los genes SCLAV_0011-SCLAV_0015 codifican cinco policétido sintasas (PKSs) de tipo I o modulares, que suponen un total de 11 módulos, implicadas en la biosíntesis de un macrólido similar al tacrolimus (Medema y col., 2010). Los genes SCLAV_0001-SCLAV_0004, SCLAV_0006-SCLAV_0011, SCLAV_0016, SCLAV_0018, SCLAV_0023, se expresaron entre 0,09 y 0,5 veces (figura 4.46). De estos, SCLAV_0007-SCLAV_0010 están implicados en la biosíntesis del metoximalonato, posible unidad extendedora en la biosíntesis del producto final de tipo macrólido, mientras SCLAV_0006 y SCLAV_0018 codifican una O-metiltransferasa y un citocromo P450, respectivamente, que podrían llevar a cabo modificaciones sobre el compuesto producido con posterioridad a la síntesis de la cadena policetídica. Curiosamente, el bloque de genes SCLAV_0012-SCLAV_0015, que codifican cuatro de las cinco PKSs, presentó una expresión media 26 veces superior en el mutante pSCL4⁻ (figura 4.46), lo que parece indicar una regulación diferente de estos cuatro genes respecto al resto de la agrupación. Sin embargo, SCLAV_0011, contiguo a este bloque de genes de PKSs y que codifica la quinta PKS, mostró un nivel de subexpresión de 0,2 veces (figura 4.46).

Las secuencias aminoacídicas codificadas por los cuatro genes SCLAV_0007 a SCLAV_0010 presentan entre un 40 y un 65 % de identidad con las codificadas por *fkbH*, *fkbl*, *fkblj* y *fkblK*, respectivamente, de la agrupación biosintética del tacrolimus en *S. tsukubaensis*, (Chen y col., 2012; Barreiro y col., 2012), y están implicados en la biosíntesis de la unidad extendedora metoximalonil-ACP. Además, la secuencia de aminoácidos de la O-metiltransferasa codificada por SCLAV_0006 tiene un 59 % de identidad con la de la hidroximalonil-ACP O-metiltransferasa codificada por *fkblG* en *S. tsukubaensis* (Chen y col., 2012; Barreiro y col., 2012). Los genes *fkblGHIJK* de *S. tsukubaensis* y SCLAV_0006-SCLAV_0010 presentan la misma organización, por lo que probablemente tienen un origen evolutivo común. La biosíntesis de tacrolimus ha sido descrita en *S. clavuligerus* CKD 1119 y *S. clavuligerus* KCTC 10561BP (Kim y Park., 2007; Park y col., 2009), pero no en la cepa ATCC 27064. Aunque Medema y col., (2010) no afirman que el producto sintetizado por esta agrupación sea realmente tacrolimus, si así fuese, la localización de estos genes en el extremo del cromosoma podría ser causa de su inestabilidad en las distintas cepas de *S. clavuligerus*.

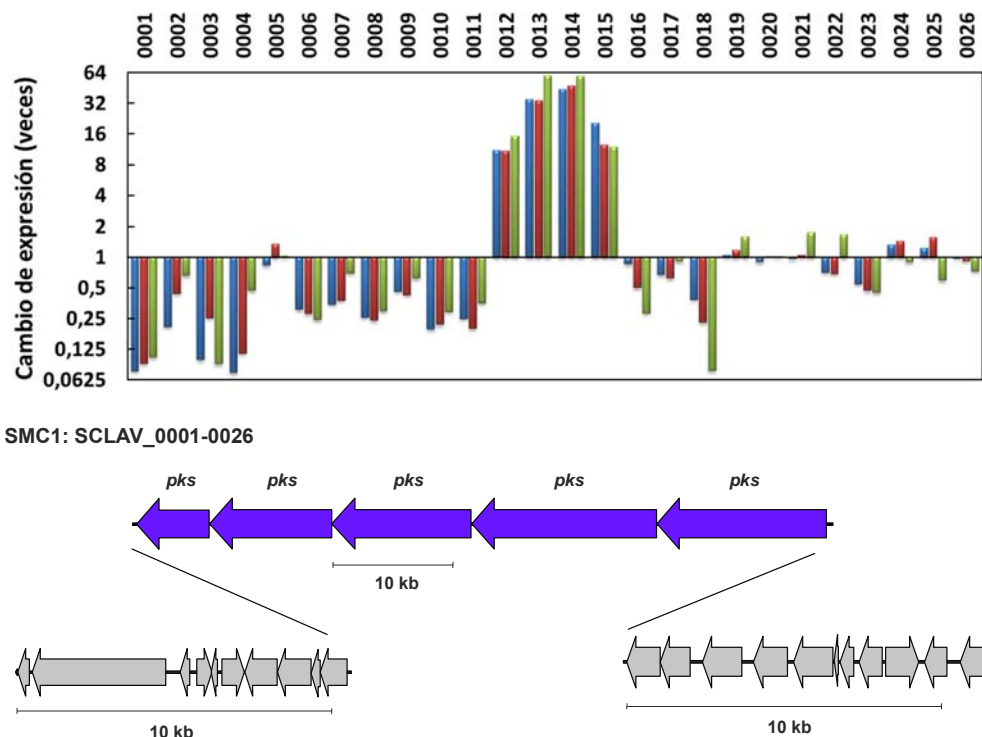


Figura 4.46. Efecto de la ausencia de pSCL4 en la transcripción de los genes de la agrupación SMC1 en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ comparada con *S. clavuligerus*. Para simplificar la figura, la denominación de los genes se abrevió usando los dígitos sin SCLAV. Ver el pie de la figura 4.42. En la parte inferior de la figura se indica la organización de la agrupación génica SMC1 en *S. clavuligerus* con los genes que codifican las PKSs resaltados en color azul (modificado de Medema y col., 2010).

4.3.4.4.2. Agrupación SMC2

En esta agrupación, implicada en la biosíntesis de un metabolito secundario cuya naturaleza aún no ha sido descrita (Medema y col., 2010), los genes SCLAV_0082, SCLAV_0085-SCLAV_0088, SCLAV_0090, SCLAV_0095-SCLAV_0097, SCLAV_0100, SCLAV_0104 se sobreexpresaron entre 1,4 y 5,4 veces, mientras que los genes SCLAV_0083, SCLAV_0089, SCLAV_0091-SCLAV_0094, y SCLAV_0102 se subexpresaron entre 0,2 y 0,7 veces, siendo el más afectado SCLAV_0091, que codifica un citocromo P450 (figura 4.47) y cuya represión podría estar contribuyendo al estrés oxidativo experimentado por la célula, como se verá a continuación en el apartado 4.3.4.6.

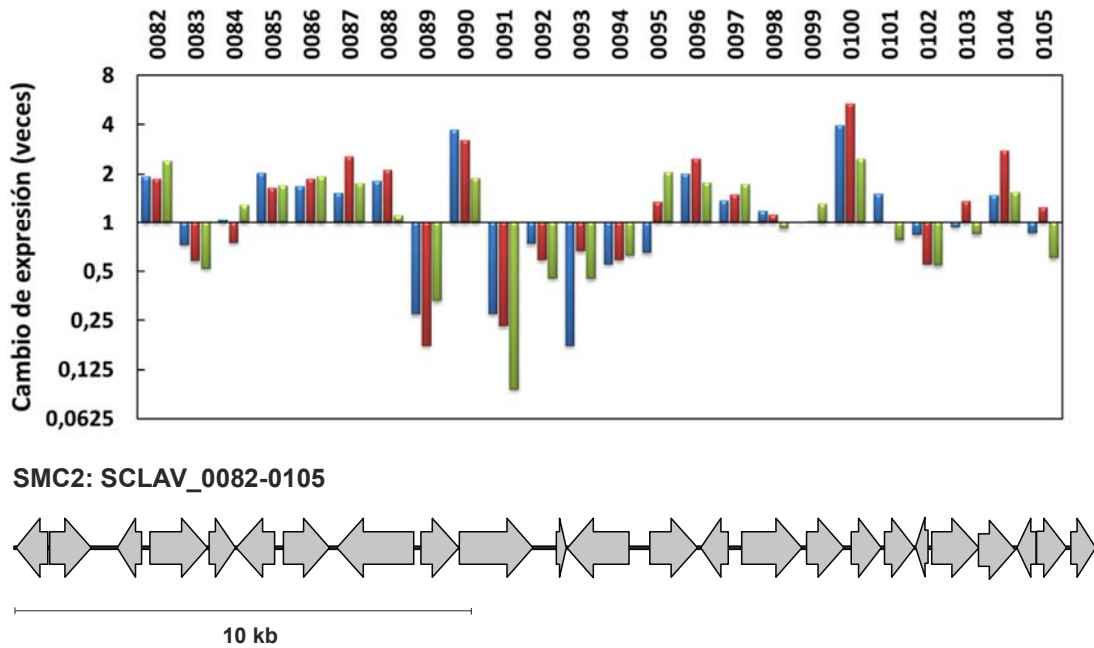


Figura 4.47. Efecto de la ausencia de pSCL4 en la transcripción de los genes de la agrupación SMC2 en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ comparada con *S. clavuligerus*. Para simplificar la figura, la denominación de los genes se abrevió usando los dígitos sin SCLAV. Ver el pie de la figura 4.42. En la parte inferior de la figura se indica la organización de la agrupación génica SMC2 en *S. clavuligerus* (modificado de Medema y col., 2010).

4.3.4.4.3. Agrupación SMC3

Esta agrupación podría codificar la biosíntesis de un sideróforo (Medema y col., 2010). En ella, los genes SCLAV_0149-SCLAV_0152 se subexpresaron a las 22,5 y 46,5 horas (entre 0,3 y 0,6 veces a las 46,5 horas), mientras que SCLAV_0148, que codifica una acetiltransferasa, se sobreexpresó en los tres tiempos analizados, hasta 3 veces a las 60 horas (figura 4.48).

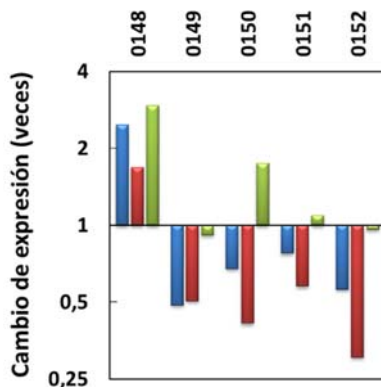
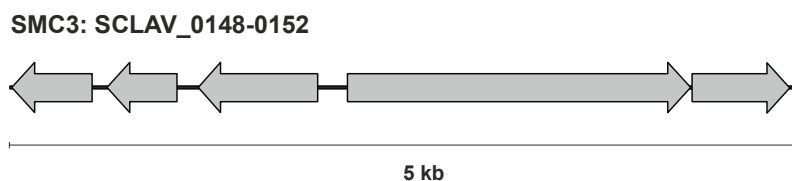
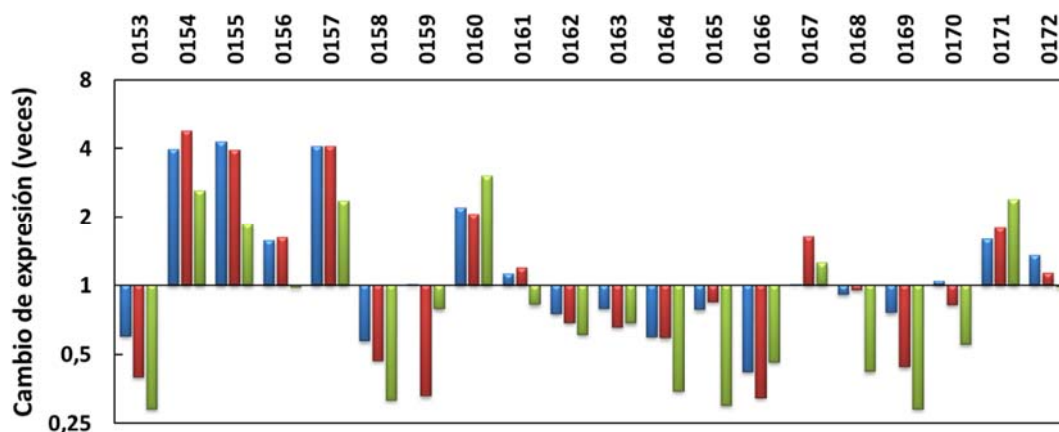


Figura 4.48. Efecto de la ausencia de pSCL4 en la transcripción de los genes de la agrupación SMC3 en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ comparada con *S. clavuligerus*. Para simplificar la figura, la denominación de los genes se abrevió usando los dígitos sin SCLAV. Ver el pie de la figura 4.42. En la parte inferior de la figura se indica la organización de la agrupación génica SMC3 en *S. clavuligerus* (modificado de Medema y col., 2010).



4.3.4.4.4. Agrupación SMC4

Esta agrupación está presuntamente implicada en la biosíntesis de un terpeno, dado que SCLAV_0159 codifica una enzima similar a una germacradienol sintasa (Medema y col., 2010). Su homólogo en *S. coelicolor*, SCO6073, codifica una germacradienol-geosmina sintasa, que cataliza la transformación de farnesil difosfato a germacradienol y de este a geosmina (Jiang y col., 2006). La producción de geosmina se ha detectado en *S. coelicolor* A3(2), pero no en *S. clavuligerus* ATCC 27064 en diferentes condiciones de cultivo (Yamada y col., 2015). En esta agrupación, los genes SCLAV_0154-SCLAV_0157, SCLAV_0160, SCLAV_0167, SCLAV_0171 se sobreexpresaron entre 1,6 y 4,8 veces, mientras que SCLAV_0153, SCLAV_0158, SCLAV_0162-SCLAV_0166, SCLAV_0168-SCLAV_0170 se subexpresaron entre 0,3 y 0,7 veces a las 60 horas, y SCLAV_0159, que codifica la posible germacradienol sintasa, lo hizo 0,3 veces a las 46,5 horas (figura 4.49).



SMC4: SCLAV_0153-0172

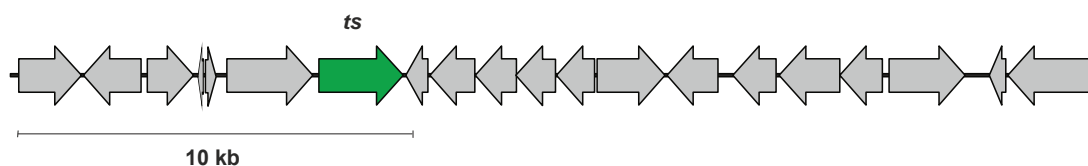


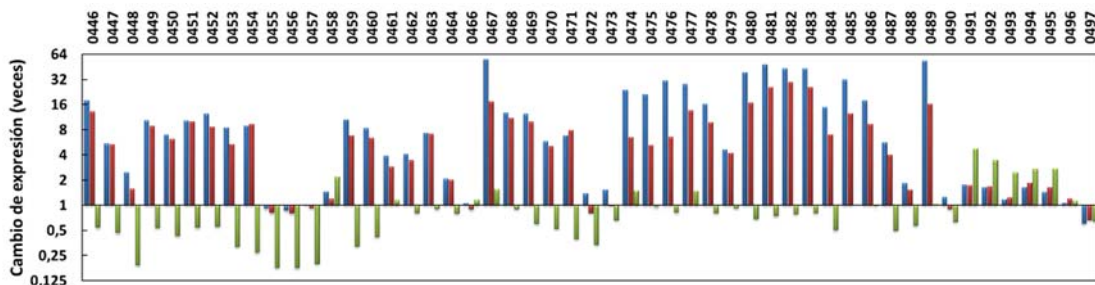
Figura 4.49. Efecto de la ausencia de pSCL4 en la transcripción de los genes de la agrupación SMC4 en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ comparada con *S. clavuligerus*. Para simplificar la figura, la denominación de los genes se abrevió usando los dígitos sin SCLAV. Ver el pie de la figura 4.42. En la parte inferior de la figura se indica la organización de la agrupación génica SMC4 en *S. clavuligerus* con el gen que codifica las terpeno sintasa resaltado en color verde (modificado de Medema y col., 2010).

4.3.4.4.5. Agrupación SMC5

Esta agrupación podría codificar la biosíntesis de un policétido ya que presenta una policétido sintasa (PKS) de tipo I codificada por SCLAV_0453 (Medema y col., 2010). La ausencia del

megaplásmido en *S. clavuligerus* provocó una sobreexpresión media de 15 y 8 veces a las 22,5 y 46,5 horas, respectivamente, de 42 de los 51 genes que constituyen la agrupación. Sin embargo, a las 60 horas, se observó un descenso del nivel de transcripción entre 0,2 y 0,7 veces en los genes SCLAV_0446-SCLAV_0457, SCLAV_0459, SCLAV_0460, SCLAV_0469-SCLAV_0473, SCLAV_0484, SCLAV_0487, SCLAV_0488, SCLAV_0490, SCLAV_0497 (figura 4.50).

Entre los genes de esta agrupación, SCLAV_0474 y SCLAV_0475, sobreexpresados más de 20 veces a las 22,5 horas, codifican dos proteínas para la biosíntesis de goadsporina, un polipéptido de 19 aminoácidos (Igarashi y col., 2001) que a bajas concentraciones promueve el metabolismo secundario y la morfogénesis en estreptomicetos. Así, el caldo de cultivo de *Streptomyces* sp. TP-A0584, organismo productor de goadsporina, favorece la formación de un pigmento rojo y la esporulación en *S. lividans* (Onaka y col., 2001). Por otro lado, dos de los cuatro genes que en *S. clavuligerus* codifican proteínas de tipo ScbA/AfsA implicadas en la biosíntesis de γ -butirolactonas (apartado 1.2.1.2), SCLAV_0463 y SCLAV_0471, pertenecen a esta agrupación (Medema y col., 2010) y, al igual que la mayoría de los genes que las rodean, se sobreexpresaron entre 7 y 8 veces a las 22,5 y 46,5 horas, por lo que, como sugieren Medema y col. (2010), esta agrupación podría estar regulada por señalización mediante γ -butirolactonas (figura 4.50).



SMC5: SCLAV_0446-0497

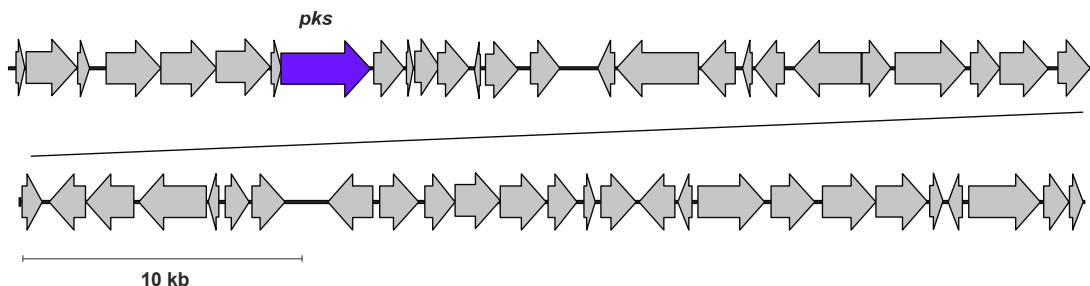
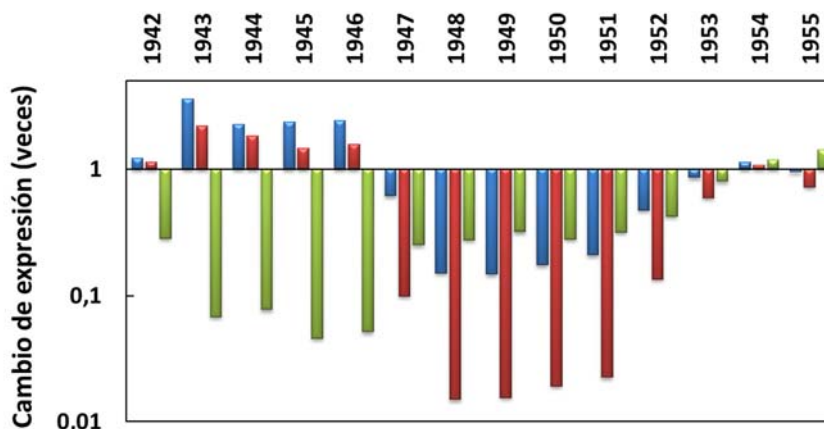


Figura 4.50. Efecto de la ausencia de pSCL4 en la transcripción de los genes de la agrupación SMC5 en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ comparada con *S. clavuligerus*. Para simplificar la figura, la denominación de los genes se abrevió usando los dígitos sin SCLAV. Ver el pie de la figura 4.42. En la parte inferior de la figura se indica la organización de la agrupación génica SMC5 en *S. clavuligerus* con el gen que codifica la PKS resaltado en color azul (modificado de Medema y col., 2010).

4.3.4.4.6. Agrupación SMC6

Esta agrupación, que comprende los genes SCLAV_1942-SCLAV_1955, parece codificar la biosíntesis de un sideróforo (Medema y col., 2010). Además, los genes SCLAV_1948-SCLAV_1951 son ortólogos de *desABCD* los cuales constituyen la agrupación génica de la nocardamina o desferroxiamina E de *S. coelicolor* (Barona-Gómez y col., 2004). Los bloques de genes SCLAV_1942-SCLAV_1946 y SCLAV_1947-SCLAV_1952 presentaron un diferente patrón de transcripción con una notable subexpresión a las 60 horas (entre 0,05 y 0,3 veces) y 46,5 horas (entre 0,01 y 0,1 veces), respectivamente (figura 4.51). Entre estos genes cabe señalar que SCLAV_1947 codifica una proteína de interacción con sideróforos. Los genes SCLAV_1953, SCLAV_1954 y SCLAV_1955 no vieron afectado su nivel de transcripción debido a la ausencia del megaplásmido (figura 4.51).



SMC6: SCLAV_1942-1955

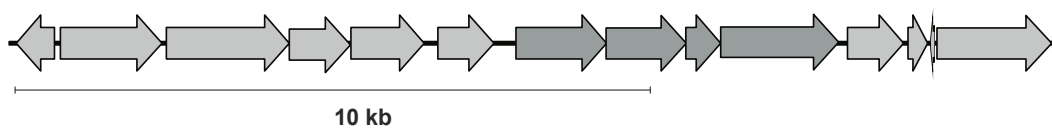


Figura 4.51. Efecto de la ausencia de pSCL4 en la transcripción de los genes de la agrupación SMC6 en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ comparada con *S. clavuligerus*. Para simplificar la figura, la denominación de los genes se abrevió usando los dígitos sin SCLAV. Ver el pie de la figura 4.42. En la parte inferior de la figura se indica la organización de la agrupación génica SMC6 en *S. clavuligerus* (modificado de Medema y col., 2010). En gris oscuro se indican los cuatro genes ortólogos de los que constituyen la agrupación de nocardamina en *S. coelicolor* (Barona-Gómez y col., 2004).

4.3.4.4.7. Agrupación SMC7

Esta agrupación está presuntamente implicada en la biosíntesis de un compuesto peptídico ya que contiene el gen SCLAV_2281 para una sintetasa de péptido no ribosomal (Medema y col.,

2010). La ausencia del megaplásmido en el mutante pSCL4⁻ provocó la sobreexpresión, entre 3 y 21 veces, de los genes SCLAV_2278, SCLAV_2279, SCLAV_2281, que codifica la NRPS de la agrupación, SCLAV_2289, SCLAV_2290, SCLAV_2301 y SCLAV_2302, y la subexpresión, entre 0,07 y 0,5 veces a las 60 horas, de los genes SCLAV_2276, SCLAV_2282-SCLAV_2284, SCLAV_2288, SCLAV_2291-SCLAV_2293, SCLAV_2297-SCLAV_2300 (figura 4.52). Los genes SCLAV_2289 y SCLAV_2290, sobreexpresados 21 y 15 veces respectivamente, codifican dos proteínas hipotéticas. Entre estos genes afectados, cabe señalar que SCLAV_2300, ortólogo de SCO3158, codifica la proteína SsgE implicada en la separación autolítica de las esporas (Noens y col., 2005).

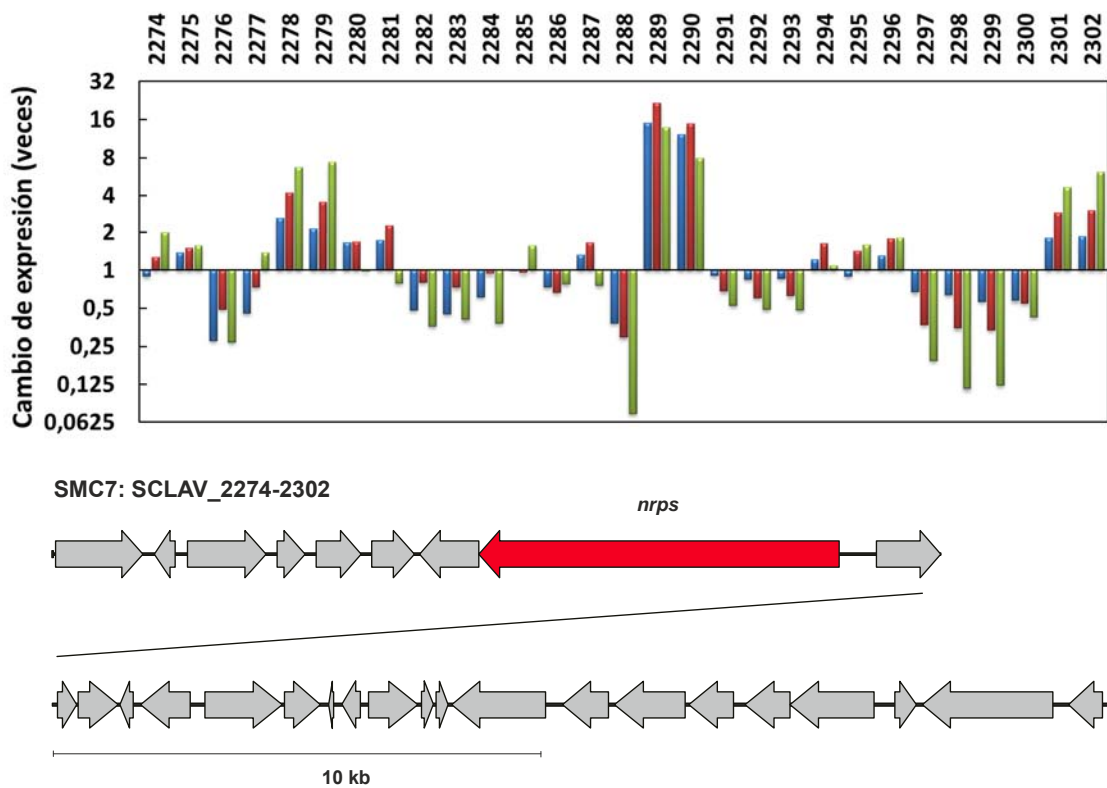


Figura 4.52. Efecto de la ausencia de pSCL4 en la transcripción de los genes de la agrupación SMC7 en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ comparada con *S. clavuligerus*. Para simplificar la figura, la denominación de los genes se abrevió usando los dígitos sin SCLAV. Ver el pie de la figura 4.42. En la parte inferior de la figura se indica la organización de la agrupación génica SMC7 en *S. clavuligerus* con el gen que codifica la NRPS resaltado en color rojo (modificado de Medema y col., 2010).

4.3.4.4.8. Agrupación SMC8

Esta agrupación podría codificar la biosíntesis de un lantibiótico, dada la presencia de los genes SCLAV_2466 y SCLAV_2467 (Medema y col., 2010; apartado 1.2.4.5.), ortólogos de *lanB* y *lanC* de *S. lividans*, que codifican, respectivamente, una proteína similar a una lantibiótico

deshidratasa y una proteína de la familia lantionina sintetasa C, ambas presuntamente implicadas en la biosíntesis de lantionina, un aminoácido precursor de los lantibióticos (Bierbaum y Sahl, 2009). Todos los genes de la agrupación se encontraron subexpresados entre 0,2 y 0,8 veces (figura 4.53), excepto SCLAV_2456. El análisis de esta agrupación con el programa *antiSMASH v.3.0.4*, mejorada para la predicción de lantipéptidos (Blin y col., 2014; Weber y col., 2015), indica, en la secuencia aminoacídica de 77 residuos codificada por SCLAV_2465, un péptido señal de 54 residuos en el extremo amino y un péptido núcleo de 23 residuos en el extremo carboxilo que contiene dos deshidroalaninas (Dha), cuatro deshidrobutirinas (Dhb) y cuatro cisteínas (figura 4.53), aminoácidos que permiten la formación de los enlaces lantionina característicos de los lantipéptidos (apartado 1.2.4.5).

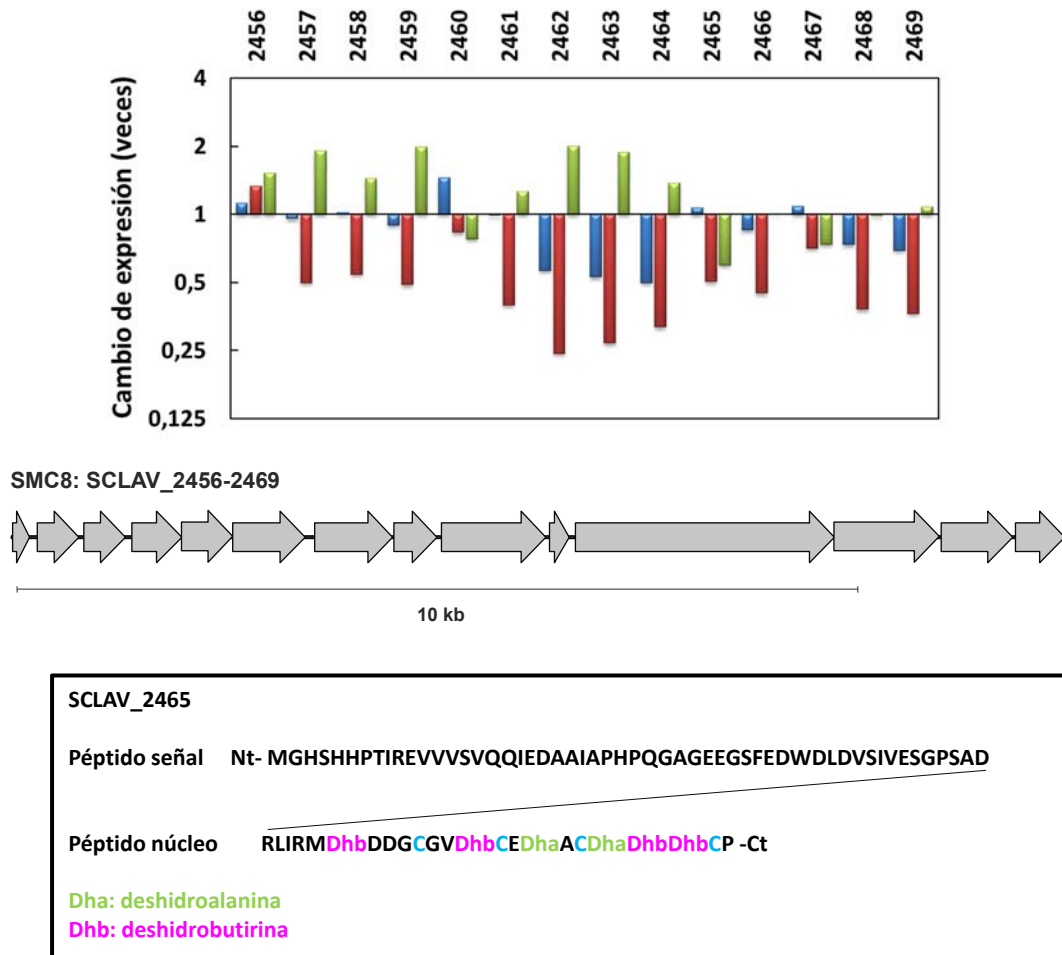


Figura 4.53. Efecto de la ausencia de pSCL4 en la transcripción de los genes de la agrupación SMC8 en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ comparada con *S. clavuligerus*. Para simplificar la figura, la denominación de los genes se abrevió usando los dígitos sin SCLAV. Ver el pie de la figura 4.42. En la parte inferior de la figura se muestra la organización de la agrupación génica SMC8 en *S. clavuligerus* (modificado de Medema y col., 2010) y la estructura primaria del péptido codificado por SCLAV_2465 donde se indican los residuos con modificaciones adicionales identificadas según la predicción de *antiSMASH*.

4.3.4.4.9. Agrupación de la tunicamicina

Localizados entre SMC11, de cefamicina C, y SMC12, los genes SCLAV_4276-SCLAV_4287 están implicados en las etapas biosintéticas tempranas y tardías de tunicamicina, así como en los mecanismos de resistencia y transporte (Chen y col., 2010; figura 4.54). Todos los genes de esta agrupación se encontraron sobreexpresados entre 6 y 25 veces en ausencia de pSCL4 (figura 4.54). Como se indicó en el apartado 1.2.4.1, Kenig y Reading (1979) descubrieron en *S. clavuligerus* la producción de la molécula MM19290, un compuesto de tipo tunicamicina. Este metabolito presenta un amplio espectro de actividades actuando frente bacterias Gram positivas, levaduras, hongos, e incluso frente a virus animales y vegetales (Takatsuki y col, 1971). Por ello, la activación de la agrupación de tunicamicina podría suponer una adaptación de *S. clavuligerus* pSCL4⁻ frente a la pérdida de sus agrupaciones de metabolismo secundario codificadas en el megaplásmido y a la subexpresión de una parte importante de las cromosomales, como veremos al final de este apartado.

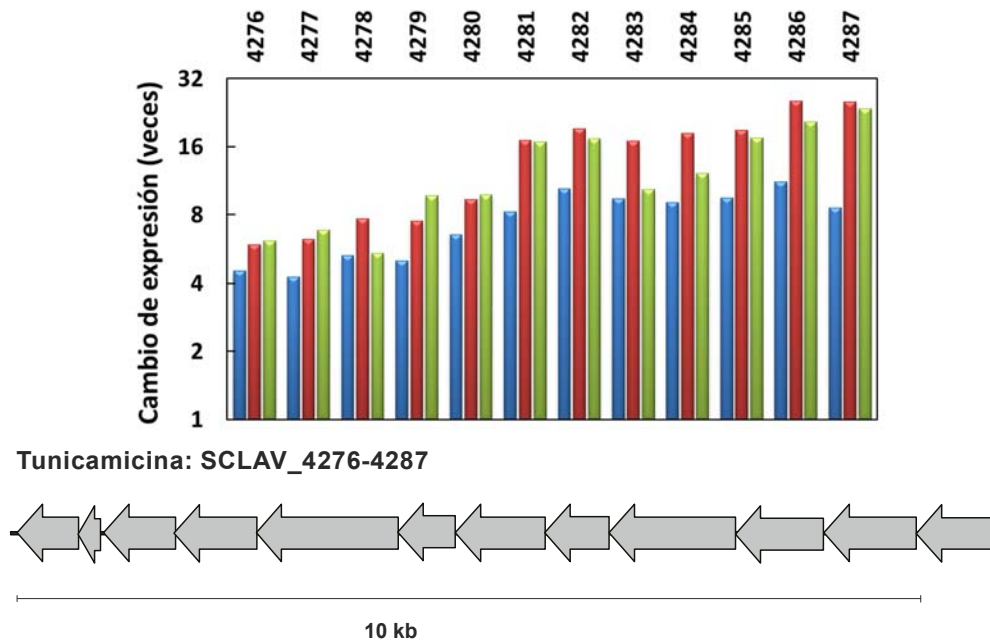


Figura 4.54. Efecto de la ausencia de pSCL4 en la transcripción de los genes de la agrupación de tunicamicina en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ comparada con *S. clavuligerus*. Para simplificar la figura, la denominación de los genes se abrevió usando los dígitos sin SCLAV. Ver el pie de la figura 4.42. En la parte inferior de la figura se indica la organización de la agrupación génica de tunicamicina en *S. clavuligerus* (modificado de Chen y col., 2010).

4.3.4.4.10. Agrupación SMC12

Esta agrupación y SMC8 están presuntamente implicadas en la biosíntesis de lantibióticos en *S. clavuligerus* (Medema y col., 2010; apartado 1.2.4.5). Todos los genes de esta agrupación se vieron reprimidos en los tres tiempos analizados, siendo el efecto más acusado a las 22,5 y 46,5 horas con una media de subexpresión de 0,4 veces en ambos tiempos. SCLAV_4389, que codifica un posible precursor de lantibiótico, fue fuertemente subexpresado en los tres tiempos analizados (entre 0,1 y 0,2 veces). Los genes SCLAV_4390, que codifica una proteína que contiene un dominio lantibiótico deshidratasa, y SCLAV_4391, para una proteína similar a una lantionina sintetasa C, se subexpresaron en torno a 0,5 veces a las 22,5 y 46,5 horas (figura 4.55). Estas dos proteínas presentan una similitud del 48,3 y 51,2 % con las codificadas por SCLAV_2466 y SCLAV_2467 de la agrupación SMC8, respectivamente. El análisis de esta agrupación con el programa *antiSMASH v.3.0.4*, mejorada para la predicción de lantipéptidos (Blin y col., 2014; Weber y col., 2015), indica en la secuencia aminoacídica de 64 residuos codificada por SCLAV_4389, un péptido señal de 34 residuos en el extremo amino y un péptido núcleo de 30 residuos en el extremo carboxilo que contiene dos deshidroalaninas (Dha), cuatro deshidrobutirinas (Dhb) y tres cisteínas (figura 4.55), aminoácidos que permiten la formación de los enlaces lantionina característicos de los lantipéptidos (apartado 1.2.4.5). Curiosamente, como veremos más adelante en el apartado 4.3.4.6.2, el operón *amfTSBAR*, implicado en la biosíntesis del péptido de tipo lantibiótico SapB, al igual que las agrupaciones SMC8 y SMC12 de lantibióticos, se vio subexpresado en la cepa carente de pSCL4.

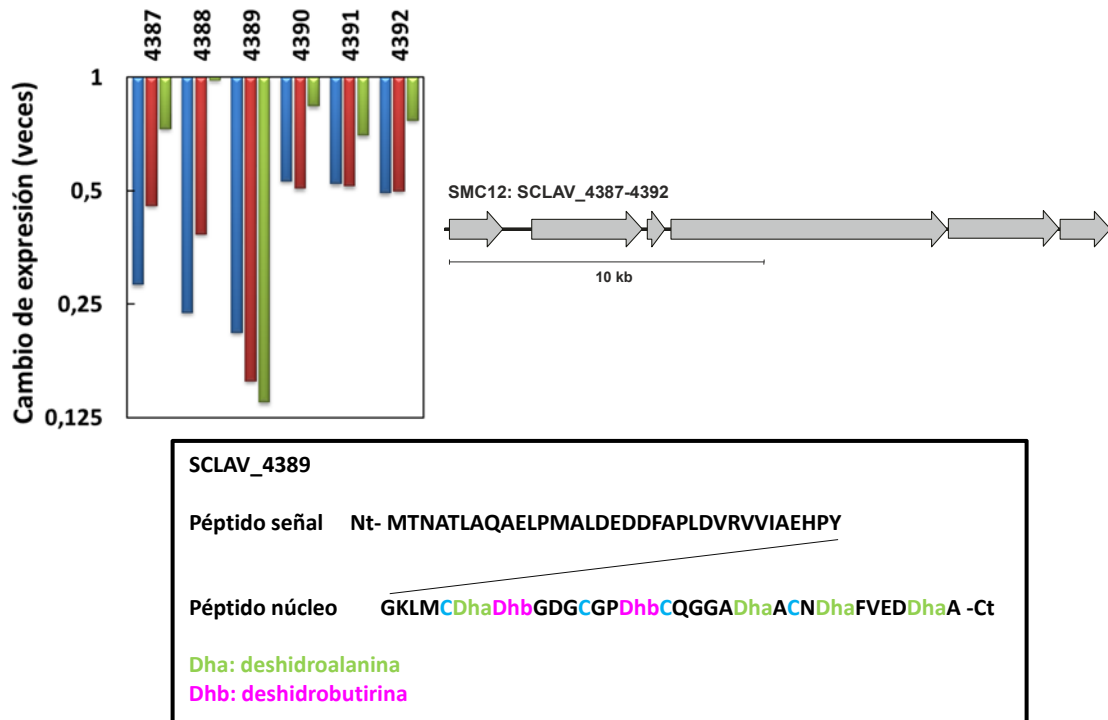


Figura 4.55. Efecto de la ausencia de pSCL4 en la transcripción de los genes de la agrupación SMC12 en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ comparada con *S. clavuligerus*. Para simplificar la figura, la denominación de los genes se abrevió usando los dígitos sin SCLAV. Ver el pie de la figura 4.42. En la parte derecha de la figura se muestra la organización de la agrupación génica SMC12 en *S. clavuligerus* (modificado de Medema y col., 2010) y la estructura primaria del péptido codificado por SCLAV_2465 donde se indican los residuos con modificaciones adicionales identificadas según la predicción de *antiSMASH*.

4.3.4.4.11. Agrupación SMC13

Esta agrupación está presuntamente implicada en la biosíntesis de un compuesto mixto policétido-péptido no ribosomal ya que contiene un gen, SCLAV_4466, que codifica una enzima con actividad PKS-NRPS (Medema y col., 2010). Los genes SCLAV_4461, SCLAV_4462, SCLAV_4464-SCLAV_4472, SCLAV_4477, SCLAV_4479, SCLAV_4483 se subexpresaron entre 0,06 y 0,5 veces. Además de la PKS-NRPS (SCLAV_4466), entre los genes reprimidos se encuentran SCLAV_4464, que codifica un regulador transcripcional de la familia LuxR, y SCLAV_4465, para un citocromo P450. SCLAV_4484 y SCLAV_4485, que codifican una subunidad alfa metilmalonil-CoA decarboxilasa y una proteína hipotética, se sobreexpresaron 6,5 y 5 veces, respectivamente, a las 22,5 horas. Asimismo, los genes SCLAV_4462 y SCLAV_4478, para una 3-isopropilmalato deshidrogenasa y una 2-isopropilmalato sintasa, se sobreexpresaron 12 y 7 veces, respectivamente, a las 60 horas (figura 4.56).

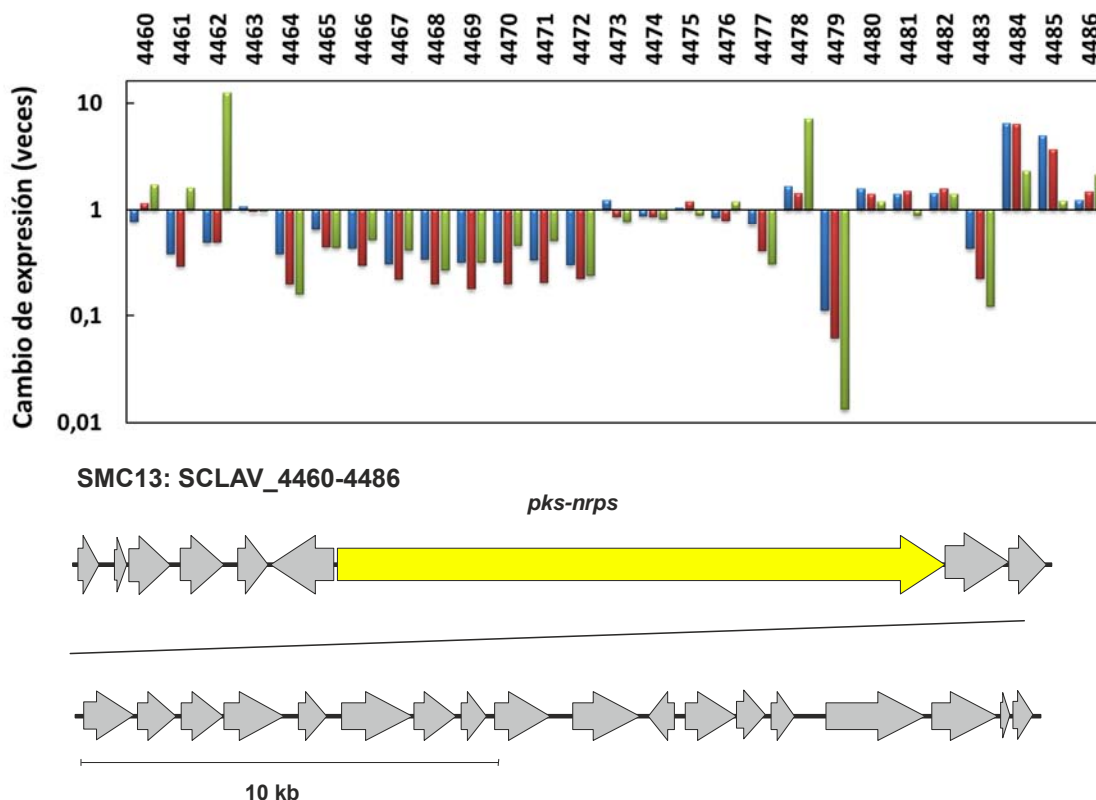
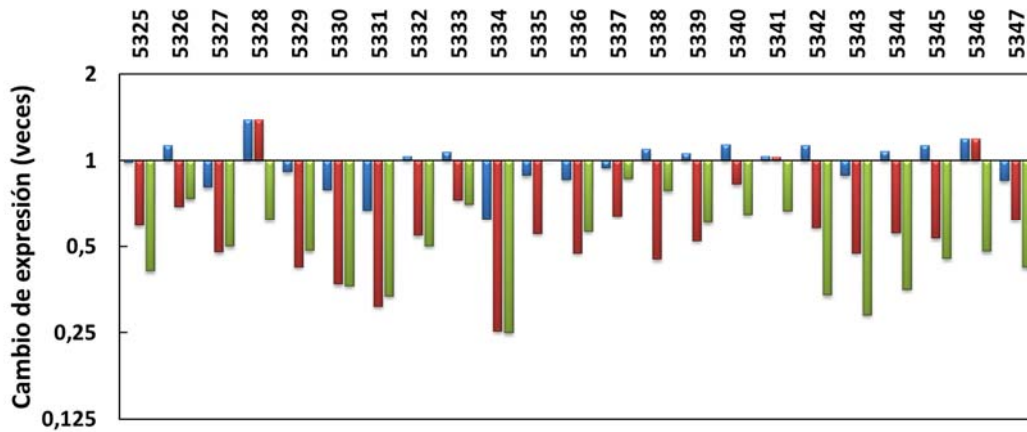


Figura 4.56. Efecto de la ausencia de pSCL4 en la transcripción de los genes de la agrupación SMC13 en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ comparada con *S. clavuligerus*. Para simplificar la figura, la denominación de los genes se abrevió usando los dígitos sin SCLAV. Ver el pie de la figura 4.42. En la parte inferior de la figura se indica la organización de la agrupación génica SMC13 en *S. clavuligerus* con el gen que codifica la PKS-NRPS resaltado en color amarillo (modificado de Medema y col., 2010).

4.3.4.4.12. Agrupación SMC19

Esta agrupación posee dos genes, SCLAV_5335 y SCLAV_5337, que codifican dos sintetasas de péptido no ribosomal por lo que podría codificar la biosíntesis de un péptido no ribosomal (Medema y col., 2010). La ausencia del megaplásmido redujo la expresión entre 0,25 y 0,9 veces de casi todos los genes de la agrupación a las 46,5 y 60 horas. Entre estos genes se encuentra SCLAV_5334, que codifica un regulador transcripcional de la familia StrR y que fue el más afectado, con una subexpresión de 0,25 veces (figura 4.57).



SMC19: SCLAV_5325-5347

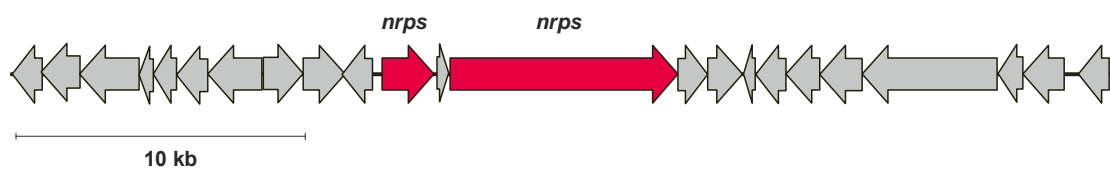


Figura 4.57. Efecto de la ausencia de pSCL4 en la transcripción de los genes de la agrupación SMC19 en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ comparada con *S. clavuligerus*. Para simplificar la figura, la denominación de los genes se abrevió usando los dígitos sin SCLAV. Ver el pie de la figura 4.42. En la parte inferior de la figura se indica la organización de la agrupación génica SMC19 en *S. clavuligerus* con los genes que codifican las NRPS resaltados en color rojo (modificado de Medema y col., 2010).

4.3.4.4.13. Agrupación SMC20

Esta agrupación presenta dos sintetetas de péptido no ribosomal (SCLAV_5484 y SCLAV_5485), y una policétido sintasa de tipo III (SCLAV_5492) (Medema y col., 2010), esta última implicada en la biosíntesis de naringenina en *S. clavuligerus* (Álvarez-Álvarez y col., 2015). La eliminación del megaplásmido pSCL4 provocó la sobreexpresión entre 1,5 y 2,9 veces de los genes SCLAV_5464-SCLAV_5470, SCLAV_5474, SCLAV_5475, SCLAV_5478-SCLAV_5481, entre los que se encuentra un regulador transcripcional de la familia Fis, codificado por SCLAV_5479. Sin embargo, el bloque SCLAV_5484-SCLAV_5497, entre los que están los dos genes que codifican las sintetetas de péptido no ribosomal (SCLAV_5484 y SCLAV_5485), se subexpresó entre 0,09 y 0,7 veces.

Dentro de la agrupación SMC20, la pareja SCLAV_5492 (*ncs*) y SCLAV_5491 (*ncyP*), para una chalcona sintasa y un citocromo P450 oxigenasa, respectivamente, y SCLAV_5457 (*tal*), localizado fuera de la agrupación y que codifica una tirosina/fenilalanina amonio liasa, están implicados en la biosíntesis de naringenina (Álvarez-Álvarez y col., 2015) y se subexpresaron una media de 0,2 veces (figura 4.58).

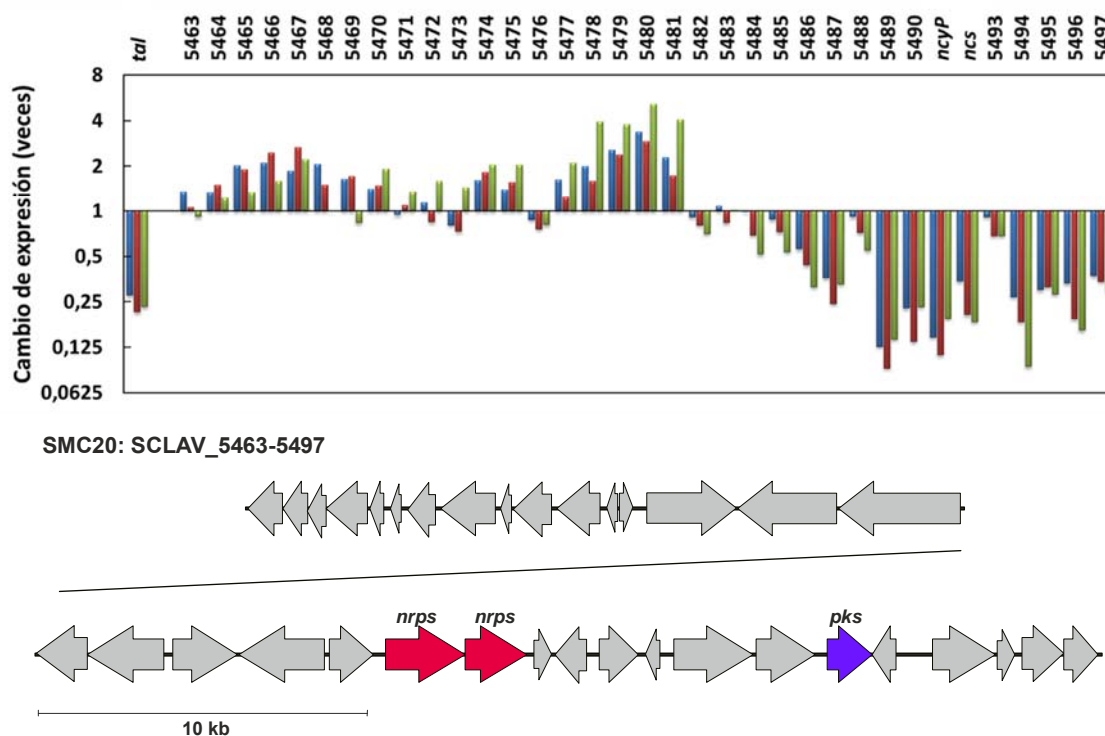


Figura 4.58. Efecto de la ausencia de pSCL4 en la transcripción de los genes de la agrupación SMC20 y el gen *tal* en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ comparada con *S. clavuligerus*. Para simplificar la figura, la denominación de los genes se abrevió usando los dígitos sin SCLAV. Ver el pie de la figura 4.42. En la parte inferior de la figura se indica la organización de la agrupación génica SMC20 en *S. clavuligerus* con los genes que codifican las NRPS y PKS resaltados en color rojo y azul, respectivamente (modificado de Medema y col., 2010).

4.3.4.4.14. Agrupación SMC21

Esta agrupación parece codificar la biosíntesis de un compuesto combinación de policétido y péptido no ribosomal ya que presenta una enzima con actividad PKS-NRPS (SCLAV_5614), además de una posible sintetasa de péptido no ribosomal (SCLAV_5638) (Medema y col., 2010). En ausencia de pSCL4 estos dos genes redujeron ligeramente su expresión, pero la mayoría de los de esta agrupación se expresaron entre 0,01 y 0,5 veces en los tres tiempos analizados. Entre los genes reprimidos se encontraron tres reguladores transcripcionales, SCLAV_5623, de la familia SARP; SCLAV_5625, de la familia MarR; SCLAV_5631, de la familia TetR, y SCLAV_5636, un citocromo P450 (figura 4.59).

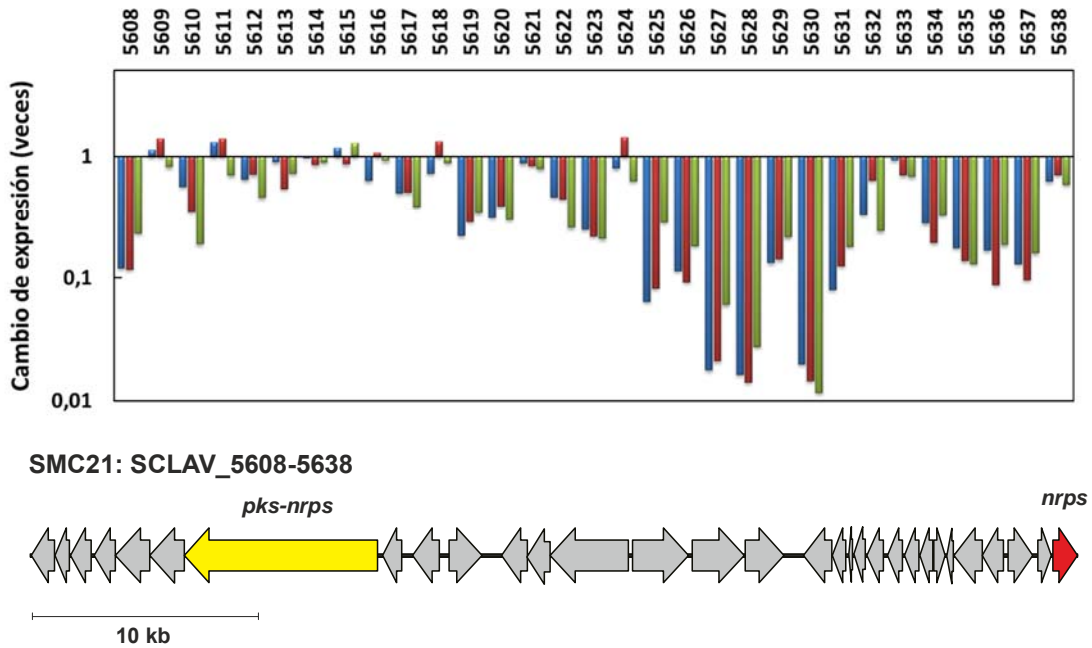


Figura 4.59. Efecto de la ausencia de pSCL4 en la transcripción de los genes de la agrupación SMC21 en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ comparada con *S. clavuligerus*. Para simplificar la figura, la denominación de los genes se abrevió usando los dígitos sin SCLAV. Ver el pie de la figura 4.42. En la parte inferior de la figura se indica la organización de la agrupación génica SMC21 en *S. clavuligerus* con los genes que codifican las PKS-NRPS y NRPS resaltados en color amarillo y rojo, respectivamente (modificado de Medema y col., 2010).

4.3.4.4.15. Agrupación SMC22

Esta agrupación está presuntamente implicada en la biosíntesis de un terpeno dada la presencia de un gen que codifica una terpeno sintasa (SCLAV_5671) (Medema y col., 2010). En el mutante carente de megaplásmido este gen se subexpresó 0,3 veces, mientras que el resto lo hicieron entre 0,09 y 0,3 veces (figura 4.60).

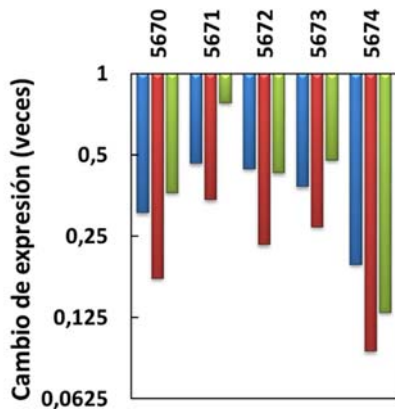
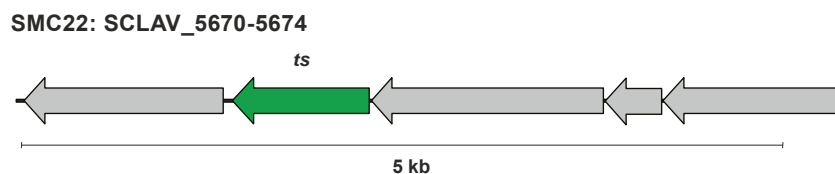


Figura 4.60. Efecto de la ausencia de pSCL4 en la transcripción de los genes de la agrupación SMC22 en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ comparada con *S. clavuligerus*. Para simplificar la figura, la denominación de los genes se abrevió usando los dígitos sin SCLAV. Ver el pie de la figura 4.42. En la parte inferior de la figura se indica la organización de la agrupación génica SMC22 en *S. clavuligerus* con el gen que codifica la terpeno sintasa resaltado en color verde (modificado de Medema y col., 2010).



4.3.4.4.16. Agrupación SMC23

Esta agrupación podría ser responsable de la biosíntesis de un sideróforo dada la presencia de tres genes para componentes de sintetasa de sideróforo codificadas por SCLAV_5702, SCLAV_5703 y SCLAV_5704 (Medema y col., 2010). En el mutante carente de pSCL4, todos los genes se subexpresaron, siendo los más afectados SCLAV_5708 y SCLAV_5710, que codifican una proteína hipotética y secretada, respectivamente (figura 4.61).

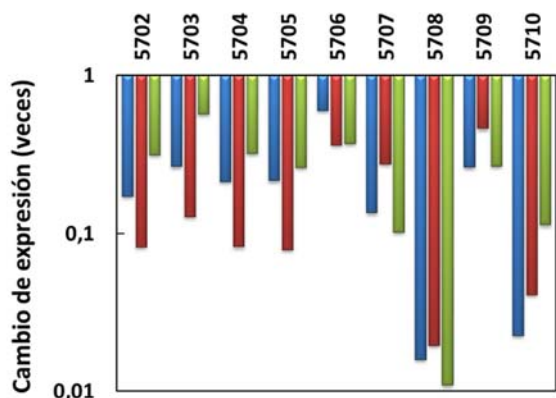
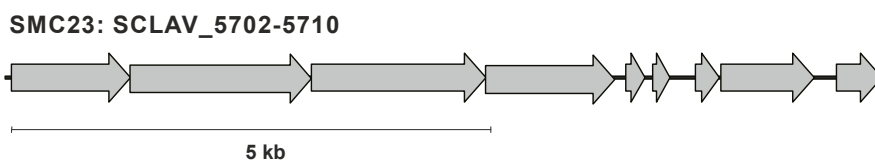


Figura 4.61. Efecto de la ausencia de pSCL4 en la transcripción de los genes de la agrupación SMC23 en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ comparada con *S. clavuligerus*. Para simplificar la figura, la denominación de los genes se abrevió usando los dígitos sin SCLAV. Ver el pie de la figura 4.42. En la parte inferior de la figura se indica la organización de la agrupación génica SMC23 en *S. clavuligerus* (modificado de Medema y col., 2010).



4.3.4.5. Agrupaciones génicas cromosómicas de metabolitos secundarios: visión general

Analizadas las 24 agrupaciones génicas cromosómicas de metabolitos secundarios, se observó que en 11 de ellas la ausencia del megaplásmido provocó la subexpresión de casi todos sus genes en alguno de los tres tiempos analizados (SMC3, SMC6, SMC8, SMC10, SMC11, SMC12, SMC19, naringenina, SMC21, SMC22 y SMC23). Entre estas once agrupaciones, y respecto a las 24 descritas en el cromosoma de *S. clavuligerus*, se encuentran las tres únicas implicadas en la biosíntesis de sideróforos (SMC3, SMC6, SMC23), las dos únicas para lantibióticos (SMC8 y SMC12) y dos de las tres agrupaciones para antibióticos β -lactámicos (SMC10 y SMC11, que codifican el ácido clavulánico y la cefamicina C, respectivamente). Además, tras la eliminación de las diez agrupaciones de metabolismo secundario localizadas en el megaplásmido que presentan genes para terpeno sintasas, las dos únicas agrupaciones SMC cromosómicas que los contienen, SMC22 y SMC4, vieron subexpresados todos sus genes (SMC22) o al menos el gen terpeno sintasa (SMC4), por lo que podría darse algún tipo de regulación entre estas

agrupaciones portadoras de terpeno sintasas. Curiosamente, 7 de los 10 genes que codifican citocromo P450 en agrupaciones de metabolitos secundarios se reprimieron en los tres tiempos analizados entre 0,1 y 0,6 veces, mientras que SCLAV_0486, perteneciente a la agrupación SMC5, se activó hasta 18 veces a las 22,5 horas (tabla 7.7, Anexo); SCLAV_5339 redujo su expresión solamente a las 46,5 y 60 horas y SCLAV_4178 no alteró su nivel de expresión.

En tres de las 24 agrupaciones cromosómicas analizadas casi todos los genes se sobreexpresaron en alguno de los tres tiempos de estudio (SMC5, tunicamicina, SMC18), y siete alteraron su expresión, aunque no de manera uniforme entre los diferentes genes (SMC1, SMC2, SMC4, SMC7, SMC9, SMC13 y SMC20). En las agrupaciones SMC14, SMC15, SMC16 y SMC17 menos del 50 % de sus genes vieron afectado su nivel de transcripción debido a la ausencia del megaplásmido (tabla 7.7, Anexo).

En conjunto, la ausencia del megaplásmido pSCL4 provocó: 1) la subexpresión de la mitad de las agrupaciones génicas cromosómicas de metabolismo secundario, 2) la sobreexpresión en 20, 7 y 15 veces de las agrupaciones génicas de la holomicina o SMC18, SMC5 y tunicamicina, respectivamente, y 3) en 7 agrupaciones cromosómicas de metabolismo secundario la alteración de la expresión de manera no uniforme entre sus diferentes genes. Sin embargo, las agrupaciones SMC14, SMC15, SMC16 y SMC17 vieron ligera o nada afectada la transcripción de sus genes. Por lo tanto, el megaplásmido pSCL4 no solamente es un importante reservorio de nuevos metabolitos secundarios (Medema y col., 2010), sino que, además, parece ejercer un importante papel en el control de la expresión de las agrupaciones cromosómicas de metabolitos secundarios, por lo que podría disponer de genes reguladores negativos y/o positivos para modular la transcripción de esas.

4.3.4.6. Otros genes afectados en *S. clavuligerus* pSCL4⁻

De los 677 genes afectados en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ debido a la ausencia del megaplásmido, 176 y 409 genes no integrados en agrupaciones de metabolitos secundarios se vieron sobreexpresados y subexpresados, respectivamente. De estos, 49 codifican reguladores y 536 están implicados en funciones celulares diversas.

4.3.4.6.1. Genes reguladores

Los 49 genes que codifican proteínas reguladoras y cuya expresión se vio afectada debido a la ausencia del megaplásmido en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ se muestran en la tabla 7.8 del anexo.

➤ Estrés: envolturas celulares

El gen SCLAV_2377, ortólogo de SCO3356 y que codifica el factor sigma SigE en *S. coelicolor*, incrementó su nivel de transcripción hasta 5,4 veces a las 22,5 horas (figura 4.62). SigE forma parte de un sistema de transducción de señales que permite a *S. coelicolor* percibir y responder a cambios en la integridad de su envuelta celular (Paget y col., 1999a, 1999b). Este sistema de transducción de señales se compone de cuatro proteínas codificadas en un operón donde también se encuentra el propio factor SigE: CseA, un regulador negativo con función bioquímica no definida; CseB, un regulador de la respuesta, y CseC, un sensor histidina quinasa (*cse*, del inglés *control of sigma E*; Paget y col., 1999b). En *S. clavuligerus* los tres ortólogos de *cseA*, *cseB* y *cseC*, SCLAV_2378, SCLAV_2379 y SCLAV_2380, respectivamente, se sobreexpresaron entre 1,8 (*cseA*, a las 46,5 horas) y 4,6 veces (*cseB*, a las 60 horas) (figura 4.62, tabla 7.8, Anexo).

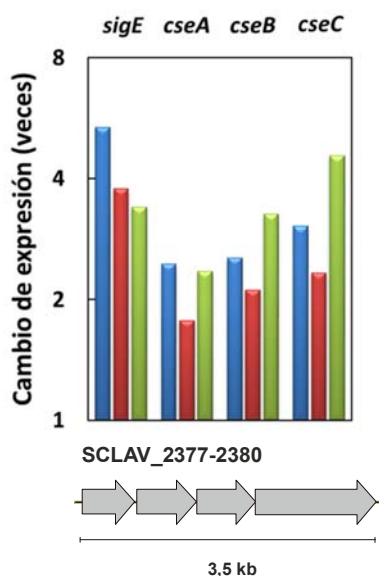


Figura 4.62. Efecto de la ausencia de pSCL4 en la transcripción de los genes del operón *sigE-cseABC* en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ comparada con *S. clavuligerus*. Ver el pie de la figura 4.42. En la parte inferior de la figura se indica la organización del operón *sigE-cseABC* en *S. clavuligerus*.

En *S. coelicolor* la expresión de *sigE* es gobernada por CseB-CseC, el sistema de dos componentes de transducción de la señal (Paget y col., 1999b; figura 4.63). En respuesta a estrés debido a agentes que dañan la pared celular, CseC se fosforila y este fosforila a CseB que activa el promotor del operón *sigE*. El factor SigE de la ARN polimerasa activa la transcripción de genes con funciones relacionadas con la envuelta celular que incluye un operón de 12 genes para la síntesis de glicano de pared celular (operón *cwg*, del inglés *cell wall glycan*; Hong y col., 2002). El sistema de transducción de señal CseB-CseC podría estar activado por la acumulación de un intermediario de la biosíntesis y degradación de peptidoglicano (Hong y col., 2002). En *S. coelicolor*, la pérdida de CseA resulta en la activación del promotor de *sigE* (Hutchings y col.,

2006). En *S. clavuligerus* pSCL4⁻ tanto el gen que codifica el factor SigE como los que codifican CseA, CseB y CseC se sobreexpresaron (figura 4.62). En el proceso de diferenciación morfológica de *Streptomyces* tiene lugar una ronda de muerte celular programada en el micelio sustrato que libera al medio restos celulares de las hifas muertas permitiendo el desarrollo de los segmentos miceliales viables para dar lugar al micelio aéreo (apartado 1.1.3.1). Considerando la incapacidad de *S. clavuligerus* pSCL4⁻ para formar micelio aéreo (apartado 4.3.4.6.2), la acumulación de componentes del peptidoglicano tras la muerte celular programada podría ser el desencadenante de la activación del sistema de transducción de señal CseBC y, por tanto, de la transcripción del operón *sigE-cseABC*.

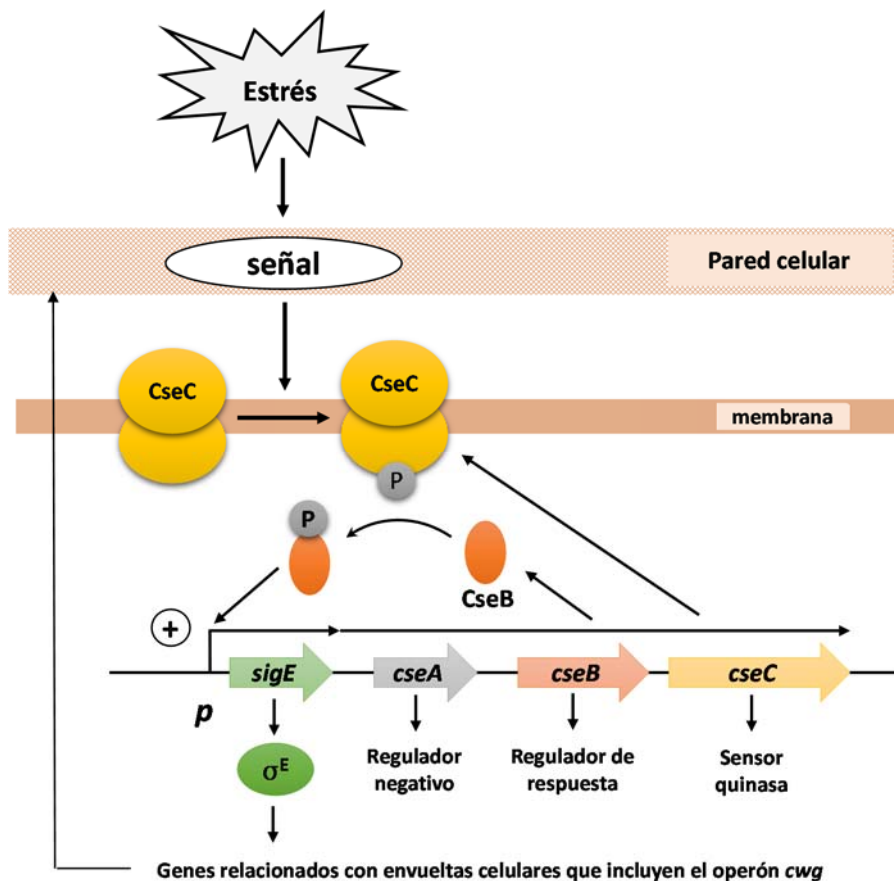


Figura 4.63. Modelo de regulación de la actividad del factor sigma E en respuesta a señales originadas en la envuelta celular (Hong y col., 2002).

➤ Estrés oxidativo

• **OxyR**

El gen SCLAV_3936 es ortólogo de *oxyR* de *S. coelicolor* (SCO5033) que codifica un activador de la transcripción de los genes adyacentes *ahpD* y *ahpC*, para dos alquil hidroperóxido reductasas. Estos dos genes, *ahpD* y *ahpC*, junto con *oxyR* constituyen un operón activado como sistema de defensa en respuesta a estrés oxidativo por H₂O₂ y peróxidos orgánicos por OxyR (Hahn y col., 2002). El gen SCLAV_3936 se sobreexpresó 4 veces a las 60 horas. Los genes SCLAV_3934 y SCLAV_3935, ortólogos de *ahpD* y *ahpC*, lo hicieron 13 y 15 veces, respectivamente, a las 60 horas (figura 4.64; tabla 7.8, Anexo). La eliminación del megaplásmido en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ podría suponer un desajuste del balance oxidativo de la célula y generar un estrés oxidativo causado por H₂O₂ o peróxidos orgánicos, entre otras especies reactivas del oxígeno, que aumentaría la expresión de estos tres genes, e incluso de otros genes inducidos por peróxido de hidrógeno (Tao y col., 1993; Zheng y col., 2001; Imlay, 2015).

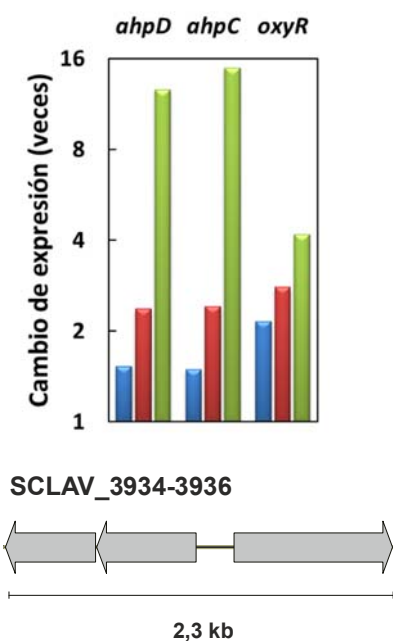


Figura 4.64. Efecto de la ausencia de pSCL4 en la transcripción del operón *ahpD-ahpC-oxyR* en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ comparada con *S. clavuligerus*. Ver el pie de la figura 4.42. En la parte inferior de la figura se indica la disposición del operón *ahpD-ahpC-oxyR* en *S. clavuligerus*.

• **WblA**

El gen SCLAV_2573 es ortólogo de SCO3579 de *S. coelicolor*, gen que codifica la proteína WblA, un regulador transcripcional de la familia WhiB. Este gen se subexpresó entre 0,05 y 0,15 veces en ausencia de pSCL4 en los tres tiempos de análisis (tabla 7.8, Anexo). WblA actúa de forma pleiotrópica controlando la producción de antibióticos y la diferenciación morfológica en

estreptomisetos (Kang y col., 2007). Este gen específico de actinobacterias controla los principales estados de transición en el desarrollo en *S. coelicolor* A3(2), lo cual se confirmó al observar mediante análisis por micromatrices en el mutante *wblA* la subexpresión de genes asociados con estados del crecimiento del micelio aéreo (Fowler-Goldsworthy y col., 2011). Esto podría explicar en parte la ausencia de micelio aéreo (apartado 4.3.4.6.2), así como la variación en la expresión de muchas de las agrupaciones de metabolitos secundarios en el mutante *S. clavuligerus* pSCL4⁻. Adicionalmente, en *S. coelicolor*, este regulador presenta un papel negativo en la respuesta a estrés oxidativo. El mutante de *S. coelicolor* delecionado en *wblA* posee menor sensibilidad al estrés oxidativo inducido por diamida en medio sólido ya que los niveles de expresión de genes relacionados con este tipo de estrés (*sodF*, *sodF2*, *sodN*, *trxB*, y *trxB2*), son mayores en el mutante respecto a la cepa parental, tanto en presencia como en ausencia de estrés oxidativo. Asimismo, la expresión de estos cinco genes analizados se vio estimulada en la cepa silvestre en presencia de estrés oxidativo (Kim y col., 2012b). De modo similar, la acusada subexpresión del gen *wblA* en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ podría estar favoreciendo la sobreexpresión de genes para superar el estrés oxidativo que la célula estaría experimentando debido a la pérdida del megaplásmido.

- **Regulón RpoE**

En *S. clavuligerus* el factor sigma RpoE constituye, junto con su correspondiente factor antisigma RsrA, un sistema que controla un gran número de genes implicados en estrés oxidativo, el regulón de RpoE (Martínez-Burgo y col., 2015). Por ello y tras observar el efecto de la ausencia del megaplásmido en la transcripción de *oxyR* y *wblA*, genes relacionados con la

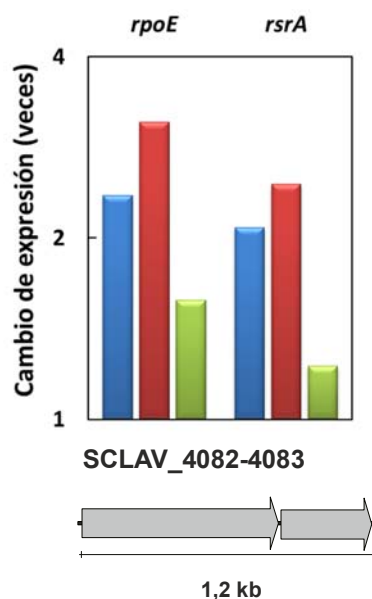


Figura 4.65. Efecto de la ausencia de pSCL4 en la transcripción de *rpoE* y *rsrA* en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ comparada con *S. clavuligerus*. Ver el pie de la figura 4.42. En la parte inferior de la figura se indica la disposición de *rpoE* y *rsrA* en *S. clavuligerus*.

respuesta a este tipo de estrés, se analizó la expresión de *rpoE* y *rsrA* en *S. clavuligerus* pSCL4⁻, lo que reveló que ambos genes, a pesar de no pasar el filtro de significación estadística establecido (apartado 4.3.4), se encuentran sobreexpresados más de 2 veces (figura 4.65; tabla 7.8, Anexo).

A continuación se analizaron los 113 genes del regulón RpoE de *S. clavuligerus* (Martínez-Burgo y col., 2015) en el mutante pSCL4⁻, dado que de los 117 genes del regulón RpoE, 4 se localizan en el megaplásmido pSCL4. De estos 113 genes se observó la sobreexpresión de 64 de ellos con un nivel igual o superior a 1,5 veces respecto al de la cepa de referencia en alguno de los tres tiempos de muestreo, estando 17 de ellos sobreexpresados en los 3 tiempos (tabla 7.9, Anexo). La disminución de la producción de ácido clavulánico en el mutante *S. clavuligerus* pSCL4⁻ podría justificar, de forma similar a lo que ocurre en el mutante *claR*, la activación del regulón de RpoE (apartado 4.2.6.5.1) y, por tanto, la sobreexpresión de la tiorredoxina reductasa (SCLAV_5275) para la biosíntesis de holomicina y la transcripción diferencial de genes para oxidasas, oxidorreductasas y reductasas (no mostrado).

➤ AtrA

El gen SCLAV_3146, ortólogo de SCO4118 de *S. coelicolor* que codifica el factor transcripcional AtrA, se expresó entre 0,34 y 0,5 veces en el mutante pSCL4⁻ en los tres tiempos de análisis (tabla 7.8, Anexo). AtrA es un modulador de metabolismo secundario, así, en *S. coelicolor* A3(2) actúa como activador transcripcional del también activador *actII-orf4* para la biosíntesis de actinorrodina (Uguru y col., 2005), mientras que en *S. avermitilis* la delección del gen *avel*, ortólogo de *atrA*, aumenta la biosíntesis de avermectina, y la complementación del mutante *avel* con el propio *avel*, así como con su ortólogo *atrA* de *S. coelicolor*, reduce el nivel de avermectina (Chen y col., 2008b). En *S. coelicolor* en determinadas condiciones de escasez de nutrientes tales como medio mínimo con manitol, se produce la internalización de N-acetilglucosamina en la célula, regulada por AtrA, y la conversión de esta en glucosamina-6-fosfato. Este último compuesto interacciona con el regulador DasR, liberándolo de su unión al ADN, y permitiendo la transcripción de genes reprimidos por DasR, entre ellos, los implicados en metabolismo secundario y desarrollo morfológico (Rigali y col., 2008; Nothaft y col., 2010). Por ello, la subexpresión SCLAV_3146, ortólogo de *atrA*, podría explicar, en parte, la ausencia de una diferenciación morfológica completa en el mutante sin pSCL4 así como la subexpresión de gran parte, y/o la sobreexpresión de tres de sus agrupaciones de metabolitos secundarios.

➤ Factores sigma B y sigma Q

El gen SCLAV_0691, ortólogo de SCO0600 de *S. coelicolor* que codifica el factor sigma B, se expresó entre 0,3 y 0,4 veces en el mutante pSCL4⁻ en los tres tiempos de análisis (tabla 7.8, Anexo). Este factor sigma es requerido para una adecuada diferenciación en *S. coelicolor* (Cho y col., 2001), por lo que su subexpresión en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ podría estar relacionada con la incapacidad de este mutante para formar micelio aéreo. SigB constituye además un regulador de amplio espectro para la respuesta a estrés osmótico en *S. coelicolor*, gobernando a más de 280 genes (Lee y col., 2005), y contribuye a la protección de las proteínas frente al daño oxidativo tanto en condiciones de cultivo normales como hiperosmóticas (Cho y col., 2001, Lee y col., 2005).

El gen SCLAV_3814, ortólogo de SCO4908 de *S. coelicolor* que codifica el factor sigma SigQ, se encuentra subexpresado entre 0,3 y 0,5 veces en los tres tiempos de estudio (tabla 7.8, Anexo). En *S. coelicolor*, la delección de *sigQ* implica un retraso en la formación de micelio aéreo en medio definido MM basado en glutamato (Shu y col., 2009), lo que podría explicar, en parte, la ausencia de micelio aéreo en el mutante carente de megaplásmido.

En *S. clavuligerus* se han identificado 50 factores sigma, 43 localizados en el cromosoma y 7 en el megaplásmido pSCL4 (Medema y col., 2010). De estos cuarenta y tres cromosomales, además de *sigE*, *sigB* y *sigQ*, anteriormente descritos en el presente apartado, SCLAV_1910 se vio subexpresado entre 0,4 y 0,5 veces en los tres tiempos de análisis.

4.3.4.6.2. Genes con funciones diversas en la célula

Los genes que codifican proteínas con funciones celulares diversas y cuya expresión se vio afectada debido a la ausencia del megaplásmido en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ fueron quinientos treinta y seis: 161 genes sobreexpresados entre 2 y 221 veces, y 375 subexpresados entre 0,5 y 0,0003 veces, respecto de la cepa silvestre (no mostrado). La distribución de estos genes en las diferentes categorías según su función en la célula de acuerdo a la base de datos COG (*Clusters of Orthologous Groups*) se muestra en el gráfico de sectores de la figura 4.66. Esta es una visión global del efecto de la ausencia del megaplásmido en la transcripción de los genes cromosomales en *S. clavuligerus* pSCL4⁻; sin embargo, solamente se discutirán los genes implicados en diferenciación morfológica.

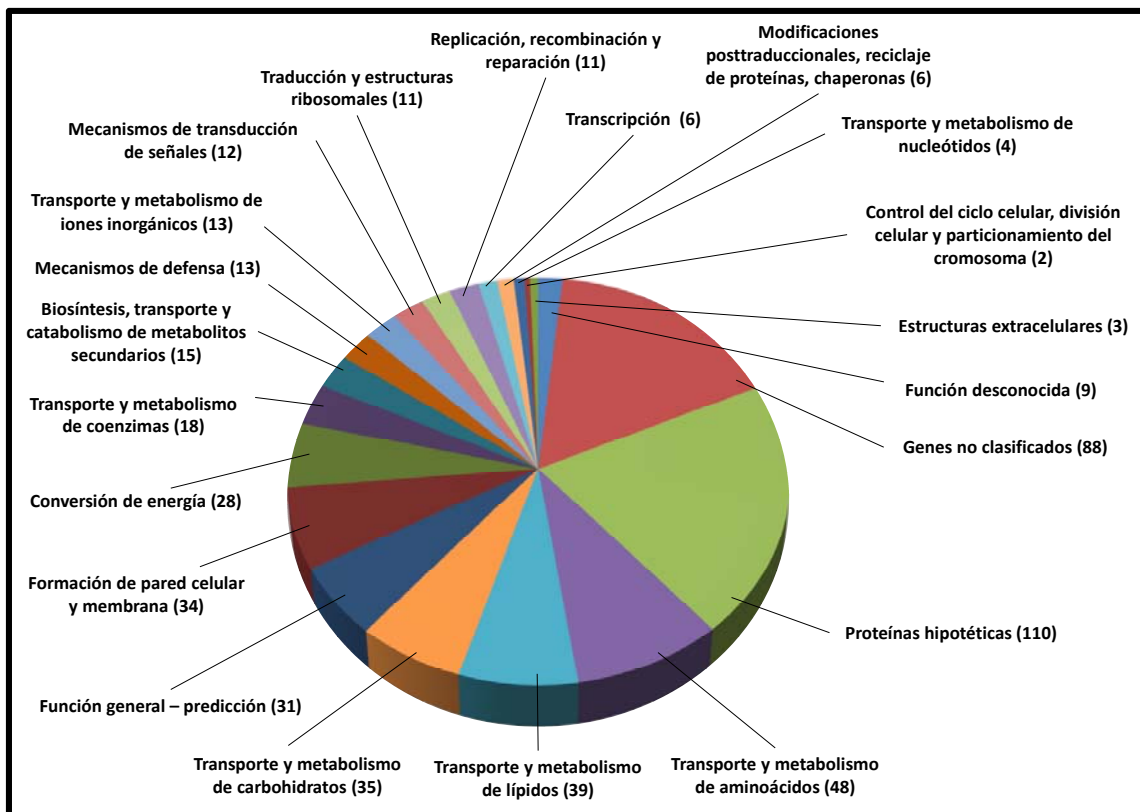


Figura 4.66. Clasificación de los 536 genes con funciones diversas en la célula afectados en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ de acuerdo a la base de datos COG. En cada categoría, entre paréntesis, se indica en el número de genes diferencialmente transcritos.

➤ **Diferenciación morfológica**

Entre los genes cuya expresión se vio alterada debido a la ausencia del megaplásmido pSCL4 se encuentran 34 implicados en la formación de pared celular y membrana y 2 relacionados con el control del ciclo celular, división celular, y segregación del cromosoma (tabla 7.10, Anexo).

De los genes que participan en la formación de pared celular y membrana, 7 se sobreexpresaron de 2 (SCLAV_0874) a 11,5 veces (SCLAV_4710, a las 60 horas), y 27 se subexpresaron de 0,5 (SCLAV_3211, a las 22,5 horas) a 0,004 veces (SCLAV_5548). Entre los sobreexpresados en *S. clavuligerus* pSCL4⁻, cepa que no esporula, curiosamente se encuentra SCLAV_5204, ortólogo a SCO6722 de *S. coelicolor*, que codifica una probable SsgD, proteína de tipo SsgA (*SsgA-like proteins*, SALP) que actúa como un posible regulador y es responsable de la síntesis de peptidoglicano a lo largo de la pared celular lateral en la etapa de engrosamiento de la espora en *Streptomyces* (Noens y col., 2005). Por otro lado, SCLAV_5096 que codifica también para una probable SsgD, con identidades del 35 % con SCO6722 y del 61 % con SsgD de

S. pristinaespiralis, se subexpresó 0,4 veces. De los genes que participan en el control del ciclo celular, división celular, y segregación del cromosoma, dos genes se vieron subexpresados: SCLAV_4356, que codifica una ATPasa FtsK/SpoIIIE implicada en la segregación del ADN, 0,3 veces, y SCLAV_5519, que codifica una posible proteína de control de la esporulación, 0,009 veces. La subexpresión de estos dos genes podría resultar coherente con la ausencia de esporulación en el mutante *S. clavuligerus* pSCL4⁻ (apartado 4.3.2).

Estrés osmótico: canales mecanosensibles

Los canales mecanosensibles (MS) que proporcionan protección frente a estrés hipoosmótico, respondiendo tanto al estiramiento como a la despolarización de la membrana celular, se encuentran en la membrana de organismos de los tres dominios de vida: *Archaea*, *Bacteria* y *Eukarya* (Pivetti y col., 2003). Hay dos familias de canales MS: de gran conductancia (MscL, del inglés *Large-conductance Mechanosensitive channel*) y de pequeña conductancia (MscS, del inglés *Small-conductance Mechanosensitive channel*). El umbral de presión para la apertura de los canales MscS es el 50 % del de los MscL (Bass y col., 2002). La sobreexpresión hasta 5,6 veces (a las 60 horas) de SCLAV_1824 (tabla 7.10, Anexo), un canal de iones mecanosensible MscS, podría deberse a un desajuste osmótico debido a la pérdida del megaplásmido. Según la base de datos StrepDB, solo hay otro Msc en el genoma de *S. clavuligerus*, SCLAV_1279, que codifica igualmente un MscS, y su expresión en el mutante pSCL4⁻ no se vio significativamente afectada.

Supervivencia: agrupación *mce*

Las especies del género *Streptomyces* son generalmente saprófitos del suelo no patógenos, sin embargo, en sus genomas se han identificado genes homólogos a *loci* de virulencia (Clark y col., 2013). Un ejemplo de ello es la agrupación génica *mce* (del inglés, *mammalian cell entry*), caracterizada en *M. tuberculosis*, que se encuentra en diversos actinomicetos no patógenos (Casali y Riley, 2007). La agrupación *mce* en *M. tuberculosis* favorece la invasión y supervivencia en macrófagos (Arruda y col., 1993). Considerando la relativa proximidad evolutiva entre las amebas y los metazoos, tanto las primeras como los macrófagos de mamíferos comparten muchas funciones específicas (Cosson y Soldati, 2008). Por ello, en los últimos años ha habido un gran interés en el uso de amebas, microorganismos abundantes en el suelo que probablemente se alimentan de los estreptomicetos circundantes, como sustitutos de los macrófagos para el análisis de las complejas interacciones que se dan entre la bacteria patógena y la célula huésped (Cosson y Soldati, 2008).

Para estudiar el papel de la agrupación *mce* en *Streptomyces* se ha analizado su impacto en la supervivencia celular, morfología e interacción con otros organismos del suelo (Clark y col., 2013). De este modo, la interrupción de los genes de la agrupación *mce* resultó en el desarrollo de virulencia de *Streptomyces* hacia la ameba *Acanthamoeba polyphaga* en cocultivo y en una reducida colonización de la planta modelo *Arabidopsis* en el suelo. Esto indica que los genes *mce* parecen ejercer un importante papel en la supervivencia de *Streptomyces* en el ambiente (Clark y col., 2013) y su pérdida puede comprometer la supervivencia en un ambiente de competencia.

En *S. coelicolor* la agrupación *mce* está constituida por los genes SCO2411-SCO2423 (Clark y col., 2013), los cuales son ortólogos de SCLAV_5192-SCLAV_5181 y SCLAV_5177 de *S. clavuligerus*, respectivamente (figura 4.67, A). Estos trece genes se subexpresaron en el mutante *S. clavuligerus* pSCL4⁻ de 0,7 (SCLAV_5191) a 0,05 veces (SCLAV_5177) (figura 4.67, B). Tras lo observado en el mutante nulo en *mce* de *S. coelicolor*, tanto en el cultivo puro con ameba como en el inóculo en suelo con *Arabidopsis* (Clark y col., 2013) y, a pesar de que estamos estudiando un cultivo puro *S. clavuligerus*, la subexpresión de la agrupación *mce* en el mutante *S. clavuligerus* pSCL4⁻ podría deberse a un intento de supervivencia tras el desequilibrio creado al perder sus agrupaciones de metabolitos secundarios plasmídicas (apartado 4.3.4).

En *S. coelicolor* los genes *mce* no se requieren para el crecimiento en diferentes fuentes de carbono analizadas y los mutantes *mce* no están alterados en su comportamiento frente a diversos agentes deletéreos, excepto en que muestran un aumento de la resistencia a lisozima y SDS (Clark y col., 2013). Se ha visto en algunos *Rhodococcus* spp. que los *loci mce* codifican sistemas de transporte de tipo ABC (Casali y Riley, 2007), y es posible que la reducción del número de transportadores o porinas pueda estabilizar la envuelta celular y resulte en un aumento de la resistencia a SDS y a lisozima (Clark y col., 2013). Por ello, la subexpresión de la agrupación *mce* en el mutante carente de megaplásmido podría suponer un aumento de la resistencia de la membrana y pared celular frente a determinados agentes en relación a la cepa parental, como la lisozima y el SDS.

En *S. clavuligerus*, como ya se ha comentado, la agrupación *mce* comprende los genes SCLAV_5177 y de SCLAV_5181 a SCLAV_5192 (figura 4.67, A). Sin embargo, SCLAV_5179, SCLAV_5180 y SCLAV_5193 codifican dos proteínas secretadas y otra de membrana, respectivamente, funciones similares a las de las codificadas en la agrupación *mce*, y tienen un ortólogo en *S. coelicolor* (figura 4.67, A), lo que indica conservación de los mismos. Además, estos tres genes presentaron un nivel y perfil de subexpresión en el mutante sin megaplásmido

similar al de los genes de dicha agrupación (figura 4.67, B). Por ello, estas tres proteínas podrían ejercer un papel en colaboración con las de la agrupación *mce*.

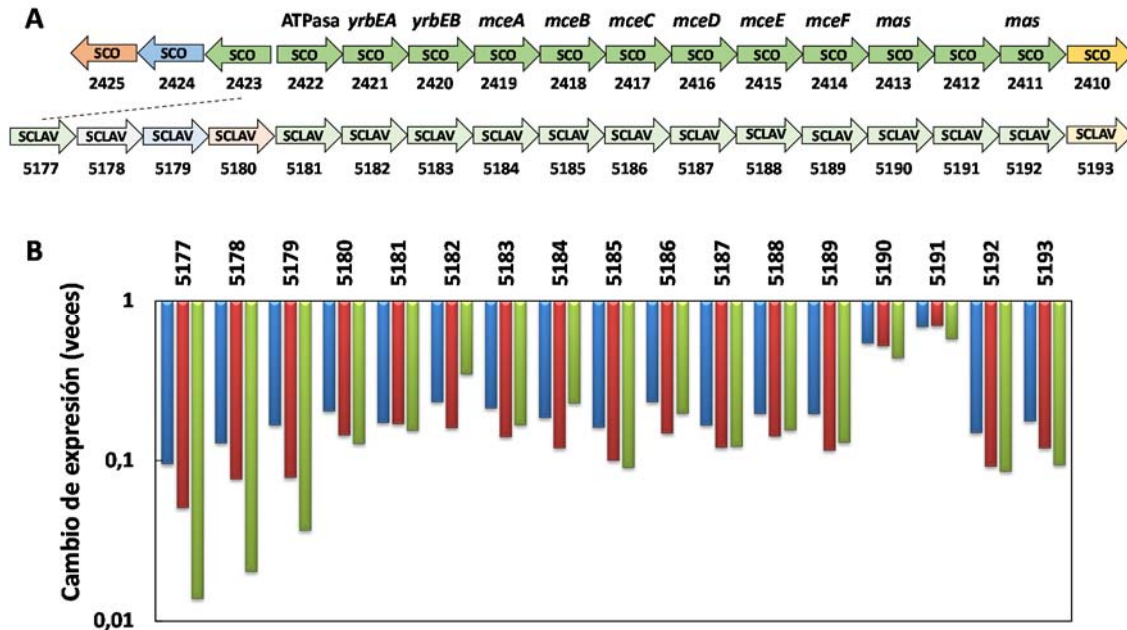


Figura 4.67. A) Agrupación génica *mce* de *S. coelicolor*, línea superior, genes en verde oscuro, y de *S. clavuligerus*, línea inferior, genes en verde claro. El nombre del gen se indica en la parte superior de la flecha para *S. coelicolor* (modificado de Clark y col., 2013) y en la flecha (SCO o SCLAV) y debajo de esta (dígitos) en ambos *Streptomyces*. Cada gen SCLAV se localiza debajo de su ortólogo SCO, excepto en el caso de SCLAV_5179 y SCLAV_5180 que se indican con colores (azul y naranja, respectivamente) y SCLAV_5177 que se indica con una línea discontinua. B) Efecto de la ausencia del megaplásmido pSCL4 en la transcripción de los genes de la agrupación *mce* en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ comparada con *S. clavuligerus*. Para simplificar la figura, la denominación de los genes se abrevió usando los dígitos sin SCLAV. Ver el pie de la figura 4.42.

Operón *amfTBAR*

Como ya se ha comentado anteriormente, la ausencia del megaplásmido pSCL4 en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ y la falta del regulador ClaR en *S. clavuligerus* Δ *claR::aac* resultan en la ausencia de micelio aéreo y esporulación en ambos mutantes (Álvarez-Álvarez y col., 2014a, Martínez-Burgo y col., 2015). En *S. clavuligerus* Δ *claR::aac* una de las principales causas de la ausencia de micelio aéreo es la subexpresión del operón *amfTBAR* y, por tanto, del gen *amfS* que codifica el prepéptido surfactante, dado que al crecer este mutante *claR* próximo a la cepa silvestre se produce la complementación y desarrollo de micelio aéreo en la cepa deficiente (apartado 4.2.6.5.1, Martínez-Burgo y col., 2015).

En *S. clavuligerus* pSCL4⁻ los cuatro genes del operón *amfTBAR* se subexpresaron de 0,8 a 0,2 veces en los diferentes tiempos de análisis (figura 4.68, A). Estos resultados son coherentes con

la ausencia de micelio aéreo en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ (Álvarez-Álvarez y col., 2014a). Tras los resultados observados en el mutante *claR::aac* (apartado 4.2.6.5.1, Martínez-Burgo y col., 2015), y con el objetivo de analizar la complementación entre las cepas defectivas en *claR* y pSCL4 y la silvestre, se sembraron en una placa de medio ME los mutantes *S. clavuligerus* pSCL4⁻ y *S. clavuligerus* Δ*claR::aac* flanqueando a la cepa silvestre (figura 4.68, B, placa izquierda), en otra placa de ME las cepas *S. clavuligerus* pSCL4⁻ y silvestre flanqueando a *S. clavuligerus* Δ*claR::aac* (figura 4.68, B, placa derecha) y se observó la evolución de la esporulación. A los 24 días de cultivo en la primera placa, en el área sembrada de *S. clavuligerus* Δ*claR::aac* más próxima a la cepa silvestre se produjo micelio aéreo, probablemente por difusión del péptido SapB desde esta última, mientras que no hubo formación de micelio aéreo en el mutante pSCL4⁻ próximo a la cepa silvestre (figura 4.68, B, placa izquierda). Tras 12 días de cultivo en la segunda placa, *S. clavuligerus* Δ*claR::aac* produjo micelio aéreo en el área sembrada más próxima tanto al micelio de la cepa silvestre, como a la del mutante pSCL4⁻ (figura 4.68, B, placa derecha). Esto parece indicar que la deficiencia en la formación de micelio aéreo en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ no se debe únicamente a la subexpresión del operón *amfTSBAR*, ya que la expresión de este es suficiente para complementar al mutante *claR*. Excepto el operón *amfTBAR*, ninguno de los genes implicados en diferenciación morfológica afectados en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ incluidos en la tabla 7.10 (Anexo) se vieron significativamente afectados en *S. clavuligerus* *claR::aac*.

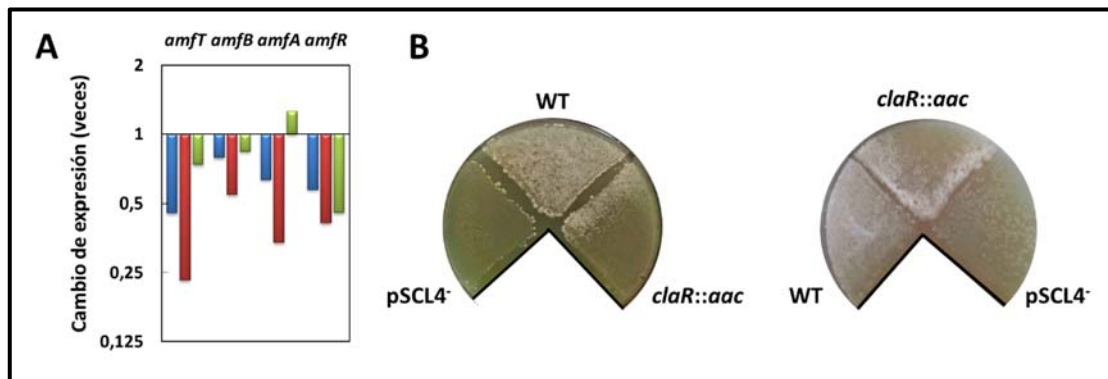


Figura 4.68. A) Efecto de la ausencia de pSCL4 en el nivel de transcripción del operón *amfTBAR* en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ comparado con *S. clavuligerus*. Ver el pie de la figura 4.42. B) Efecto de la ausencia de ClaR o del megaplásmido pSCL4 en la diferenciación morfológica. *S. clavuligerus* ATCC 27064, *S. clavuligerus* pSCL4⁻ y *S. clavuligerus* Δ*claR::aac* en placas de medio ME tras 24 días (placa izquierda) y 12 días (placa derecha) de cultivo.

4.3.4.7. Visión general del análisis transcriptómico en *S. clavuligerus* pSCL4⁻

Dado que el estrés osmótico induce la expresión de varios genes que codifican proteínas para la defensa ante el daño oxidativo así como la síntesis de pequeños compuestos tiol, cabe pensar

que los cambios osmóticos producen daño oxidativo a componentes celulares (Lee y col., 2005). De este modo, el mutante sin megaplásmido pSCL4 podría estar experimentando un desajuste osmótico responsable de la sobreexpresión de SCLAV_1824 para canales mecanosensibles de tipo MscS que proporcionan protección frente a estrés hipoosmótico. El estrés osmótico podría ser también la causa del cambio de expresión de genes para la defensa ante el daño oxidativo como *wblA*, cuya subexpresión activa genes de respuesta a estrés oxidativo. Además, la activación de *oxyR*, un gen que codifica un activador de dos alquil hidroperóxido reductasas que constituyen un sistema de defensa en respuesta a este estrés oxidativo, podría ser la respuesta a daños generados por H₂O₂ y peróxidos orgánicos; y la activación del regulón RpoE podría responder al estrés oxidativo debido a pequeños compuestos tiol. Asimismo, la subexpresión de la mayoría de los citocromo P450 de las agrupaciones de metabolitos secundarios, podría ser una de las causas del estrés oxidativo en el mutante carente de megaplásmido, y este estrés, a su vez, de la producción de holomicina. Este estrés osmótico u oxidativo en el mutante pSCL4⁻ podría producir daños a componentes de la pared celular que serían superados mediante la activación del sistema *cseABC* de percepción y respuesta a cambios en la integridad de las envueltas celulares gracias a la sobreexpresión del factor sigmaE. Por otro lado, la subexpresión de gran parte de las agrupaciones de metabolismo secundario junto con la de *mce* debido a la ausencia del megaplásmido en el mutante, podría ser la causa del posible desarrollo de la virulencia, así como de la activación de la agrupación de tunicamicina, un metabolito de amplio espectro, en *S. clavuligerus* pSCL4⁻. La ausencia de formación de micelio aéreo parece estar relacionada con la subexpresión de *atrA*, *sigB*, *sigQ*, *wblA*, el operón *amfTSBAR* y la sobreexpresión de *sigE-cseABC*.

En una visión global del cambio de expresión mediante micromatrices de todos los genes a lo largo del cromosoma en el mutante *S. clavuligerus* pSCL4⁻, se detectó que aproximadamente los 200 genes del extremo derecho de esta estructura genética estaban reprimidos (figura 4.69, B). Esta disminución en el nivel de señal de transcripción parece deberse efectivamente a una reducción en el nivel de transcrito y no a la ausencia de los genes, ya que, si bien se confirmará por qPCR en nuestro mutante, en la cepa de *S. clavuligerus* sin megaplásmido (*clavu7*) obtenida por Charusanti y col. (2012), la pérdida del pSCL4 en *S. clavuligerus* provocada por sucesivos cocultivos de este con *S. aureus*, no conllevó la pérdida de los genes de los brazos del cromosoma. Por tanto, esta subexpresión podría arrojar luz sobre el origen evolutivo del megaplásmido pSCL4 planteado por Medema y col. (2010) (apartado 1.2.1.1). En este elemento extracromosomal existen dos regiones próximas al *ori*, una de ellas similar a regiones

cromosómicas de otros actinomicetos, pero que no está presente en el cromosoma de *S. clavuligerus*, y la otra con genes de replicación del plásmido, entre otros genes importantes como *brp* para el receptor de butirolactonas. Además, el cromosoma de *S. clavuligerus* presenta un tamaño pequeño respecto a otras especies de *Streptomyces*. Según una de estas hipótesis (Medema y col., 2010), un plásmido relativamente pequeño se integra en un brazo del cromosoma y, posteriormente, se escinde del mismo generando un corte en este brazo y dando lugar a un replicón independiente (figura 4.69, A). Considerando la importante regulación que parece darse entre el megaplásmido y el cromosoma (Medema y col., 2010; apartado 1.2.1.2) y la modulación de la transcripción de un gran número de genes cromosomales como consecuencia de la ausencia de pSCL4 (apartado 4.3.4), la subexpresión de los aproximadamente 200 genes del extremo derecho del cromosoma podría deberse a una regulación entre estos y los genes de origen cromosómico localizados en el megaplásmido del que carece *S. clavuligerus* pSCL4⁻.

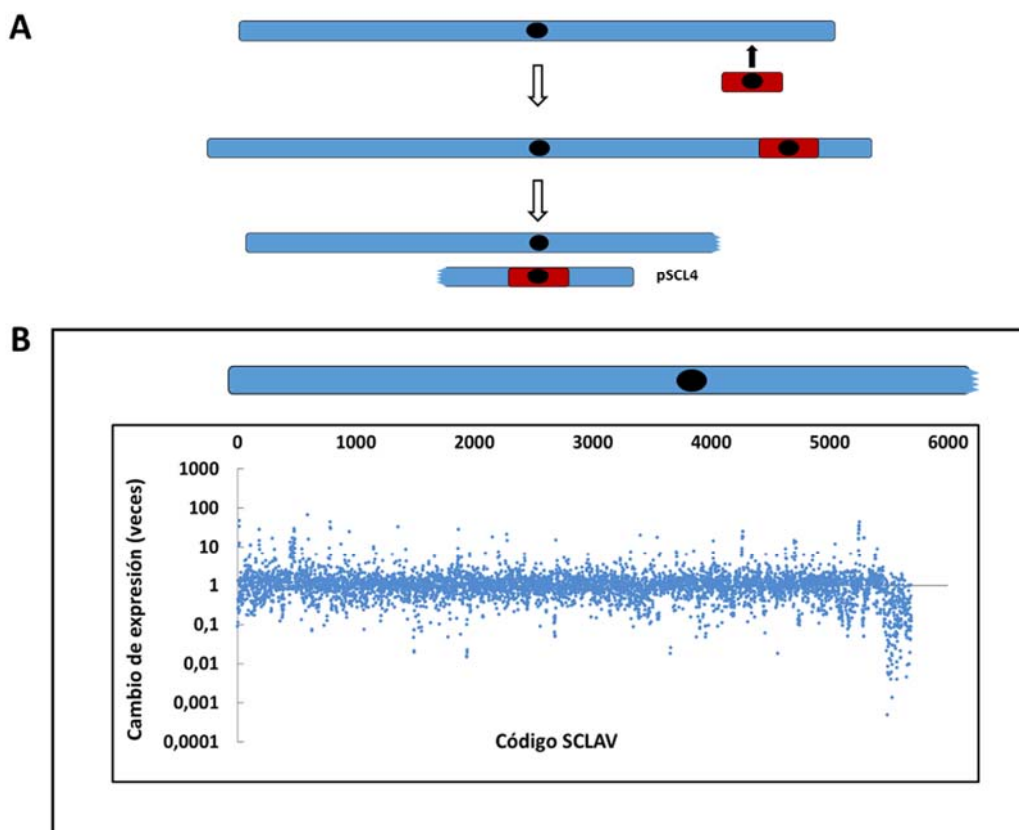


Figura 4.69. A) Posible origen del megaplásmido pSCL4 (modificado de Medema y col., 2010). B) Cambio de expresión de los genes a lo largo del cromosoma de *S. clavuligerus* pSCL4⁻ según el experimento de micromatrices.

4.3.4.8. Validación de los datos transcriptómicos

Los datos transcriptómicos obtenidos con micromatrices han sido validados utilizando RT-qPCR y las mismas muestras de ARN de 46,5 horas empleadas para los estudios de análisis global. Fueron validados catorce genes (figura 4.70) pertenecientes a las agrupaciones del ácido clavulánico, cefamicina C, holomicina y naringenina, cuatro que codifican proteínas reguladoras, así como seis para proteínas con diferentes funciones y uno perteneciente a la agrupación SMC1 (tablas 7.1 y 7.11, Anexo).

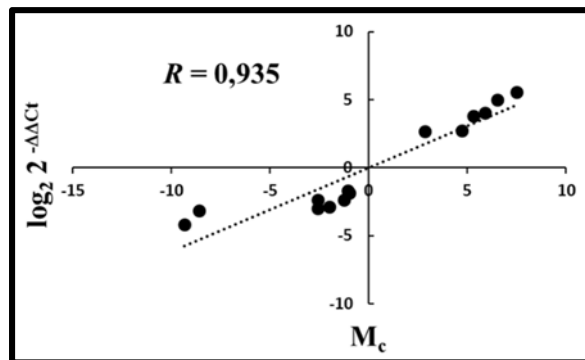


Figura 4.70. Validación de los resultados del análisis transcriptómico. Representación de la correlación para cada gen de los valores obtenidos por micromatrices, y mostrados en la tabla 7.11 (Anexo), y por RT-qPCR en la comparación entre *S. clavuligerus* pSCL4⁻ respecto de *S. clavuligerus*.

Dada la proximidad a 1 de la pendiente de la recta obtenida al correlacionar los datos de ambas técnicas (valor de correlación de Pearson de 0,935) (figura 4.70), los valores de RT-qPCR confirmaron los resultados obtenidos en las micromatrices.

En resumen, la eliminación del megaplásmido pSCL4 en *S. clavuligerus* afectó a la transcripción de todos los genes de las agrupaciones génicas de ácido clavulánico y cefamicina C, lo que supuso la reducción de estos metabolitos respecto de la cepa silvestre, y de holomicina, lo que implicó una notable producción de dicho metabolito, confirmándose así los resultados descritos por Álvarez-Álvarez y col. (2014a). Además, en el presente trabajo se ha observado que la ausencia de pSCL4 en *S. clavuligerus* alteró la expresión de veinte de las veintitrés agrupaciones cromosómicas de metabolitos secundarios descritas por Medema y col. (2010), de la tunicamicina (Chen y col., 2010) y de la naringenina (Álvarez-Álvarez y col., 2015). El desarrollo morfológico, así como el nivel de transcripción de diversos genes responsables del mismo y de reguladores implicados en la respuesta a estrés oxidativo y osmótico, se vio también alterado debido a la ausencia del megaplásmido en *S. clavuligerus*.

Capítulo 4.4. Efecto del regulador PimM sobre el metabolismo secundario de *S. clavuligerus*: activación de agrupaciones génicas silenciosas

4.4.1. Introducción

El gen *pimM*, localizado en el extremo izquierdo de la agrupación génica de pimaricina en *S. natalensis*, codifica un regulador transcripcional inicialmente considerado específico de ruta (Martín y Aparicio, 2009). Este gen se expresa como un transcrito monocistrónico y codifica una proteína de 192 aminoácidos con una masa molecular aproximada de 21 kDa (Antón y col., 2007). PimM presenta una arquitectura muy particular, al combinar en su secuencia de aminoácidos un dominio C-terminal hélice-giro-hélice (HTH, del inglés *helix-turn-helix*) de tipo LuxR para la unión de ADN con un dominio N-terminal de tipo PAS sensor (Antón y col., 2007) (apartado 1.1.5.1.1). Los dominios PAS pueden actuar como sensores de luz, potencial redox, oxígeno, niveles energéticos o pequeños ligandos (Taylor y Zhulin, 1999).

PimM es el regulador transcripcional de tipo PAS-LuxR de actinomicetos mejor caracterizado (Antón y col., 2007; Santos-Aberturas y col., 2011b) y constituye un modelo particularmente interesante, ya que la mayoría de las agrupaciones biosintéticas de macrólidos poliénicos secuenciadas contienen un gen que codifica un regulador homólogo a PimM. De este modo, AmphRIV en la agrupación génica de anfotericina de *S. nodosus* (Carmody y col., 2004), PteF en la de filipina de *S. avermitilis* (Ikeda y col., 2003), NysRIV en la de nistatina de *S. noursei* (Sekurova y col., 2004) y FscRI en la de candicidina de *S. griseus* (Chen y col., 2003), presentan un elevado grado de conservación con PimM a lo largo de la secuencia aminoacídica que codifican (Antón y col., 2007). Además, la complementación de *S. natalensis* Δ *pimM* con un regulador heterólogo PAS/LuxR (tal como *amphRIV*, *pteF* o *nysRIV*) restaura la producción de pimaricina, lo que demuestra la conservación funcional de estos reguladores (Santos-Aberturas y col., 2011a). La introducción de una única copia de *pimM* en el productor de anfotericina *S. nodosus*, o en el productor de filipina *S. avermitilis*, aumenta la producción de ambos polienos, indicando que la expresión del regulador PAS-LuxR, pese a su particularidad estructural y su restringida distribución en la naturaleza, constituye un cuello de botella en la biosíntesis de estos antifúngicos y que estos reguladores son completamente intercambiables (Santos-Aberturas y col., 2011a).

Existe un segundo gen regulador, *pimR*, en la agrupación génica de pimaricina. La interrupción independiente de *pimM* o de *pimR* en *S. natalensis* provoca la completa pérdida de su capacidad para producir pimaricina. Los análisis de RT-PCR del mutante Δ *pimM* han mostrado que la expresión de un gran número de genes en la agrupación génica de la pimaricina se ve disminuida, lo que indica que PimM es un regulador positivo de la producción de este tetraeno

(Antón y con., 2007). El nivel de transcripción de *pimR* en los mutantes $\Delta pimR2$, carente de *pimR*, y $\Delta pimM$ se mantiene similar al de la cepa silvestre, lo que indica que la expresión de este regulador no se ve afectada por ninguna de las dos mutaciones y confirma que PimR no se autorregula. Sin embargo, el nivel de transcripción de *pimM* en estos dos mutantes no se ve afectado en $\Delta pimM$, de donde se deduce que PimM no se autorregula, pero se reduce drásticamente en $\Delta pimR2$, lo que indica que el promotor de *pimM* es la diana transcripcional de PimR (Santos-Aberturas y col., 2012). Además, la expresión constitutiva de *pimM* en el mutante $\Delta pimR2$ restaura la producción de pimaricina, de modo que el promotor de *pimM* es la única diana de PimR dentro de la agrupación de pimaricina, como se concluyó al detectar mediante EMSA la interacción de PimR^{SARP} únicamente con una sonda portadora de la región intergénica *pimM-pimR* y no con las sondas portadoras de regiones promotoras de los genes biosintéticos, transportadores o reguladores no transcripcionales de la agrupación (Santos-Aberturas y col., 2012).

La sobreexpresión de los reguladores específicos de ruta que actúan positivamente sobre la expresión de los genes biosintéticos permite incrementar la producción del compuesto, como se ha demostrado en el caso de muchos reguladores de tipo SARP (Pérez-Llarena y col., 1997a; Olano y col., 2008). De forma similar, el incremento de la dosis génica de *pimM*, en *S. natalensis*, o de *nysRIV*, en *S. noursei*, aumentan la producción de pimaricina (Antón y col., 2007) y nistatina (Sekurova y col., 2004), respectivamente.

Además, la expresión heteróloga de genes reguladores ha hecho posible la activación de agrupaciones génicas en el hospedador en el que se encontraban silenciadas. De este modo, la expresión del regulador PimM en *S. albus*, especie que presenta una proteína homóloga a este regulador (68,8 % similitud) en la agrupación génica de candicidina, permitió activar la producción de este policétido de tipo I y del híbrido policétido-péptido no ribosomal antimicina (Olano y col., 2014).

Como hemos visto, los reguladores transcripcionales de tipo PAS-LuxR han sido descritos como activadores específicos de ruta de la biosíntesis de macrólidos poliénicos. Sin embargo, recientemente, en *S. avermitilis* han sido identificados a lo largo del cromosoma posibles operadores del regulador PteF en múltiples y diversas agrupaciones génicas, entre ellas las de dos policétido sintetas de la agrupación de oligomicina (Vicente y col., 2015). Dado el alto grado de similitud de las secuencias de PteF y PimM, así como la conservación funcional entre ambos reguladores, por similitud con el operador canónico de PimM (Santos-Aberturas y col., 2011a)

se llevó a cabo la búsqueda de sitios de unión para PteF a lo largo de cromosoma de *S. avermitilis*, identificando 101 posibles dianas de unión dentro o precediendo a genes implicados en diferentes aspectos del metabolismo primario y secundario, lo que sugiere que PteF podría controlar estos procesos (Vicente y col., 2015). La unión de diecisiete de estos operadores al dominio de unión a ADN de PimM observada mediante EMSA demostró que los reguladores PAS-LuxR pueden también interactuar directamente con múltiples genes pertenecientes a otras agrupaciones génicas diferentes a las implicadas en la biosíntesis de macrólidos poliénicos, por lo que ejercerían sobre ellas una regulación cruzada y afectarían, por tanto, a una amplia variedad de procesos (Vicente y col., 2015).

La secuenciación del genoma de *S. clavuligerus* ATCC 27064 y el reciente descubrimiento de la existencia del megaplásmido pSCL4, han permitido identificar genes relacionados con la biosíntesis de nuevos metabolitos secundarios que parecen estar silenciados. Entre estos se encuentran ocho posibles agrupaciones génicas implicadas en la biosíntesis de policétidos (SMC1, SMC5, SMC15, SMC20, SMCp3, SMCp5, SMCp16, SMCp21) y seis posibles agrupaciones de biosíntesis de péptidos no ribosomales y policétidos o híbridos péptidos no ribosomales-policétidos (SMC13, SMC21, SMCp2, SMCp6, SMCp11, SMCp17) (Medema y col., 2010; apartado 1.2.1.3).

Considerando estos antecedentes, el presente capítulo se ha centrado en el análisis del efecto de la expresión heteróloga de PimM en el transcriptoma y en la producción de nuevos metabolitos de *S. clavuligerus::pimM*, cepa mutante con el gen heterólogo *pimM* integrado, respecto a *S. clavuligerus::pIB139*, como cepa control.

4.4.2. Búsqueda *in silico* de reguladores PAS-LuxR en *S. clavuligerus*

La presencia de reguladores PAS-LuxR en *S. clavuligerus* podría ser indicativo de la existencia en su genoma de agrupaciones de metabolismo secundario silenciadas cuya transcripción sería activada mediante la expresión heteróloga del regulador modelo PimM en esta cepa. Para la identificación de este tipo de reguladores en el genoma de *S. clavuligerus* se empleó la secuencia aminoacídica del regulador prototipo PimM y la herramienta informática BLAST. De este modo, se encontró el gen SCLAV_0213, el cual codifica un regulador transcripcional de la familia LuxR con un 43 % de identidad y un 55 % de similitud con el regulador PimM. Este gen de *S. clavuligerus* se encuentra anotado en la base de datos StrepDB como *pteF* y es ortólogo del gen regulador *pteF* de *S. avermitilis* localizado en la agrupación génica de biosíntesis de filipina.

Sin embargo, SCLAV_0213 se sitúa entre las agrupaciones SMC4, posiblemente implicada en la biosíntesis de terpenos, y SMC5, que contiene una policétido sintasa de tipo I (Medema y col., 2010), y, por tanto, fuera de cualquiera de las agrupaciones de metabolismo secundario descritas hasta el momento en *S. clavuligerus* (Medema y col., 2010; Chen y col., 2010).

Considerando los distintos grados de conservación de los dominios de este tipo de reguladores, alto para el LuxR y bajo para el PAS, y con el fin de analizar la presencia de los residuos aminoácidos característicos de ambos en la proteína codificada por SCLAV_0213, se realizó un alineamiento de esta con PimM de *S. natalensis* (Antón y col., 2007) y otros cuatro reguladores de tipo PAS-LuxR ortólogos que controlan la producción de macrólidos poliénicos en otros *Streptomyces*: PteF, FscRI, AmphRIV y NysRIV (Ikeda y col., 2003; Chen y col., 2003; Carmody y col., 2004; Sekurova y col., 2004) (figura 4.71).

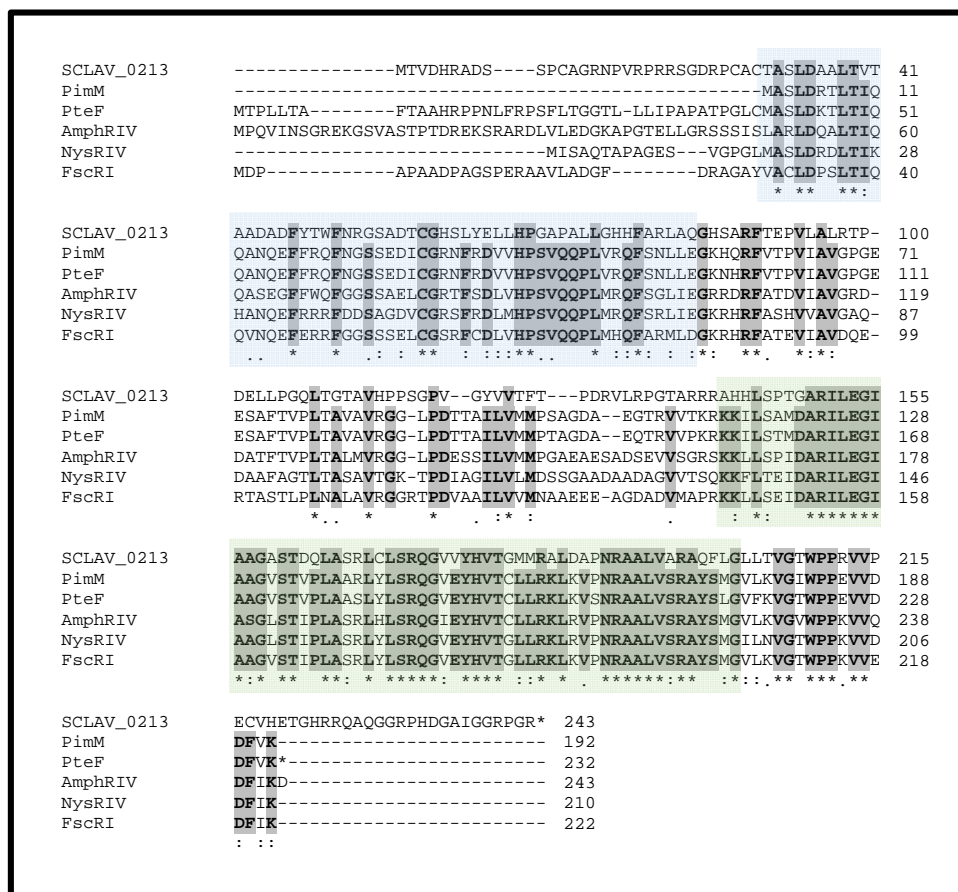


Figura 4.71. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de SCLAV_0213 (WP_003959350.1) y las proteínas ortólogas de las agrupaciones biosintéticas de pimaricina, PimM (CAM35468.1); filipina, PteF (BAC68119.1); anfotericina, AmphRIV (AAV37062.1), nistatina, NysRIV (AAV37062.1) y candidina, FscRI (AGI92174.1). En negrita y gris se indican los aminoácidos conservados en las secuencias de PimM y sus cuatro proteínas ortólogas; igualmente se indican en la secuencia de SCLAV_0213 cuando estos están conservados. La secuencia de aminoácidos de los dominios PAS y LuxR se delimitan en azul y verde, respectivamente. Los asteriscos indican residuos conservados. El punto (.) y los dos puntos (:) indican sustituciones menos o más conservativas, respectivamente.

En la comparación de la secuencia de SCLAV_0213 con los cinco reguladores se observa un alto grado de conservación del dominio LuxR. De los 48 aminoácidos conservados de este dominio en los cinco reguladores, 36 residuos son idénticos y 5 son sustituciones similares en SCLAV_0213. En cuanto a los 23 aminoácidos conservados del dominio PAS, en SCLAV_0213, 13 son idénticos y 7 son sustituciones similares. Por lo tanto, el regulador SCLAV_0213 presenta una notable similitud global y en los dominios PAS y LuxR con las secuencias aminoacídicas de los reguladores ortólogos de la biosíntesis de macrólidos poliénicos. Asimismo, el análisis filogenético del dominio PAS y LuxR de la proteína codificada por SCLAV_0213 con estos dos dominios de otros 51 reguladores transcripcionales de la familia PAS-LuxR, tanto del género *Streptomyces* como de otros actinomicetos (Cheng y col., 2015), indica que SCLAV_0213 es un miembro de esta familia de reguladores transcripcionales.

La predicción de la estructura tridimensional de las proteínas SCLAV_0213 y PimM a través del programa de modelado del SWISS-MODEL, permitió observar las estructuras secundarias de tipo hélice α (representadas en colores cálidos) que definen el dominio LuxR HTH del extremo C-terminal, así como la presencia de un largo conector (representado en verde) que lo une al dominio PAS en N-terminal (representado en colores fríos) (figura 4.72).

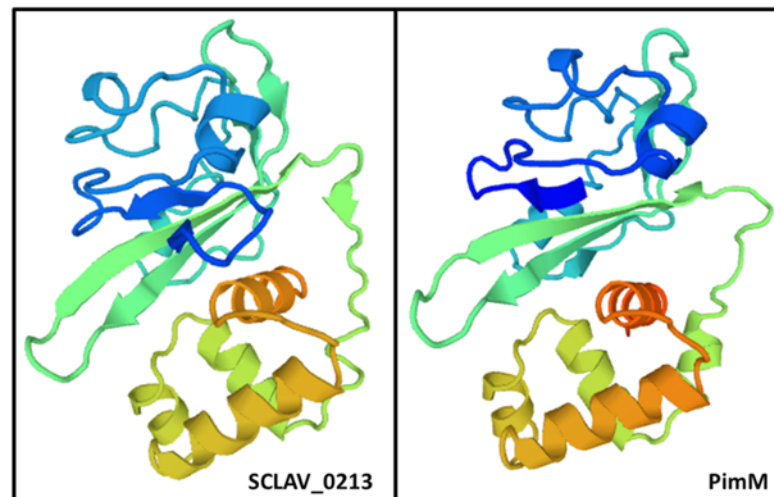


Figura 4.72. Predicción de la estructura tridimensional de las proteínas reguladoras SCLAV_0213 y PimM obtenida mediante el programa de modelado del SWISS-MODEL.

4.4.3. Obtención de *S. clavuligerus*::*pimM*

S. clavuligerus::*pimM* se obtuvo integrando en el genoma de *S. clavuligerus* la construcción pCP*pimM* (Santos-Aberturas y col., 2012), que contiene el gen *pimM* de *S. natalensis* expresado desde el promotor constitutivo *ermE** en el plásmido pIB139. Como control, se integró en *S. clavuligerus* el plásmido pIB139 (Wilkinson y col., 2002), sin el gen *pimM*, obteniendo la cepa *S. clavuligerus*::pIB139. Los exconjugantes obtenidos en ambos casos se seleccionaron por resistencia a apramicina y se comprobaron por amplificación del gen *pimM* en *S. clavuligerus*::*pimM*, con los cebadores PMRBSD y PMRBSR, obteniendo un fragmento de 0,7 kb, y del casete de apramicina en *S. clavuligerus*::pIB139, con los cebadores Am_F y Am_R, que rindieron un amplicón de 0,8 kb (tabla 7.1, Anexo) (figura 4.73). Empleando los mismos cebadores, los fragmentos obtenidos se confirmaron por secuenciación.

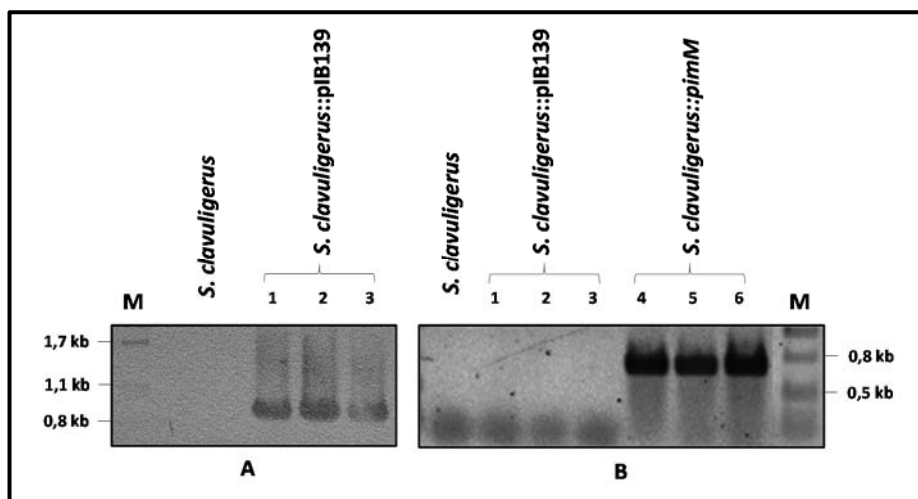


Figura 4.73. Comprobación de la integración de pIB139 y pCP*pimM* en el genoma de *S. clavuligerus* mediante amplificación por PCR del casete de apramicina (A) y del gen *pimM* (B). *S. clavuligerus* como control negativo. Genoma del fago lambda digerido con *Pst*I (M). Exconjugantes analizados de cada una de las dos cepas: *S. clavuligerus*::pIB139 (1-3) y *S. clavuligerus*::*pimM* (4-6).

4.4.4. Comprobación de la expresión heteróloga de *pimM* en *S. clavuligerus*::*pimM*

Una vez integrado el gen *pimM* en el genoma, se analizó su expresión por RT-qPCR en las cepas *S. clavuligerus*::*pimM* y en *S. clavuligerus*::pIB139 (figura 4.74; tabla 7.1, Anexo). Como control interno se empleó el gen cromosomal *rpoD*, un factor sigma cuya expresión en *Streptomyces* se considera constitutiva. En los dos paneles de la figura 4.74 se muestran ambas amplificaciones a través seis curvas que corresponden a dos réplicas biológicas y tres réplicas técnicas de cada una de las cepas (apartado 3.10.3). El amplicón del gen *pimM* en

S. clavuligerus::*pimM* se detectó a partir del ciclo 29 (Ct 29). Con esos mismos cebadores, en *S. clavuligerus*::pIB139 la amplificación se observó a partir del ciclo 36 (Ct 36). El Ct del transcrito *rpoD* fue de 23,9 y 23,5, respectivamente, muy similar en las dos cepas, y los datos normalizados indican una amplificación de *pimM* 78 veces superior en *S. clavuligerus*::*pimM* respecto a *S. clavuligerus*::pIB139, por lo que se interpreta que la señal obtenida en *S. clavuligerus*::pIB139, carente de *pimM*, se debe a una tardía amplificación posiblemente debida a una contaminación cruzada durante el montaje de las reacciones, además de a dímeros de los cebadores (no mostrado). Con estos datos se concluyó que *pimM* se expresa heterológamente en *S. clavuligerus*::*pimM*.

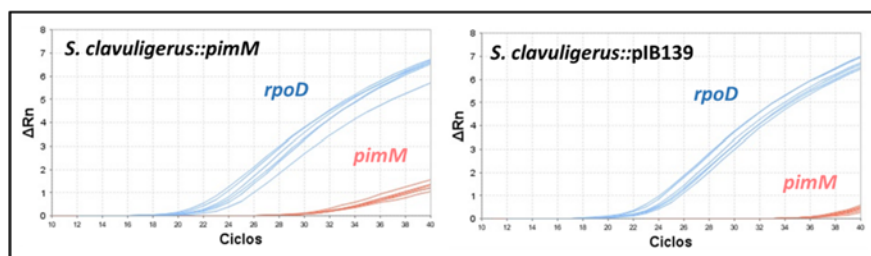


Figura 4.74. Comprobación de la expresión de *pimM*. Se muestran las curvas de amplificación en tiempo real de los genes *pimM* y *rpoD* en las cepas *S. clavuligerus*::*pimM* (gráfica derecha) y *S. clavuligerus*::pIB139 (gráfica izquierda).

La expresión heteróloga del regulador PimM en *S. clavuligerus* no alteró la formación de micelio aéreo ni la esporulación en medio ME como se observa en la figura 4.75.

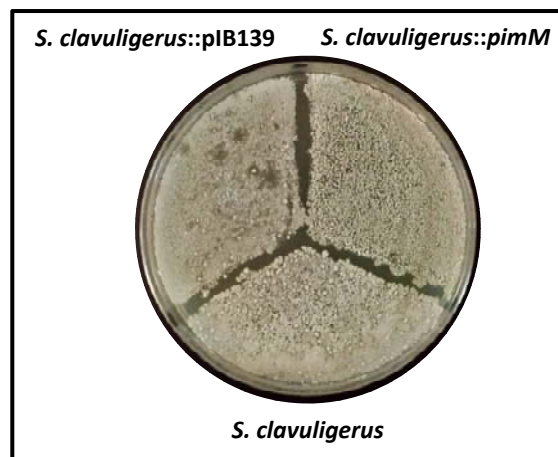


Figura 4.75. Esporulación de *S. clavuligerus*::*pimM*, *S. clavuligerus*::pIB139 y *S. clavuligerus* en medio ME a los 12 días.

4.4.5. Estimación del número de copias de los plásmidos pSCL1, pSCL2 y pSCL4 en *S. clavuligerus::pimM*

Para confirmar que durante el proceso de conjugación e integración de *pimM* no se había alterado el número normal de copias de los plásmidos lineales de *S. clavuligerus*, ni que la expresión del regulador lo altera, se llevó a cabo la amplificación cuantitativa por qPCR (apartado 3.10.3; tabla 7.1, Anexo) de los genes *SclaA2_010100027570* y *SclaA2_010100027590* de pSCL1; *SclaA2_010100027690* y *SclaA2_010100027930* de pSCL2, y *brp* y *parB* de pSCL4. Los genes cromosomales *adpA* y *rpoD* fueron empleados como control.

Se concluyó que el número de copias de los tres plásmidos en ambas cepas fue similar al de la cepa silvestre, con pequeñas oscilaciones entre los genes (figura 4.76). Si bien las amplificaciones de *brp*, 27690 y *adpA* presentaron valores desviados respecto de la cepa silvestre, las barras de error indican que estos valores podrían encontrarse más próximos al valor 1; además, los valores de todos los genes plasmídicos se sitúan lejos de los mostrados en el capítulo 4.2 (figura 4.18) para las cepas *S. clavuligerus claR::aph pSCL^{low}* y *S. clavuligerus oppA2::aph pSCL^{low}* donde se ha demostrado el bajo número de copias de los plásmidos. Esto permite confirmar que los resultados que se observaron en los estudios transcriptómicos y de producción de metabolitos secundarios del presente trabajo no se deben a alteraciones en el número de copias de estos tres plásmidos.

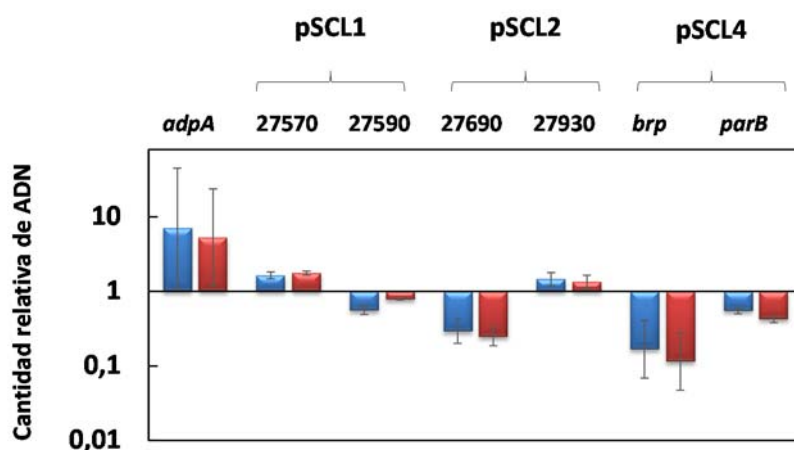


Figura 4.76. Análisis del número de copias de los plásmidos pSCL1, pSCL2 y pSCL4. Cantidad relativa de ADN (escala logarítmica en base 10) medida por qPCR de los genes cromosomal *adpA*, y plasmídicos *SclaA2_010100027570* y *SclaA2_010100027590* (pSCL1), *SclaA2_010100027690* y *SclaA2_010100027930* (pSCL2) y *brp* y *parB* (pSCL4) en *S. clavuligerus::pIB139* (barras azules) y *S. clavuligerus::pimM* (barras rojas). La cantidad relativa de ADN en las dos cepas mutantes fue determinada por comparación con la cepa silvestre *S. clavuligerus*, tomada como valor 1. Para simplificar la figura, la denominación de los genes de pSCL1 y pSCL2 se abrevió usando sus cinco últimos dígitos. La desviación estándar se representa mediante líneas verticales.

4.4.6. Análisis de la producción de nuevos metabolitos secundarios en *S. clavuligerus::pimM*

La producción de metabolitos puede verse favorecida por el cultivo del microorganismo en medio sólido frente al medio líquido (Barrios-González y col., 2003; López-Calleja y col., 2012). Por ello, inicialmente se optó por cultivar las cepas *S. clavuligerus::pimM* y *S. clavuligerus::pIB139* en medios sólidos.

4.4.6.1. Detección de nuevos metabolitos producidos en medio sólido

S. clavuligerus::pimM y su control *S. clavuligerus::pIB139* se cultivaron en medio líquido TSB para obtener un inóculo denso. Un volumen de este cultivo se sembró en medio sólido TSA y, transcurridas 24 horas de cultivo, el micelio se empleó para sembrar en los siguientes medios sólidos disponibles en nuestro laboratorio: TBO, MEY, MS, ME, ISP4, 2xTY, R2YEGm, TSA, R5m y SA. Tras 50, 72 y 96 horas de cultivo, se realizaron bioensayos en taco (apartado 3.9.3.4.1) frente a *C. utilis* y *M. luteus*.

Actividad frente a *C. utilis*. En torno a la muestra de *S. clavuligerus::pimM* cultivado en R2YEGm durante 72 y 96 horas, se detectó un pequeño halo de inhibición (8 mm de diámetro aproximadamente), ausente alrededor de la muestra de los mismos tiempos y medio de la cepa control, *S. clavuligerus::pIB139*. Un halo de tamaño similar (10 mm de diámetro aproximadamente) se produjo en la muestra de *S. clavuligerus::pimM* cultivado en MEY durante 96 horas, pero no en la cepa control. Por lo tanto, PimM parece activar la producción de un metabolito que inhibe el crecimiento de *C. utilis* en los medios R2YEGm y MEY (no mostrado).

Para confirmar la producción de uno o varios compuestos antifúngicos en R2YEGm y MEY, así como para aumentar el umbral de detección en los otros ocho medios analizados, se optó por hacer una extracción con metanol desde el medio sólido en el que estaba creciendo *S. clavuligerus::pimM* tras 96 horas de cultivo, concentrar el extracto hasta una concentración final entre 25-50X (apartado 3.9.3.4.2) y ensayar dichos concentrados frente a *C. utilis*. En el bioensayo se cargaron diferentes cantidades de anfotericina B como control del mismo. De este modo, se observó un gran halo de inhibición en torno a las muestras extraídas y concentradas de *S. clavuligerus::pimM* cultivado en los medios MEY y R2YEGm, ausente en los extractos de TBO, ME, MS e ISP4 (figura 4.77) y los otros cuatro medios de cultivo (no mostrado). Cabe indicar que la producción del compuesto antifúngico no parece estar relacionada con el proceso de esporulación, ya que se observó tanto en medio MEY, en el que *Streptomyces* esporula, como en R2YEGm, en el que no lo hace.

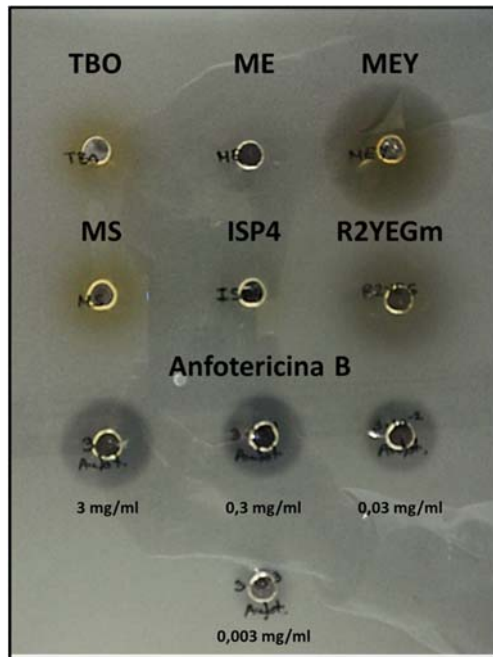


Figura 4.77. Bioensayo frente a *C. utilis* de los extractos concentrados de *S. clavuligerus::pimM* cultivado en TBO, ME, MEY, MS, ISP4 y R2YEGm de izquierda a derecha, y de arriba a abajo. En la parte inferior se incluyeron controles cualitativos positivos de anfotericina B (3; 0,3; 0,03; 0,003 mg/ml).

Tras constatar la actividad antifúngica en estos dos medios de cultivo, se compararon los extractos metanólicos concentrados 25-50X de *S. clavuligerus::pimM* y del control *S. clavuligerus::pIB139* a las 96 horas de crecimiento (apartado 3.9.3.4.2) (figura 4.78). Se observaron halos de inhibición frente a *C. utilis* en los cuatro casos, que fueron de 27 mm en MEY o 21 mm en R2YEGm a partir de *S. clavuligerus::pimM*, frente a un halo menor o casi inapreciable (18 y 9 mm, en R2YEGm y MEY, respectivamente) en *S. clavuligerus::pIB139*. A pesar de que no se trata de un experimento cuantitativo, este bioensayo sugiere que en *S. clavuligerus* la producción de este metabolito antifúngico en ambos medios, pero principalmente en MEY, está activada por la presencia del regulador PimM.

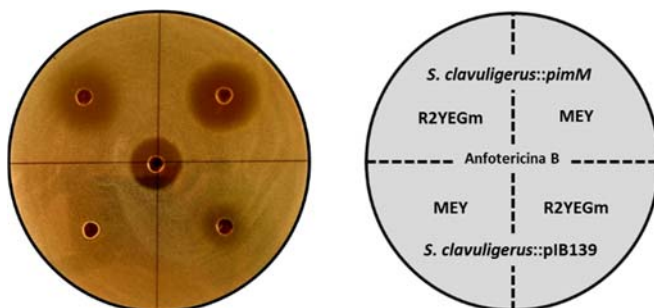


Figura 4.78. Bioensayo frente a *C. utilis* de los extractos concentrados de *S. clavuligerus::pimM* y *S. clavuligerus::pIB139* cultivados en los medios R2YEGm y MEY. El halo central corresponde a 3 mg/ml de anfotericina B.

Actividad frente a *M. luteus*. Con el objetivo de analizar en *S. clavuligerus::pimM* la posible activación de la producción de un compuesto con actividad frente a bacterias Gram positivas, en paralelo a los estudios frente a *C. utilis*, se llevó a cabo un bioensayo con *M. luteus* como indicador (figura 4.79). En el bioensayo se cargaron 5 mg/ml penicilina G como control del mismo. Cabe señalar que, si bien la holomicina es una molécula con actividad antibacteriana sobre Gram positivos, la cepa *S. clavuligerus::pimM* no parece producir este metabolito dado que, como se indicará en el apartado 4.4.7, el nivel de expresión de los genes de dicha agrupación no se vio afectado. En este caso, apenas hubo diferencias entre los halos producidos frente a *M. luteus* entre las dos cepas cultivadas en MEY o R2YEGm, por lo que nos centramos en el estudio del compuesto de naturaleza antifúngica.

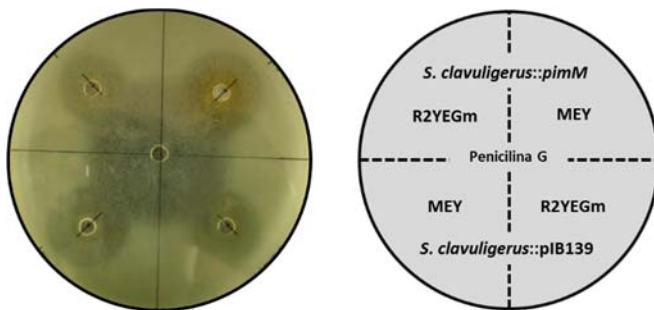


Figura 4.79. Bioensayo frente a *M. luteus* de los extractos concentrados de *S. clavuligerus::pimM* y *S. clavuligerus::pIB139* cultivados en los medios R2YEGm y MEY. El halo central corresponde a 5 mg/ml de penicilina G.

Considerando el papel del regulador PimM en la activación de compuestos antifúngicos de naturaleza poliénica, que presentan un espectro con máximos de absorción característicos en el rango del ultravioleta, y la naturaleza antifúngica del compuesto detectado en los bioensayos, se analizó espectrofotométricamente una dilución 1:100 de los extractos concentrados obtenidos de *S. clavuligerus::pIB139* y *S. clavuligerus::pimM* en MEY y R2YEGm (figura 4.80). Paralelamente, se hizo un control con 0,03 y 0,003 mg/ml de anfotericina B, para observar los picos característicos de dicho polieno a 344, 365, 385 y 410 nm.

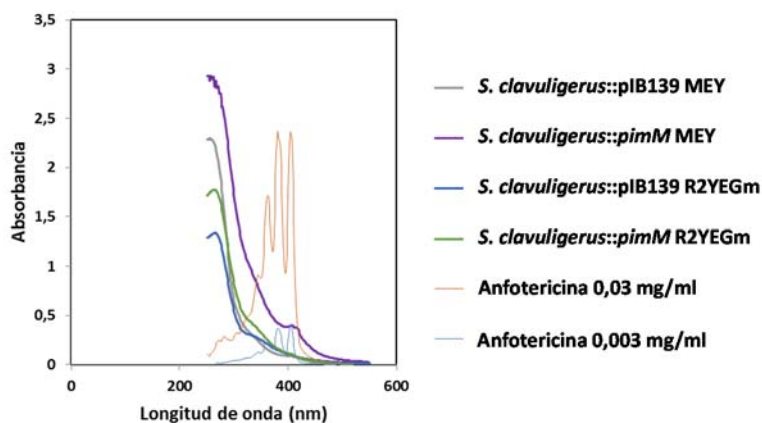


Figura 4.80. Análisis espectrofotométrico de los extractos obtenidos desde cultivos en los medios sólidos MEY y R2YEGm de *S. clavuligerus::pIB139* y *S. clavuligerus::pimM*. Se muestra el perfil de absorción de la anfotericina B.

En ninguno de los cuatro extractos de los mutantes se obtuvo el perfil espectrofotométrico típico de polienos (tres o más máximos de absorción), como sí ocurrió con la anfotericina B, sino un único máximo a 270 nm (figura 4.80). Por ello, el compuesto que inhibe el crecimiento de *C. utilis* (figura 4.78) no parece ser de naturaleza poliénica.

4.4.6.2. Detección de nuevos metabolitos producidos en medio líquido

Una vez observada la actividad antifúngica de los extractos de *S. clavuligerus::pimM* cultivado en los medios sólidos MEY y R2YEGm, y dado que la producción en medio líquido facilita la obtención de una mayor cantidad de masa micelial, y probablemente de compuesto, así como la toma de muestra para los posteriores experimentos de transcriptómica (apartado 4.4.8), se analizó la producción del compuesto antifúngico en estos dos medios líquidos.

El estudio se hizo por separado en el micelio y en el sobrenadante de 120 horas del cultivo en MEY y R2YEGm con el objetivo de identificar la fracción donde se encontraba el compuesto, dado que este, en función de su naturaleza química, podría quedar asociado a la pared celular. Estas muestras se extrajeron con metanol, se concentraron hasta 50-100X (apartado 3.9.3.4.3) y se analizó su actividad frente a *C. utilis*. En ambos tiempos y medios de cultivo la bioactividad se detectó en *S. clavuligerus::pimM*, y no en *S. clavuligerus::pIB139*, y siempre estuvo asociada al micelio (figura 4.81). A partir de este punto, se eligió el medio de cultivo MEY para los siguientes estudios dado que en este se observó un halo de inhibición del crecimiento más definido y ausente o mínimo en la cepa control (figuras 4.78 y 4.81).

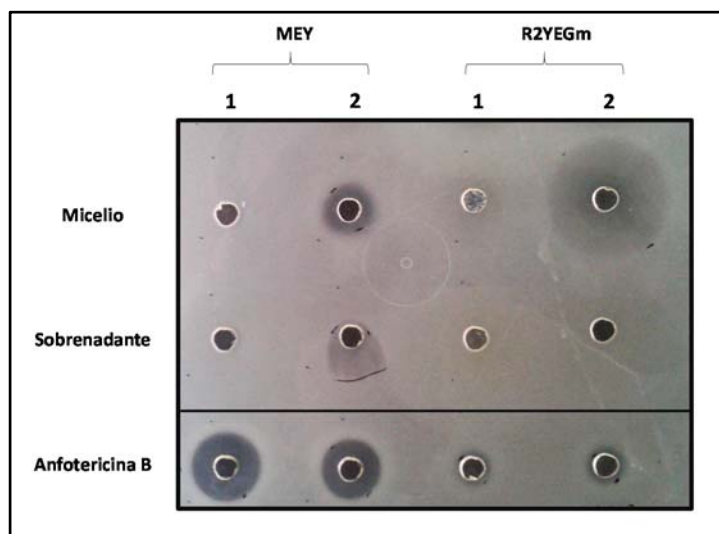


Figura 4.81. Bioensayo frente a *C. utilis* del extracto concentrado desde el micelio y sobrenadante de *S. clavuligerus::pIB139* (1) y *S. clavuligerus::pimM* (2) cultivados en medio líquido MEY y R2YEGm a las 120 horas. En la parte inferior se muestra el control de anfotericina B (3; 0,3; 0,003 y 0,03 mg/ml).

4.4.6.3. Análisis mediante HPLC del compuesto antifúngico producido por *S. clavuligerus::pimM*

Con el fin de purificar el compuesto con actividad antifúngica para su identificación posterior, los extractos concentrados obtenidos del micelio de *S. clavuligerus::pimM*, *S. clavuligerus::pIB139* y *S. clavuligerus* cultivados en medio MEY durante 120 horas fueron separados por HPLC (apartado 3.9.4.5; figura 4.82). Se recogieron las fracciones eluidas en los siguientes rangos de tiempo: 0-3, 3-12, 12-30, 30-35, 35-45, 45-50 y 50-55 minutos. Estas alícuotas se llevaron hasta un volumen final de 100 μ l, lo que representa un factor de concentración de 600 a 7000X respecto al cultivo de partida, en función del volumen de la alícuota recogida, y se analizaron por bioensayo frente a *C. utilis*. De todas las fracciones separadas por HPLC, la alícuota 3-12 minutos de *S. clavuligerus::pimM* dio un claro halo de inhibición, ausente en la misma fracción de *S. clavuligerus* o de *S. clavuligerus::pIB139* (figura 4.82, B). La fracción 12-30 minutos de *S. clavuligerus::pimM* produjo un pequeño halo de inhibición (no mostrado). Como era de esperar de acuerdo a lo observado en el análisis espectrofotométrico en el apartado 4.4.6.1, estas muestras con actividad antifúngica carecieron del perfil de absorción característico de los polienos (no mostrado).

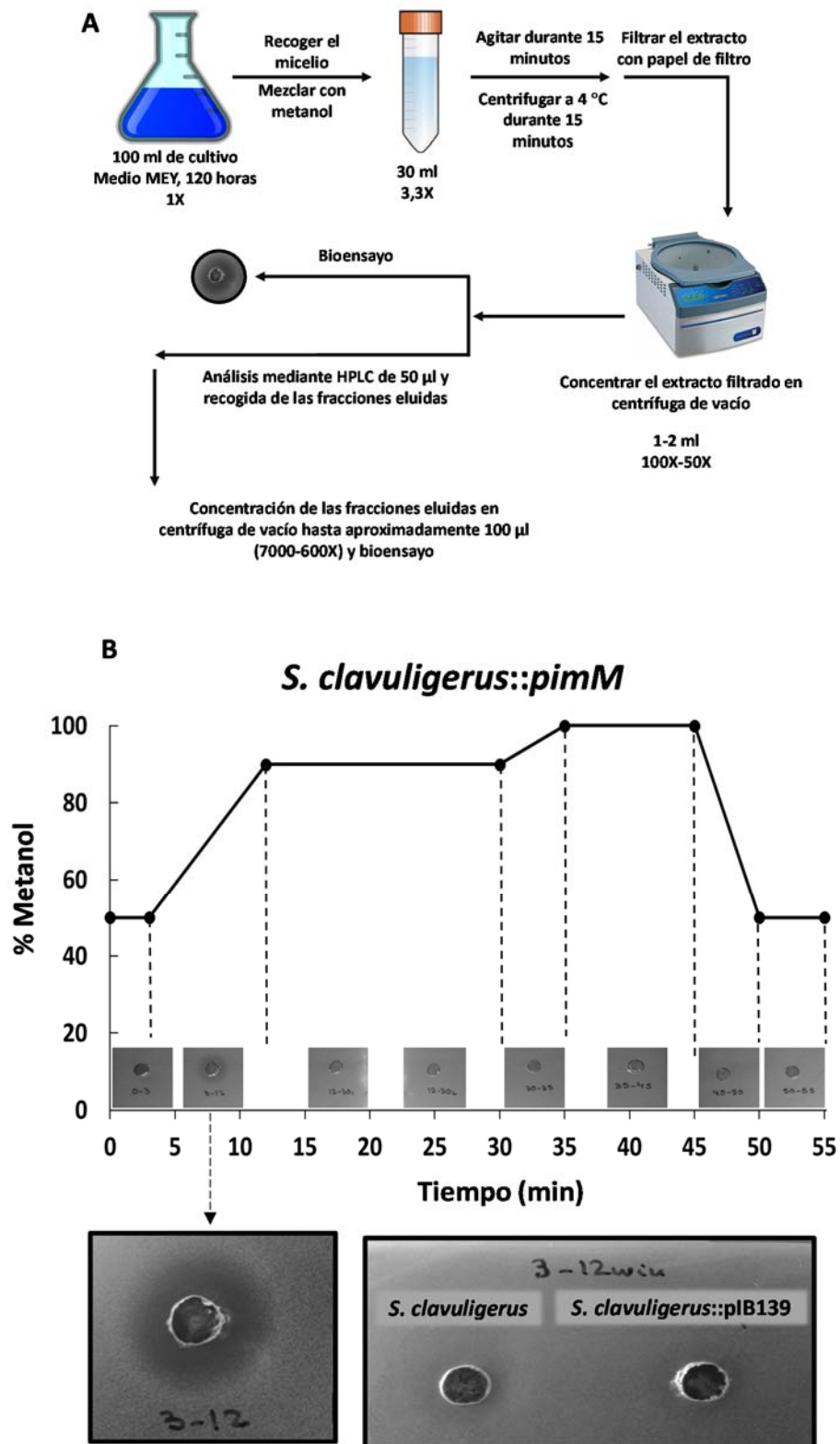


Figura 4.82. Procesamiento de las muestras (A) y fraccionamiento en HPLC y bioensayo frente a *C. utilis* de las fracciones eluidas y concentradas de *S. clavuligerus::pimM* (B). En la parte inferior se amplía el bioensayo del concentrado de las fracciones 3-12 obtenidas desde *S. clavuligerus::pimM* (izquierda) y *S. clavuligerus* y *S. clavuligerus::pIB139* (derecha).

A pesar del resultado positivo obtenido en el procesamiento de las muestras mediante HPLC analítico (figura 4.82), con el objetivo de obtener una mayor cantidad del compuesto en un único análisis cromatográfico, minimizando el tiempo de procesado desde la extracción del mismo hasta su identificación, se purificó el compuesto antifúngico producido por *S. clavuligerus::pimM* en un cultivo de 2,2 litros de medio MEY y 96 horas empleando HPLC preparativo (Fundación Medina, Granada; apartado 3.9.4.5; figura 4.83).

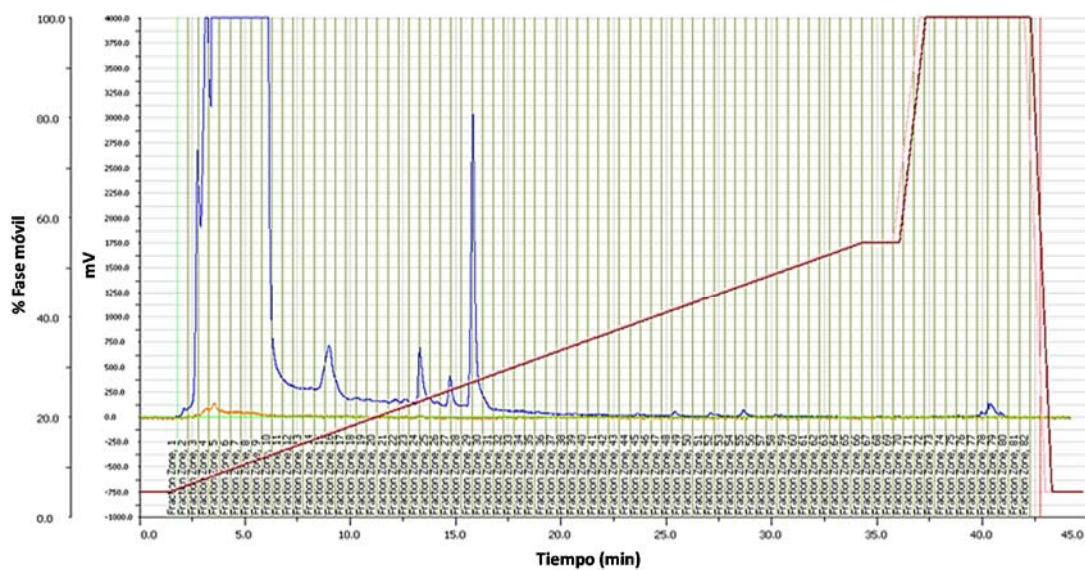


Figura 4.83. Cromatograma a 210 nm del eluido de una columna preparativa de HPLC a partir del extracto concentrado del micelio de *S. clavuligerus::pimM* en medio MEY. Se representa el cromatograma del eluido (línea azul), el porcentaje de fase móvil (acetónitrilo-agua; línea roja), el control con las fases móviles puras (acetónitrilo-línea naranja, agua-línea verde) y las 80 fracciones eluidas recogidas.

Las ochenta fracciones eluidas fueron recogidas y concentradas 3X, como se indica en el apartado 3.9.4.5, y se analizó su actividad frente a *C. utilis*. Las fracciones número 54, 57 y 58 dieron un halo de inhibición de 13, 13 y 12 mm, respectivamente (no mostrado), mientras que las intermedias, 55 y 56, no lo produjeron. Estas tres fracciones con actividad antifúngica se analizaron por cromatografía líquida de alta presión y espectrometría de masas como se indica en el apartado 3.9.4.4 y se identificaron las variantes de tunicamicina V, VII, VIII (figura 4.84). Esto sugirió que la tunicamicina podría ser responsable, además de otras moléculas no detectadas, de la inhibición del crecimiento de *C. utilis*.

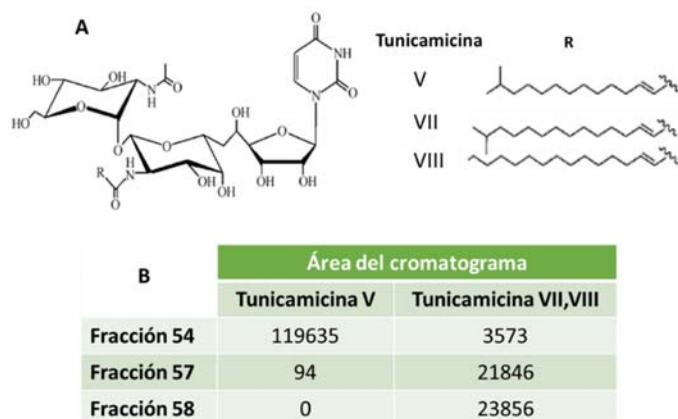


Figura 4.84. Tunicamicina V, VII y VIII presente en las fracciones 54, 57 y 58 con actividad frente a *C. utilis* obtenidas mediante HPLC preparativo. Se indica la estructura de las tres variantes de tunicamicina detectadas (A) y el área bajo la curva correspondiente a las variantes V o VII y VIII en las tres fracciones analizadas (B).

Sin embargo, empleando el mismo procedimiento de identificación de compuestos, indicado en el apartado 3.9.4.4, en los extractos concentrados 50-100X de *S. clavuligerus::pimM* y *S. clavuligerus::pIB139*, con y sin actividad frente a *C. utilis*, respectivamente, descritos en la figura 4.82 A, se detectaron niveles de tunicamicina V, VII y VIII similares en ambas muestras (no mostrado). Por lo tanto, este compuesto no parece ser el responsable de la actividad antifúngica producida por *S. clavuligerus::pimM*.

El género *Streptomyces* presenta un gran potencial para biosintetizar nuevos productos bioactivos, de los cuales solo han sido descubiertos el 10 % (Watve y col., 2001). En *S. clavuligerus* se han descrito agrupaciones génicas de metabolitos secundarios que parecen ser completamente nuevas o con características que no habían sido descritas anteriormente (Medema y col., 2010). Considerando los aproximadamente 800 compuestos descritos y presentes en la base de datos con la que se compararon los espectros de masas obtenidos de la muestra de *S. clavuligerus::pimM* con actividad antifúngica, el compuesto responsable de la actividad frente a *C. utilis* podría tratarse o bien de una molécula no presente en dicha base de datos, o bien de una nueva molécula no descrita.

4.4.7. Análisis de la producción de ácido clavulánico y cefamicina C en *S. clavuligerus::pimM*

El ácido clavulánico y la cefamicina C son dos metabolitos que no presentan la naturaleza poliélica característica de la pimaricina, la anfotericina, la filipina, la nistatina y la candidina, o policetílica de la antimicina, compuestos cuya biosíntesis es activada por el regulador PimM. Sin embargo, con el objetivo de analizar el efecto de este regulador sobre la producción de estas dos moléculas de tipo β -lactama, se cultivaron *S. clavuligerus::pimM* y *S. clavuligerus::pIB139* en el medio de producción MEY y se analizaron los caldos por bioensayo (figura 4.85).

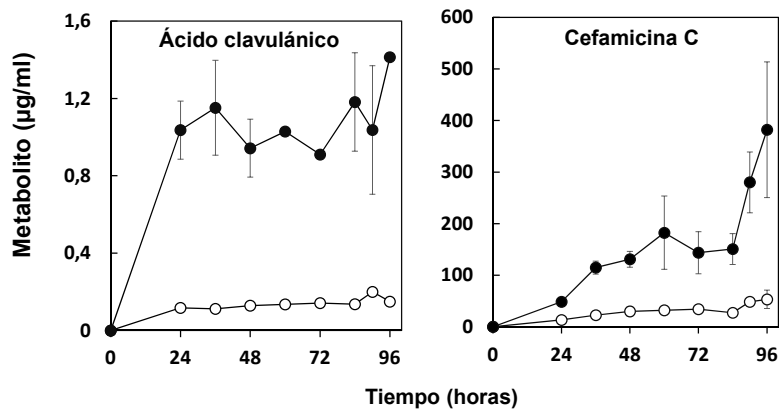


Figura 4.85. Producción volumétrica de ácido clavulánico y cefamicina C en medio MEY por *S. clavuligerus::pimM* (círculos negros) y *S. clavuligerus::pIB139* (círculos blancos). La desviación estándar de cada punto se representa mediante líneas verticales.

Sorprendentemente, la producción de los dos metabolitos fue mayor en *S. clavuligerus::pimM* respecto al control *S. clavuligerus::pIB139* (figura 4.85), siendo en el caso del ácido clavulánico entre 5 y 10 veces superior a lo largo de la fermentación y en el de la cefamicina C desde 3,6 hasta 7 veces superior entre las 24 y las 96 horas. De este modo, se demostró que PimM tiene un efecto regulador sobre agrupaciones génicas de metabolitos secundarios de naturaleza no policetídica.

Si bien estas producciones han sido cuantificadas en medio MEY (figura 4.85), elegido para la obtención del compuesto antifúngico, los niveles obtenidos de ambos metabolitos sugieren que el cultivo de *S. clavuligerus::pimM* en los medios óptimos de producción de ácido clavulánico y cefamicina C, SA y TSB, respectivamente, rendirían niveles superiores de los mismos respecto a la cepa silvestre. Por otro lado, la expresión heteróloga del regulador PimM no activó la biosíntesis de holomicina (no mostrado).

4.4.8. Análisis transcriptómico del efecto de PimM sobre el genoma de *S. clavuligerus*

Con el fin identificar la agrupación génica responsable de la producción del compuesto antifúngico y analizar el efecto regulador de PimM sobre la expresión génica global, se llevó a cabo un análisis transcriptómico diferencial entre *S. clavuligerus::pimM* y su control *S. clavuligerus::pIB139* mediante micromatrices. Para ello se cultivaron dos réplicas biológicas de ambas cepas en medio MEY de las que se comprobó la producción de ácido clavulánico y cefamicina C (figura 4.85), así como la del compuesto con actividad antifúngica a las 108 horas

(no mostrado). Se eligieron los tiempos de 84, 90 y 96 horas de la fermentación para llevar a cabo el análisis transcriptómico.

El ARN empleado para la hibridación de las micromatrices se extrajo del micelio de *S. clavuligerus::pimM* y su control, *S. clavuligerus::pIB139*, cultivados en medio MEY, a las 84, 90 y 96 horas. El análisis para cada condición, dos cepas y tres tiempos de estudio, se llevó a cabo con dos réplicas biológicas. El marcaje del ARN con Cy3-dCTP y del ADN genómico, como muestra de referencia, con Cy5-dCTP se realizó como se indica en los apartados 3.10.4.3 y 3.10.4.4. El diseño de las micromatrices empleadas en el presente capítulo, el marcaje de los ácidos nucleicos, la hibridación de los mismos, el lavado y la lectura de las micromatrices, así como la normalización y el análisis de los datos obtenidos se describe en el apartado 4.2.6.

Los valores de transcripción M_g de las seis condiciones experimentales, dos cepas y tres tiempos, se compararon utilizando tres contrastes: la cepa mutante, *S. clavuligerus::pimM*, frente a la cepa control, *S. clavuligerus::pIB139*, en los tres tiempos de estudio (84, 90 y 96 horas). Para cada gen, se calcularon los valores p BH-correctados y los valores M_c (tres grupos de dos valores, uno para cada contraste). Como se indicó en el apartado 4.2.6, un valor de M_c igual a +1 indica que un determinado gen se está transcribiendo dos veces más en el mutante, o cepa de estudio, que el mismo gen en el control, y un valor M_c negativo equivale a una disminución del nivel de transcrito del gen en la cepa de estudio respecto al control. Para cada contraste, un resultado fue considerado como estadísticamente significativo si el valor p BH-correctado era $\leq 0,1$. Los datos de las micromatrices obtenidos en este estudio de expresión diferencial entre *S. clavuligerus::pimM* y *S. clavuligerus::pIB139* serán próximamente depositados en la base de datos *National Center for Biotechnology Information-Gene Expression Omnibus*.

Con el objetivo de restringir los datos analizados a aquellos genes que se vieron significativamente afectados por la expresión heteróloga del regulador PimM en al menos uno de los tres tiempos de estudio, los resultados transcriptómicos se filtraron aplicando el criterio $M_c \geq 1,0$ (genes sobreexpresados) o $M_c \leq -1,0$ (genes subexpresados) y un valor p BH-correctado $\leq 0,1$. De este modo, 18 genes se activaron y 57 se reprimieron en el mutante *S. clavuligerus::pimM* respecto a *S. clavuligerus::pIB139* en alguno de los tres tiempos analizados (figura 4.86).

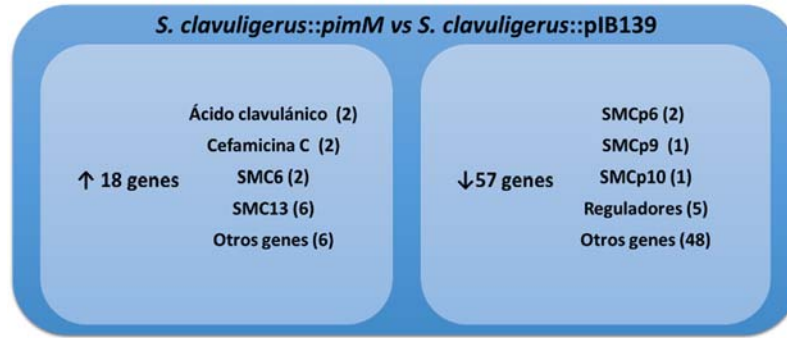


Figura 4.86. Esquema de los genes diferencial y significativamente expresados en la comparación de *S. clavuligerus::pimM* con *S. clavuligerus::pIB139*. Número de genes sobreexpresados (panel izquierdo, flecha hacia arriba) y subexpresados (panel derecho, flecha hacia abajo). Se indica el número de genes afectados pertenecientes a las agrupaciones génicas de metabolismo secundario, al grupo de reguladores o con funciones diversas en la célula.

En la figura 4.86 se indica el número de genes significativamente afectados que, o bien pertenecen a alguna de las agrupaciones de metabolitos secundarios, o bien presentan una función reguladora o diversa en la célula. Sin embargo, además de estos genes, se analizaron también aquellos que forman parte de alguna de las agrupaciones génicas de metabolitos secundarios y cuyo cambio de expresión fue $M_c \geq 1,0$ o $M_c \leq -1,0$ en *S. clavuligerus::pimM* en alguno de los tres tiempos analizados, a pesar de no ser estadísticamente significativo (valor p BH-correctado $> 0,1$).

El nivel de significación, p BH-correctado, así como los valores M_c y el cambio de expresión en número de veces para cada gen comentado en el presente apartado se indican en la tabla 7.12 del anexo, para los genes de agrupaciones de metabolitos secundarios, y en las tablas 7.13 y 7.14 del anexo, para los genes reguladores y con funciones diversas en la célula, respectivamente. El cambio de expresión de los genes descritos en el este capítulo es indicada siempre mostrando el valor en el mutante *S. clavuligerus::pimM* respecto a *S. clavuligerus::pIB139* a las 90 horas, a no ser que se indique otro de los tiempos analizados.

4.4.8.1. Transcripción diferencial de las agrupaciones génicas de ácido clavulánico, clavamas y SMCp25

Todos los genes biosintéticos de la agrupación génica del ácido clavulánico se vieron fuertemente sobreexpresados, entre 1,5 y 8 veces en los tres tiempos analizados (figura 4.87), lo que parece explicar el aumento de la producción de ácido clavulánico en *S. clavuligerus::pimM*, hasta diez veces superior a la del control *S. clavuligerus::pIB139* (figura 4.85). Los genes para las etapas tempranas de la ruta (*ceaS2*, *bls2*, *pah2*, *cas2*) presentaron una

sobreexpresión media de 4 veces, ligeramente inferior a la de los genes para las etapas tardías (*gcaS*, *orf16*, *orf14*, *orf13*, *orf12*, *cyp-fd*, *car*) que se sobreexpresaron 5 veces. Las dos oligopéptido permeasas codificadas por los genes *oppA1* y *oppA2* (Lorenzana y col., 2004) presentaron los mayores niveles de sobreexpresión de la agrupación (7 y 6 veces, respectivamente). Los genes *claR* y *orf16* fueron los afectados de modo estadísticamente significativo en esta agrupación y vieron incrementada su expresión 3,2 y 6 veces, respectivamente (figura 4.87; tabla 7.12, Anexo).

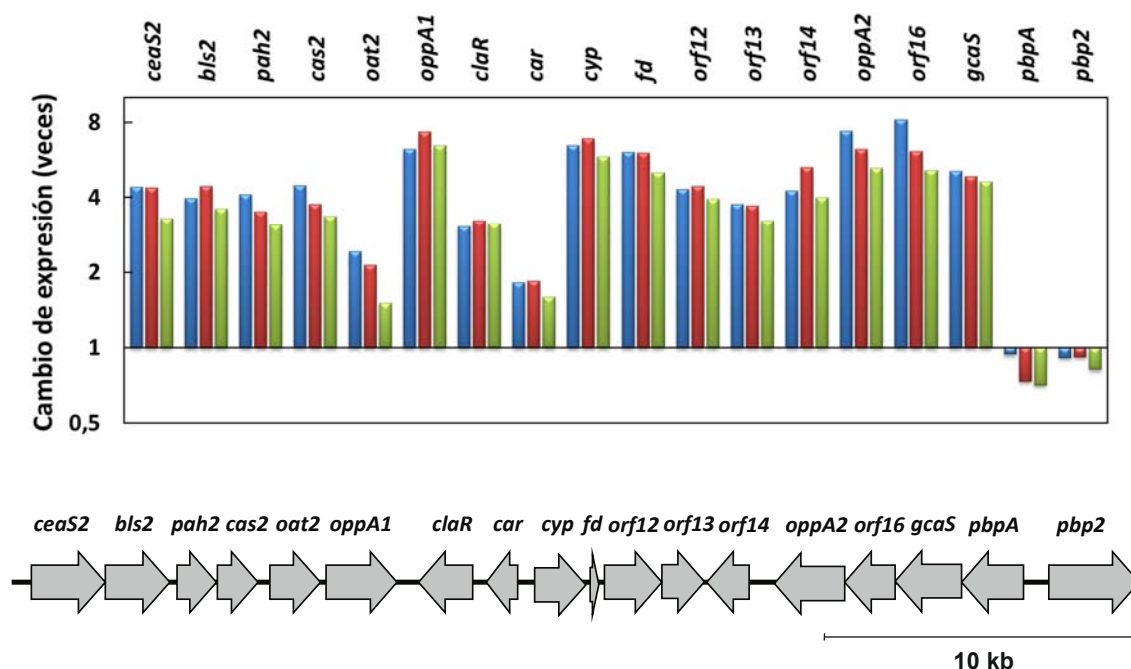
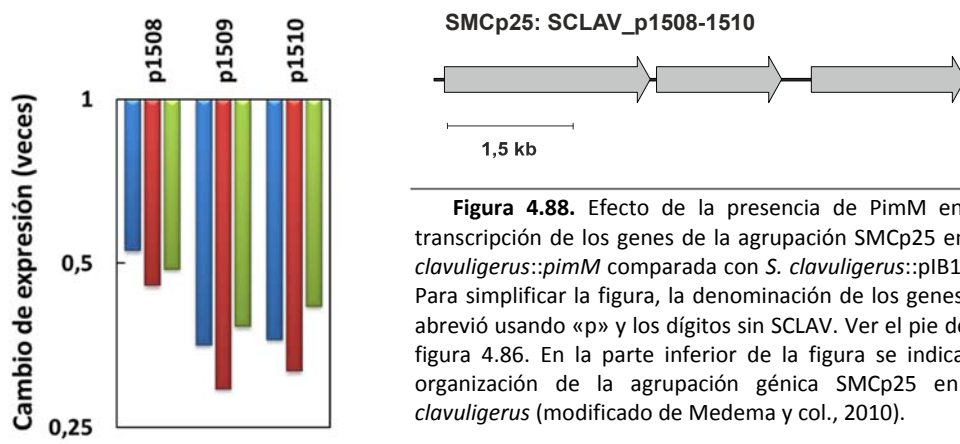


Figura 4.87. Efecto de la presencia de PimM en la transcripción de los genes de la agrupación del ácido clavulánico en *S. clavuligerus::pimM* comparada con *S. clavuligerus::pIB139*. Las barras representan la media de los niveles de expresión relativa (escala logarítmica en base 2) a las 84 horas (barras azules), 90 horas (barras rojas) y 96 horas (barras verdes). El nombre o código SCLAV del gen correspondiente se indica en la parte superior de las barras. Cada valor se compara con el correspondiente en la cepa control, *S. clavuligerus::pIB139*, tomado como valor 1. En la parte inferior de la figura se indica la organización de la agrupación génica del ácido clavulánico en *S. clavuligerus*.

Las agrupaciones génicas de clavamas y paráloga de clavamas apenas vieron afectado su nivel de expresión (tabla 7.12, Anexo). La agrupación génica SMCp25 (SCLAV_p1508 a SCLAV_p1510) (Medema y col., 2010) subexpresó sus tres genes una media de 0,34 veces, incluyendo el que codifica una clavaminato sintasa oxigenasa (figura 4.88). Si bien esta agrupación podría estar implicada en la biosíntesis de un nuevo compuesto de tipo β -lactámico (Medema y col., 2010), resulta llamativo la represión de sus tres genes dada la activación de la agrupación del ácido clavulánico y la ausencia de efecto en la de clavamas, que igualmente contienen un gen para clavaminato sintasa, lo que indica ciertas diferencias en la regulación de estas tres agrupaciones.



4.4.8.2. Transcripción diferencial de la agrupación génica de la cefamicina C

Todos los genes de la agrupación génica de la cefamicina C, excepto *pcd*, que no se vio afectado, y *pcbR*, que se reprimió 0,4 veces, se activaron una media de 4,6 veces (figura 4.89), lo que explica el notable aumento en la producción de cefamicina C en *S. clavuligerus*::*pimM* (hasta 7 veces) (figura 4.85). Los genes *cmcl* y *cmcl*, que codifican un complejo de dos proteínas que cataliza en dos pasos consecutivos el último paso de la biosíntesis de cefamicina C y han sido empleados recientemente en la mejora de la producción de 7α - metoxicefalosporinas en *S. clavuligerus* (Shao y col., 2014), fueron los más sobreexpresados. Los genes *cmcH* y *cefF* fueron los afectados de modo estadísticamente significativo en esta agrupación (tabla 7.12, Anexo).

El gen regulador de la superagrupación de cefamicina C-ácido clavulánico, *ccaR*, incrementó su transcripción 2,3 veces (figura 4.89). El promotor de *ccaR* contiene una secuencia, CCTTGAATTCTGTG, con una cierta similitud con la secuencia consenso del sitio de unión de PimM descrita por Santos-Aberturas y col. (2011b). Sin embargo su valor R_i , estimación del grado de conservación de la secuencia respecto a la matriz de puntuación del sitio de unión de PimM

al ADN (Santos-Aberturas y col., 2011b; Santos-Aberturas, 2011), es muy bajo, de 2,02 bits, lo que por sí solo no parece justificar el notable aumento de las producciones tanto de ácido clavulánico, esta última mediada por la sobreexpresión de *claR*, como se mostró en el apartado anterior, como de cefamicina C (figura 4.85).

Sorprendentemente, los genes de la superagrupación cefamicina C-ácido clavulánico presuntamente implicados en la resistencia a antibióticos β -lactámicos (*pbpA*, *pbp2*, *pcbR*) se subexpresaron en presencia de PimM (figuras 4.87 y 4.89).

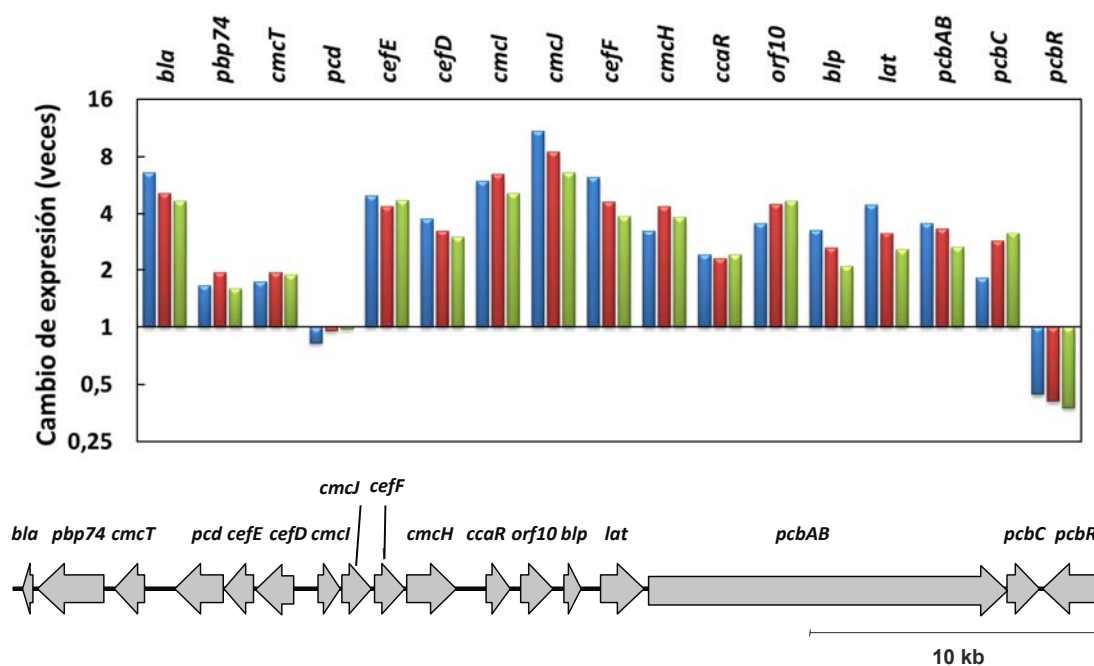


Figura 4.89. Efecto de la presencia de PimM en la transcripción de los genes de la agrupación de cefamicina C en *S. clavuligerus::pimM* comparada con *S. clavuligerus::pIB139*. Ver el pie de la figura 4.87. En la parte inferior de la figura se indica la organización de la agrupación génica de la cefamicina C en *S. clavuligerus*.

De modo similar a lo observado en la cepa *S. clavuligerus* DS48802 (Medema y col., 2011), obtenida mediante mutagénesis aleatoria y seleccionada para la producción industrial de ácido clavulánico, en *S. clavuligerus::pimM* casi todos los genes biosintéticos de la superagrupación cefamicina C-ácido clavulánico, así como los reguladores *claR* y *ccaR*, presentaron una sobreexpresión entre 2 y 8 veces superior a la de la cepa control (figura 4.87 y 4.89). Además, otros genes afectados en esta cepa de producción industrial también lo estuvieron en *S. clavuligerus::pimM* aunque sin pasar el filtro p BH-correctado $\leq 0,1$; estos genes fueron: el regulador pleiotrópico *adpA* y el activador específico de ruta *phoU*, 2,3 y 2,7 veces sobreexpresados, respectivamente, y el transportador de fosfato SCLAV_3169, 2 veces

sobreexpresado a las 87 horas. Sin embargo, a diferencia de la cepa industrial, en la que tanto la agrupación de clavamas como la agrupación paróloga de clavamas se sobreexpresaron (Medema y col., 2011), en *S. clavuligerus::pimM* solo los genes *orfB* y *ceaS1*, un regulador de la familia YjgF y la primera enzima de la ruta biosintética de clavamas, ambos de la agrupación paróloga de clavamas, se sobreexpresaron 2 veces a las 84 horas. Adicionalmente, el gen *cvmP*, una probable arginina deiminasa, de la agrupación de clavamas también se sobreexpresó 2 veces (tabla 7.12, Anexo).

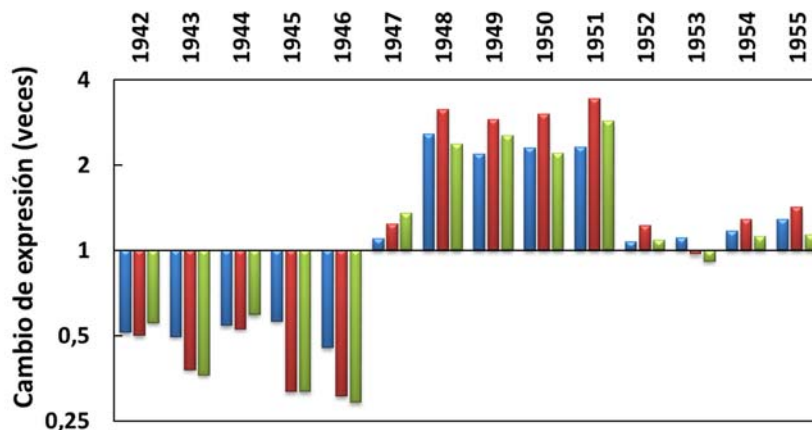
4.4.8.3. Otras agrupaciones génicas de metabolitos secundarios afectadas por la presencia de PimM

De las 49 agrupaciones génicas de metabolismo secundario descritas en *S. clavuligerus* (Medema y col., 2010; Chen y col., 2010), además de SMC10 (ácido clavulánico), SMC11 (cefamicina C) y SMCp25, aquellas que vieron afectada su expresión por la presencia de PimM, aunque no de manera significativa, fueron seis: SMC6, SMC13 SMC14 y SMCp5, activadas, y SMC22 y SMCp6, reprimidas.

4.4.8.3.1. Agrupaciones génicas activadas

➤ Agrupación SMC6

Dentro de esta agrupación, que comprende los genes SCLAV_1942-SCLAV_1955 (Medema y col., 2010), SCLAV_1948-SCLAV_1951 son ortólogos de *desABCD* que constituyen la agrupación génica de la nocardamina, también llamada desferroxiamina E, de *S. coelicolor* (Barona-Gómez y col., 2004). Este bloque de cuatro genes se sobreexpresó 3 veces de media; sin embargo, SCLAV_1942-SCLAV_1946 redujeron su expresión a 0,4 veces de media y el nivel de transcripción de SCLAV_1952-SCLAV_1955 no varió. El gen que codifica la nocardamina sintetasa (SCLAV_1951) fue el que presentó el mayor nivel de cambio de expresión en esta agrupación (3,4 veces; figura 4.90). Los genes SCLAV_1949 y SCLAV_1951 fueron los afectados de modo estadísticamente significativo en esta agrupación (tabla 7.12, Anexo).



SMC6: SCLAV_1942-1955

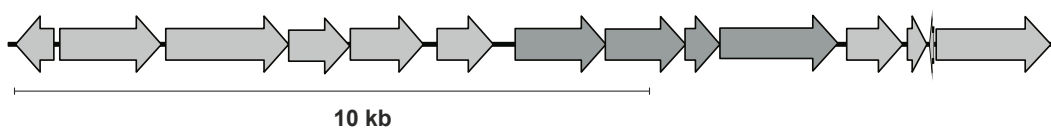


Figura 4.90. Efecto de la presencia de PimM en la transcripción de los genes de la agrupación SMC6 en *S. clavuligerus::pimM* comparada con *S. clavuligerus::pIB139*. Para simplificar la figura, la denominación de los genes se abrevió usando los dígitos sin SCLAV. Ver el pie de la figura 4.87. En la parte inferior de la figura se indica la organización de la agrupación génica SMC6 en *S. clavuligerus* (modificado de Medema y col., 2010). En gris oscuro se indican los cuatro genes ortólogos de los que constituyen la agrupación de nocardamina en *S. coelicolor* (Barona-Gómez y col., 2004).

Debido a la activación de la transcripción de los genes de nocardamina se decidió analizar la producción de este compuesto en *S. clavuligerus::pimM* y su control. Los extractos metanólicos del micelio de ambas cepas cultivadas en medio MEY durante 84 horas de fermentación fueron analizados por HPLC utilizando un patrón de nocardamina (figura 4.91; apartado 3.9.4.3). La cepa *S. clavuligerus::pimM* produjo aproximadamente un 30 % más de nocardamina que su control, lo que resulta coherente con el incremento de la transcripción de los genes SCLAV_1948 a SCLAV_1951. Sin embargo, la nocardamina, compuesto que parece estimular el desarrollo y crecimiento en *Streptomyces* (Yamanaka y col., 2005), no presenta actividad frente a *C. utilis* como se comprobó mediante bioensayo con el patrón de nocardamina (no mostrado), por lo que se descarta que este sea el compuesto antifúngico cuya producción es activada por PimM en nuestro mutante.

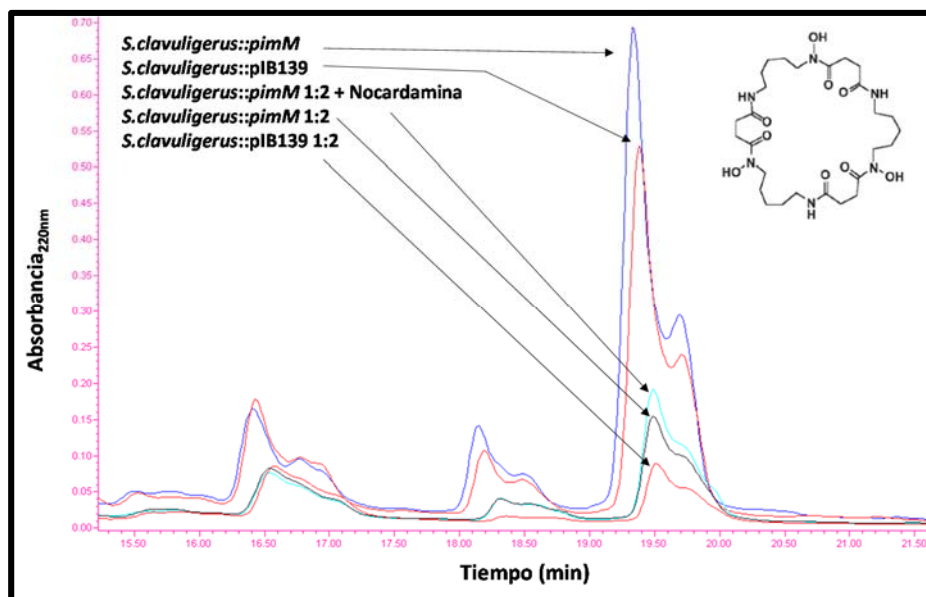


Figura 4.91. Cromatograma a 220 nm del extracto concentrado del micelio obtenido en medio MEY tras 84 horas eluido desde una columna analítica del HPLC. Se representan los extractos de *S. clavuligerus*::*pimM* en línea azul oscuro, de *S. clavuligerus*::*pIB139* en línea roja, de *S. clavuligerus*::*pimM* diluido 1:2 y con patrón de nocardamina en línea azul claro, de *S. clavuligerus*::*pimM* diluido 1:2 en línea negra, y de *S. clavuligerus*::*pIB139* diluido 1:2 en línea roja, de mayor a menor altura de pico.

➤ Agrupación SMC13

Esta agrupación está presuntamente implicada en la biosíntesis de un compuesto mixto policétido-péptido no ribosomal ya que contiene un gen, SCLAV_4466, que codifica una enzima con actividad PKS-NRPS (Medema y col., 2010). Un total de 6 genes pertenecientes a esta agrupación, SCLAV_4464 y SCLAV_4467-4471, presentaron valores de M_c positivos estadísticamente significativos (tabla 7.12, Anexo). Los bloques de genes SCLAV_4461-SCLAV_4462 y SCLAV_4464-SCLAV_4472 experimentaron una sobreexpresión media de 2 y 5 veces, respectivamente (figura 4.92). Sin embargo, desde SCLAV_4473 hasta SCLAV_4486 se observó una reducción media de la expresión de 0,6 veces en casi todos los genes. Curiosamente, SCLAV_4467 y SCLAV_4468, dos deshidrogenasas/reductasas de cadena corta, experimentaron la mayor activación de la agrupación, aproximadamente 7 veces por encima de la cepa control. Por otro lado, SCLAV_4466, que codifica la proteína modular híbrida NRPS/PKS, y que podría tener un importante papel en la ruta biosintética del producto final codificado en esta agrupación, se sobreexpresó 4 veces respecto a la cepa parental (figura 4.92). Además, SCLAV_4464, que codifica un regulador transcripcional de la familia LuxR se sobreexpresó 4 veces. Sin embargo, el análisis *in silico* del promotor de SCLAV_4464 no reveló la existencia de sitios de unión de PimM, por lo que este regulador estaría ejerciendo una activación indirecta

sobre SCLAV_4464. Esta agrupación podría codificar un metabolito híbrido péptido no ribosomal-policétido (Medema y col., 2010), por lo tanto es una agrupación génica candidata a ser la responsable de la producción del compuesto con actividad antifúngica detectado en los bioensayos (apartado 4.4.6).

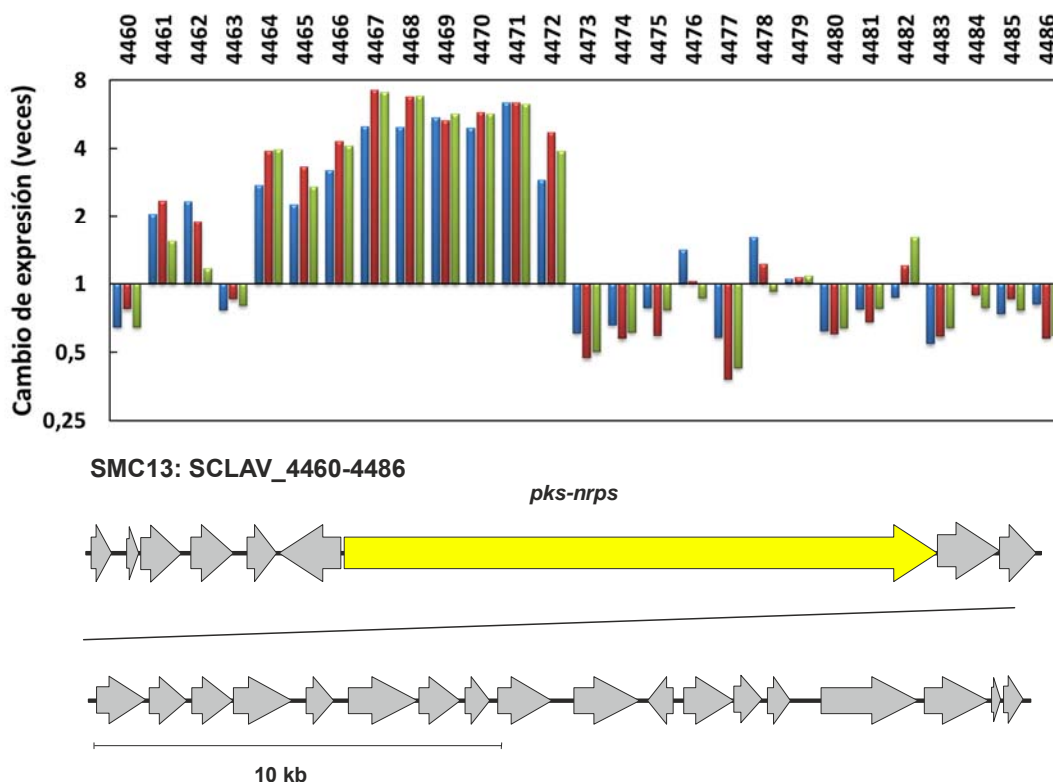


Figura 4.92. Efecto de la presencia de PimM en la transcripción de los genes de la agrupación SMC13 en *S. clavuligerus*::*pimM* comparada con *S. clavuligerus*::pIB139. Para simplificar la figura, la denominación de los genes se abrevió usando los dígitos sin SCLAV. Ver el pie de la figura 4.87. En la parte inferior de la figura se indica la organización de la agrupación génica SMC13 en *S. clavuligerus* con el gen que codifica la PKS-NRPS resaltado en color amarillo (modificado de Medema y col., 2010).

➤ Agrupación SMCp5

Esta agrupación comprende los genes SCLAV_p0509-SCLAV_p0520 y es presuntamente responsable de la biosíntesis de un metabolito de tipo policétido ya que contiene dos genes, SCLAV_p0511 y SCLAV_p0512, que codifican policétido sintasas, y otro, SCLAV_p0513, una cetorreductasa (Medema y col., 2010). Los doce genes de la agrupación experimentaron un cambio de expresión entre 2 y 4 veces a las 90 y 96 horas, que en ningún caso fue estadísticamente significativo (figura 4.93). El posible policétido sintetizado podría ser el responsable de la actividad antifúngica detectada en los bioensayos (apartado 4.4.6).

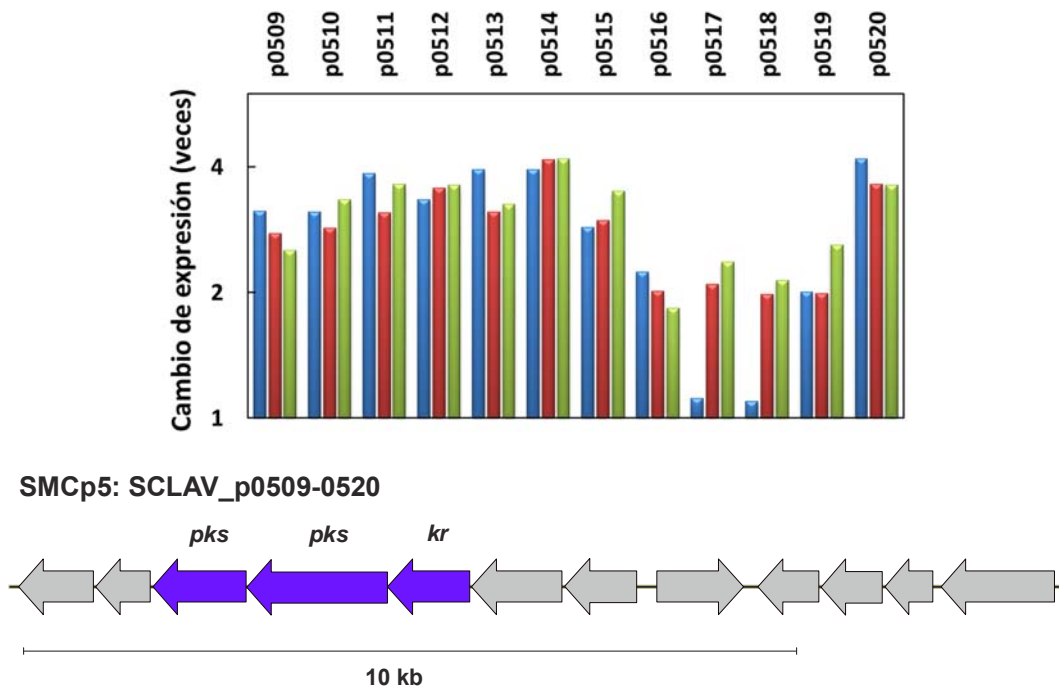


Figura 4.93. Efecto de la presencia de PimM en la transcripción de los genes de la agrupación SMCp5 en *S. clavuligerus::pimM* comparada con *S. clavuligerus::pIB139*. Para simplificar la figura, la denominación de los genes se abrevió usando «p» y los dígitos sin SCLAV. Ver el pie de la figura 4.87. En la parte inferior de la figura se indica la organización de la agrupación génica SMCp5 en *S. clavuligerus* con los genes que codifican las PKSs y la cetorreductasa (kr) resaltados en color azul (modificado de Medema y col., 2010).

➤ Agrupación SMC14

De las cuatro agrupaciones sobreexpresadas por la expresión heteróloga de *pimM*, SMC14, aunque activó entre 2 y 4 veces en los tres tiempos de análisis la transcripción de 5 de sus 19 genes (SCLAV_4751-4753 y SCLAV_4755-4757), no vio afectada la expresión de su sintasa (SCLAV_4742) ni de dos de sus tres sintetisas de péptidos no ribosomales (SCLAV_4749, SCLAV_4750, SCLAV_4758), enzimas que podrían ser claves en la correspondiente ruta biosintética. La tercera NRPS, SCLAV_4750, aumentó ligeramente su nivel de transcripción (figura 4.94). Los genes de esta agrupación no se vieron afectados de modo estadísticamente significativo (tabla 7.12, Anexo).

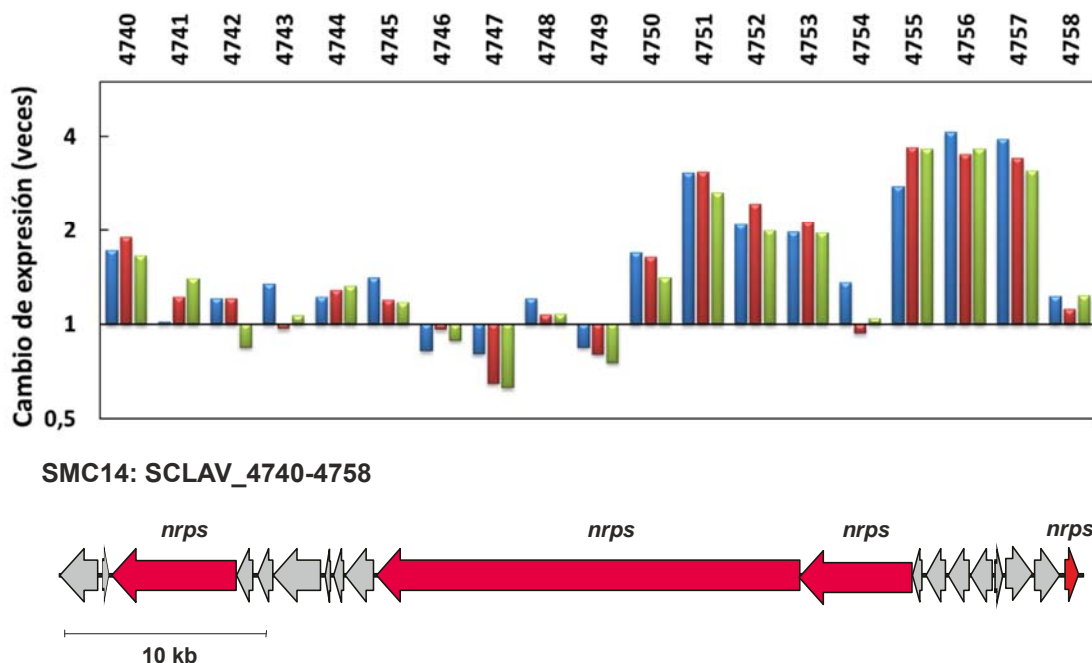


Figura 4.94. Efecto de la presencia de *PimM* en la transcripción de los genes de la agrupación SMC14 en *S. clavuligerus::pimM* comparada con *S. clavuligerus::pIB139*. Para simplificar la figura, la denominación de los genes se abrevió usando los dígitos sin SCLAV. Ver el pie de la figura 4.87. En la parte inferior de la figura se indica la organización de la agrupación génica SMC14 en *S. clavuligerus* con los genes que codifican las NRPS resaltados en color rojo (modificado de Medema y col., 2010).

4.4.8.3.2. Agrupaciones génicas reprimidas

Las agrupaciones SMCp6 y SMC22 redujeron la expresión de todos o algunos de sus genes. Por un lado, SMCp6 (SCLAV_p0563-SCLAV_p0588) subexpresó 6 de sus 24 genes (SCLAV_p0563-SCLAV_p0568) entre 0,04 y 0,4 veces, entre los que se encuentra SCLAV_p0564, la sintasa de péptidos no ribosomales de la agrupación, y SCLAV_p0568, un regulador transcripcional de la familia IclR fuertemente reprimido por la presencia de PimM (figura 4.95). En esta agrupación, SCLAV_p0563 y SCLAV_p0568 presentaron afectado su nivel de transcripción de modo estadísticamente significativo. Por otro, todos los genes de SMC22 (SCLAV_5670-SCLAV_5674) se reprimieron entre 0,3 y 0,6 veces en los tres tiempos de estudio (figura 4.96), aunque ninguno de ellos significativamente (tabla 7.12, Anexo). En la tabla 7.14 del anexo se incluyen los genes significativamente afectados SCLAV_p0762 y SCLAV_p0983, pertenecientes a las agrupaciones SMCp9 y SMCp10, respectivamente.

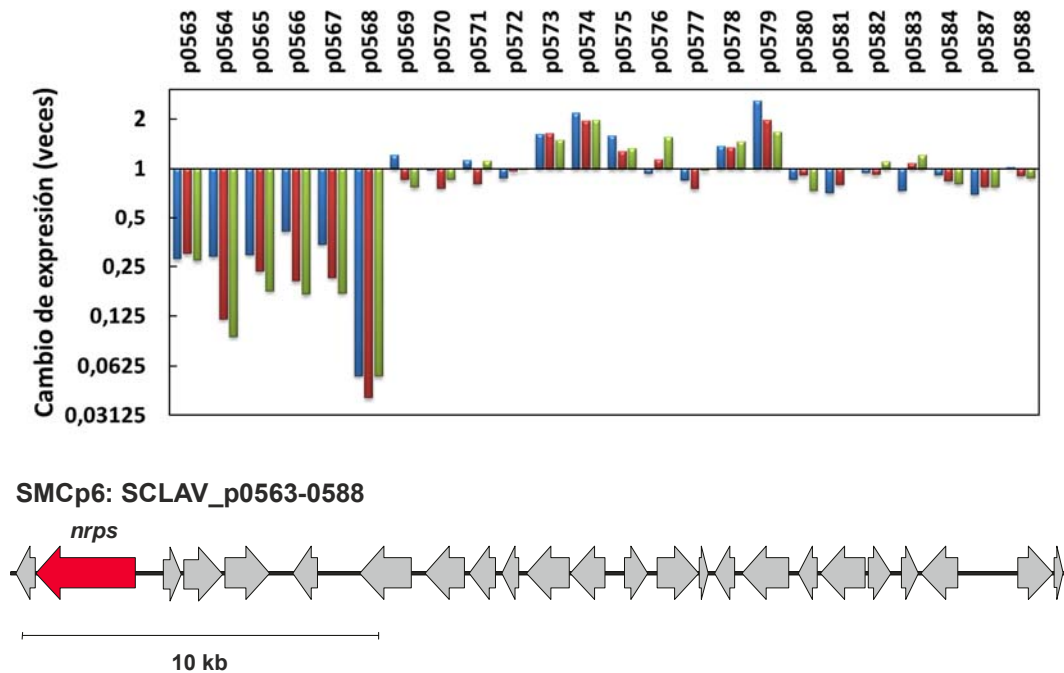


Figura 4.95. Efecto de la presencia de PimM en la transcripción de los genes de la agrupación SMCp6 en *S. clavuligerus::pimM* comparada con *S. clavuligerus::pIB139*. Para simplificar la figura, la denominación de los genes se abrevió usando «p» y los dígitos sin SCLAV. Ver el pie de la figura 4.87. En la parte inferior de la figura se indica la organización de la agrupación génica SMCp6 en *S. clavuligerus* con el gen que codifica la NRPS resaltado en color rojo (modificado de Medema y col., 2010).

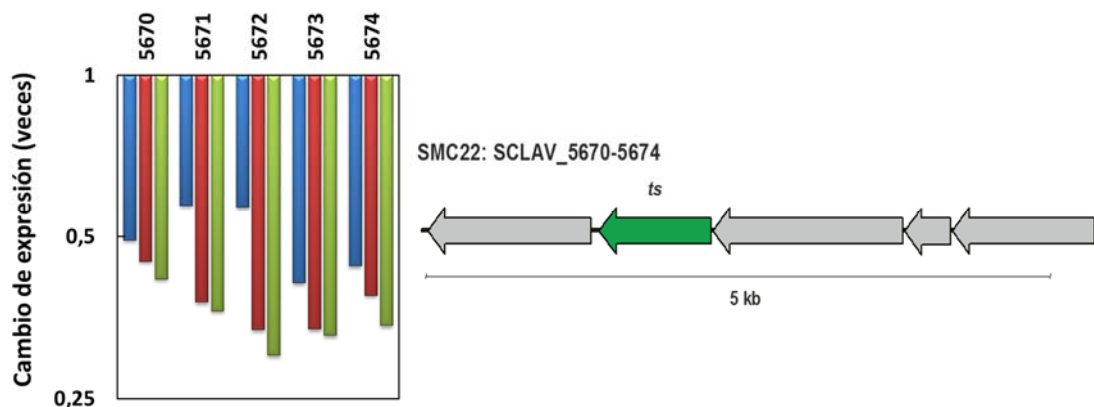


Figura 4.96. Efecto de la presencia de PimM en la transcripción de los genes de la agrupación SMC22 en *S. clavuligerus::pimM* comparada con *S. clavuligerus::pIB139*. Para simplificar la figura, la denominación de los genes se abrevió usando los dígitos sin SCLAV. Ver el pie de la figura 4.87. En la parte derecha de la figura se indica la organización de la agrupación génica SMC22 en *S. clavuligerus* con el gen que codifica la terpeno sintasa resaltado en color verde (modificado de Medema y col., 2010).

4.4.8.4. Otros genes afectados por el regulador PimM

Inicialmente, PimM se consideraba restringido al control de la biosíntesis de macrólidos poliénicos por ser un regulador de tipo PAS-LuxR (Santos-Aberturas y col., 2011a), sin embargo, Vicente y col. (2015) han demostrado que este tipo de reguladores, y en concreto PimM, considerado específico de ruta, ejerce una regulación cruzada de múltiples y diferentes agrupaciones génicas. En el presente trabajo, se describe el efecto global de este regulador sobre la transcripción génica en *S. clavuligerus* al ser expresado heterológamente, y que implica no solo a posibles agrupaciones biosintéticas de policétidos o péptidos no ribosomales-policétidos con posible actividad antifúngica (SMCp5 y SMC13), sino también a las ampliamente caracterizadas del ácido clavulánico y la cefamicina C, compuestos de naturaleza β -lactámica, y a otras agrupaciones génicas (SMC6, SMC14, SMCp6, SMCp25, SMCp6 y SMC22) implicadas en la producción de metabolitos secundarios (Medema y col. 2010). Además, hemos observado que PimM afecta a genes no directamente relacionados con la producción de antibióticos, incluyendo genes que codifican otros reguladores como se describe a continuación.

4.4.8.4.1. Genes reguladores

En *S. clavuligerus::pimM* se vieron significativamente activados o reprimidos nueve genes que codifican proteínas reguladoras, de los cuales, cuatro pertenecen a agrupaciones de metabolitos secundarios ya comentadas (apartados 4.4.8.1 y 4.4.8.3). Los otros cinco reguladores se reprimieron entre 0,1 y 0,5 veces (tabla 7.13, Anexo).

Como se indicó en el apartado 4.4.8.1, el gen regulador de la biosíntesis de ácido clavulánico, *clpR*, se activó como consecuencia de la integración de *pimM*. Sin embargo, si bien la ausencia de *ClpR* en *S. clavuligerus* aumentó la producción de holomicina y modificó notablemente la transcripción de los genes del regulón *rpoE* (Martínez-Burgo y col., 2015; apartado 4.2.6.5.1), la activación de *clpR* en *S. clavuligerus::pimM* no alteró el nivel de expresión de la agrupación génica de la ditiolpirrolona y apenas la de los genes del regulón *rpoE*. Igualmente, los catorce genes reguladores cuya expresión se vio notablemente alterada en ausencia de *ClpR* (Martínez-Burgo y col., 2015; apartados 4.2.6.3 y 4.2.6.5.1), no experimentaron cambio en *S. clavuligerus::pimM*. Además, de los 136 genes con diferentes funciones en la célula que variaron su expresión por la ausencia de *ClpR* (apartado 4.2.6.5.2), solo SCLAV_p1417, SCLAV_p1425 y SCLAV_p1504 se vieron también afectados en *S. clavuligerus::pimM* (tabla 7.14, Anexo), los tres subexpresados en ambas cepas. Esto pone de manifiesto la complejidad de la red de regulación existente en la especie *S. clavuligerus*.

➤ Factor sigma U

El gen SCLAV_2070, que codifica un factor sigma de ARN polimerasa y es ortólogo de *sigU* de *S. coelicolor*, se subexpresó 0,1 veces en el mutante *S. clavuligerus::pimM* (tabla 7.13, Anexo). En *S. coelicolor*, el factor antisigma de SigU es *RsuA*. El gen SCLAV_2069, ortólogo de *rsuA* en *S. clavuligerus*, a pesar de no pasar el filtro estadístico establecido (valor *p* BH-correctado $\leq 0,1$), se subexpresó 0,5 veces (tabla 7.13, Anexo). En *S. coelicolor*, la elevada actividad de SigU debida a la delección de *rsuA*, su correspondiente factor anti-sigma, bloquea la formación de micelio aéreo y retrasa la formación de actinorrodina (Gehring y col., 2001). Por ello, la notable subexpresión de SCLAV_2070 respecto a SCLAV_2069, podría estar relacionada con la activación de agrupaciones de metabolitos secundarios, tales como SMCp5 y SMC13, que se observa en *S. clavuligerus::pimM*.

4.4.8.4.2. Genes con funciones diversas en la célula

En *S. clavuligerus::pimM* se vieron significativamente afectados 54 genes con funciones diversas en la célula, de los cuales 6 se sobreexpresaron entre 2 y 7 veces, y 48 se reprimieron entre 0,5 y 0,03 veces, en alguno de los tres tiempos analizados (tabla 7.14, Anexo). Entre ellos se encuentran genes implicados en transporte y metabolismo de aminoácidos, lípidos, carbohidratos, iones inorgánicos, coenzimas, mecanismos de transducción de señal, de defensa,

conversión de energía, replicación, recombinación y reparación, transcripción, traducción y estructura ribosomal, tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular.

Destacan SCLAV_0832-SCLAV_0834 y SCLAV_0835-SCLAV_0837, dos bloques de genes que se orientan de forma divergente y podrían estar regulados por un promotor bidireccional común dado su perfil de transcripción, con una represión de todos ellos entre 0,3 y 0,07 veces en los tres tiempos de análisis (figura 4.97). Estos genes codifican una deshidrogenasa de cadena corta, una fenilacetaldehido deshidrogenasa, una glutamina sintetasa, un regulador transcripcional, un transportador de etanolamina, y una amidotrasferasa, respectivamente, por lo que parecen estar implicados en el metabolismo del nitrógeno. Los cinco genes presentan un ortólogo en *S. griseus* (SGR_6471-SGR_6476) y, excepto SCLAV_0835, también en *S. coelicolor* y *S. avermitilis* (SCO1611-SCO1615 y SAV_6727-SAV_6723, respectivamente). La sintenia entre estas cuatro especies sugiere un origen evolutivo común y una funcionalidad conservada de dicha agrupación en *Streptomyces*.

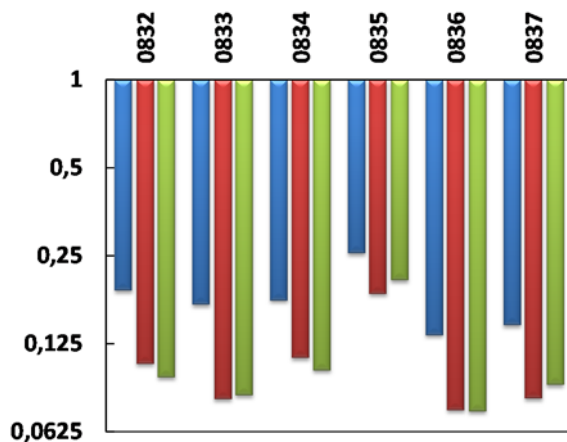
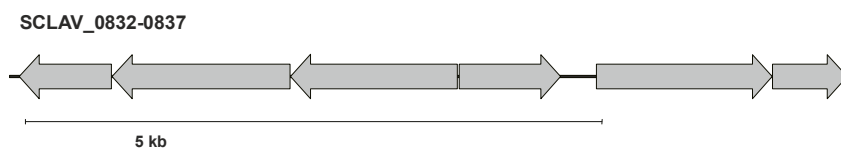


Figura 4.97. Efecto de la presencia de PimM en la transcripción de los genes SCLAV_0832-SCLAV_0837 en *S. clavuligerus::pimM* comparada con *S. clavuligerus::pB139*. Para simplificar la figura, la denominación de los genes se abrevió usando los dígitos sin SCLAV. Ver el pie de la figura 4.86. En la parte inferior de la figura se indica la disposición de SCLAV_0832-SCLAV_0837 en *S. clavuligerus*.



4.4.8.5. Validación de los datos transcriptómicos

Los datos transcriptómicos obtenidos con micromatrices han sido validados utilizando RT-qPCR y las mismas muestras de ARN de 90 horas empleadas para los estudios de análisis global. Fueron validados doce genes (figura 4.98) pertenecientes a las agrupaciones del ácido clavulánico, cefamicina C, nocardamina, SMC13, SMCp5 y SMCp6, así como dos que codifican proteínas reguladoras y otros dos para funciones diversas (tablas 7.1 y 7.15, Anexo).

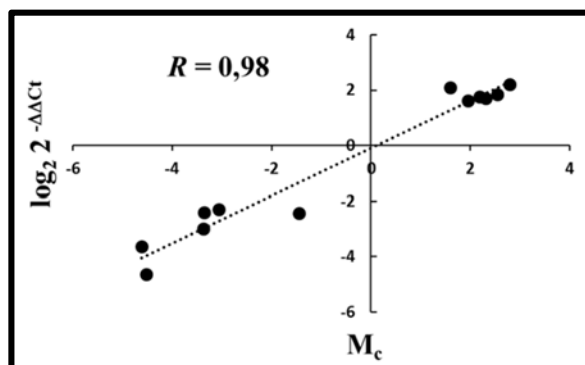


Figura 4.98. Validación de los resultados del análisis transcriptómico. Representación de la correlación para cada gen de los valores obtenidos por micromatrices, y mostrados en la tabla 7.15 (Anexo), y por RT-qPCR en la comparación entre *S. clavuligerus::pimM* respecto de *S. clavuligerus::pIB139*.

Dada la proximidad a 1 de la pendiente de la recta obtenida al correlacionar los datos de ambas técnicas (valor de correlación de Pearson de 0,98) (figura 4.98), los valores de RT-qPCR confirmaron los resultados obtenidos en las micromatrices.

4.4.9. Posibles agrupaciones responsables de la biosíntesis del compuesto antifúngico en *S. clavuligerus::pimM*

Los genes de la agrupación que codifica la biosíntesis de tunicamicina en *S. clavuligerus* (SCLAV_4276-SCLAV_4287) (Chen y col., 2010) no se activaron en *S. clavuligerus::pimM* respecto a la cepa control (tabla 7.12, Anexo). Por lo tanto, a pesar de la presencia de tunicamicina en el extracto con actividad antifúngica obtenido a partir del micelio de *S. clavuligerus::pimM* (apartado 4.4.6.3), dada su detección en *S. clavuligerus::pIB139*, este compuesto no parece ser el responsable de la actividad observada frente a *C. utilis* producida por *S. clavuligerus::pimM*.

Aunque la estructura del antifúngico no ha sido aún dilucidada, las dos agrupaciones candidatas responsables de su biosíntesis parecen ser SMCp5 y SMC13 debido a: 1) la presencia de genes que codifican policétido sintasas o un híbrido PKS-NRPS, 2) la localización en estas dos

agrupaciones de las tres únicas PKSs y la única PKS-NRPS sobreexpresadas como respuesta a la presencia de PimM, y 3) la sobreexpresión de todos o gran parte de los genes de ambas agrupaciones en presencia del regulador heterólogo PimM. Sin embargo, en un análisis *in silico*, ni los genes de la agrupación SMCp5 ni el que codifica la PKS-NRPS en SMC13 presentaron sitios de unión para PimM, por lo que el efecto de regulación sobre estas agrupaciones parece darse a un nivel superior.

Curiosamente, SMC4 y SMC5, las dos agrupaciones de metabolismo secundario localizadas en el cromosoma a ambos lados del gen SCLAV_0213, homólogo a *pimM* (apartado 4.4.2), no vieron afectada la expresión de sus genes por la presencia de PimM (no mostrado).

En resumen, la presencia del regulador PimM en *S. clavuligerus* no solamente activa las biosíntesis de un compuesto/s con actividad antifúngica, ácido clavulánico, cefamicina C y nocardamina, sino que además: 1) afecta positivamente a todos los genes de las agrupaciones SMCp5, de ácido clavulánico, de cefamicina C y de nocardamina, así como de algunos de las agrupaciones SMC13 y SMC14, 2) reprime la expresión génica de las agrupaciones SMC22 y SMCp25 y de algunos genes de la agrupación SMCp6, y 3) afecta notablemente a la transcripción de unos sesenta genes reguladores o con funciones diversas en la célula, ejerciendo un efecto regulador más amplio que el inicialmente descrito.

5. Visión global

La cepa *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 fue originalmente seleccionada por su capacidad para producir cefamicina C, un antibiótico β -lactámico de gran atractivo en la industria farmacéutica como molécula base en la elaboración de cefamicinas semisintéticas. Posteriormente, fue identificada como principal productor de ácido clavulánico, un potente inhibidor de β -lactamasas que se administra en combinación con antibióticos β -lactámicos, como la amoxicilina, para el tratamiento de distintas infecciones. Este interés industrial explica el dilatado estudio microbiológico, bioquímico y genético de esta cepa desde su aislamiento y caracterización por Higgins y Kastner en 1971.

Inicialmente, los mutantes superproductores de ácido clavulánico, cefamicina C y holomicina eran obtenidos mediante técnicas de mutagénesis aleatoria. El posterior desarrollo de las técnicas moleculares permitió profundizar en la organización génica de las agrupaciones biosintéticas implicadas en la producción de estos metabolitos, así como en los reguladores específicos o globales que coordinan dicha producción y que, en algunos casos, pueden desempeñar un papel en el control del metabolismo primario, desarrollo y diferenciación morfológica. En este aspecto, en los últimos treinta años se han aislado y caracterizado en nuestro grupo de investigación los genes y enzimas para la biosíntesis de cefamicina C, de ácido clavulánico y de holomicina (Liras y col., 2008; Liras y Demain, 2009; Robles-Reglero y col., 2013) y se han estudiado los mecanismos de regulación de su producción. En el control transcripcional de la superagrupación cefamicina C-ácido clavulánico intervienen el regulador positivo de tipo SARP codificado por el gen *ccaR*, que activa la producción de ambos compuestos (Pérez-LLarena y col., 1997a), y un regulador positivo de tipo LysR codificado por el gen *clAR* (Pérez-Redondo y col., 1998; Paradkar y col., 1998), que afecta positivamente a la producción de ácido clavulánico.

La secuenciación del genoma de *S. clavuligerus* ATCC 27064 ha permitido identificar la presencia de un megaplásmido de 1,8 Mb, hecho poco frecuente entre los *Streptomyces*, prescindible para su viabilidad. El análisis de la secuencia del genoma revela hasta 49 agrupaciones génica para metabolitos secundarios (Medema y col., 2010; Chen y col., 2010). De estas agrupaciones, 24 están localizadas en el cromosoma y 25 en el megaplásmido, lo que constituye un reservorio de genes para la biosíntesis de un importante número de compuestos bioactivos aún desconocidos.

En este trabajo se ha estudiado el papel de ClaR y del megaplásmido pSCL4 mediante análisis transcriptómicos de cepas de *S. clavuligerus* defectivas. También se ha expresado heterológamente el regulador *pimM* de *S. natalensis* en *S. clavuligerus* y se ha analizado la producción heteróloga de cefamicina C en *Streptomyces* hospedadores.

Expresión heteróloga de la agrupación de cefamicina C de *S. clavuligerus*: un paso más hacia su caracterización.

Debido al gran interés industrial por la cefamicina C numerosos estudios se han centrado en el aumento de sus niveles de producción (Yilmaz y col., 2008; Leite y col., 2013; Shao y col., 2014). Sin embargo, los mecanismos de regulación y de resistencia, así como los límites de la agrupación no han sido totalmente dilucidados. En el Capítulo 4.1 de Resultados, se abordan estos objetivos mediante la expresión heteróloga de la agrupación de cefamicina C de *S. clavuligerus* en diferentes especies de *Streptomyces*.

La expresión heteróloga de los genes de *S. clavuligerus* para la biosíntesis de cefamicina C, desde *pbp74* hasta *pcbR*, en *S. flavogriseus*, *S. coelicolor* M1146 y *S. albus* J1074, permitió la producción heteróloga del compuesto β -lactámico en la primera, aunque sin alcanzar los niveles de producción de *S. clavuligerus*, pero no en las otras dos especies. *S. flavogriseus*, así como *S. avermitilis*, en el que los niveles de producción heteróloga de cefamicina C son buenos (Komatsu y col., 2010), son cepas filogenéticamente más próximas a *S. clavuligerus* que *S. coelicolor* A3(2) o *S. albus* J1074 (Zhou y col., 2011). Esto podría explicar la ausencia de producción heteróloga tanto de cefamicina C como de ácido clavulánico en estas dos especies (Álvarez-Álvarez y col., 2013; Martínez-Burgo y col., 2014). El mayor nivel de expresión de los genes biosintéticos de cefamicina C en *S. flavogriseus*::[SCos-CF] respecto de *S. coelicolor* M1146::[SCos-CF] permitió confirmar la importancia de la proximidad filogenética en la expresión heteróloga (Martínez-Burgo y col., 2014).

Por ello, si bien el uso de un hospedador optimizado para la aceptación de ADN exógeno, como es *S. albus* J1074, y/o carente de rutas competidoras que resultan en el drenaje de moléculas precursoras, como ocurre en *S. coelicolor* M1146, puede ser útil, la proximidad filogenética de las cepas hospedadora y donadora debería también ser considerada cuando se lleve a cabo la expresión heteróloga de una agrupación génica. En este sentido, la mayor distancia filogenética podría asimismo implicar la ausencia de un mecanismo eficaz de resistencia y la presencia de un sistema que asegura la producción únicamente cuando se dé dicha inmunidad (Gomez-Escribano y Bibb, 2014), como podría ser el caso de la no resistencia a

cefoxitina y la ausencia de producción heteróloga de los exconjugantes de *S. coelicolor* M1146 y *S. albus* J1074.

La expresión constitutiva del regulador CcaR_c en *S. flavogriseus*::[SCos-CF]::[P_{fur}-ccaR] respecto de *S. flavogriseus*::[SCos-CF], aumentó la expresión de los genes biosintéticos tempranos *pcbAB* y *lat*; sin embargo, no se dispone de los datos de transcripción del resto de los genes, excepto para *cmcI* que no se vio modificado y que podría limitar la producción del metabolito. De este modo, la biosíntesis de cefamicina C en *S. flavogriseus*::[SCos-CF]::[P_{fur}-ccaR] aumentó respecto a *S. flavogriseus*::[SCos-CF], pero no alcanzó el nivel de *S. clavuligerus*.

La alta resistencia a cefalosporina C de *S. clavuligerus* ha sido atribuida a varios genes localizados en la agrupación génica para la cefamicina C, como *pcbR* y *pbp74*, que codifican proteínas de unión a penicilina (Paradkar y col., 1996; Pérez-Llarena y col., 1998; Ishida y col., 2006); *cmcT*, para exportación (Pérez-Llarena y col., 1998); *bla*, que codifica una proteína similar al inhibidor de β-lactamasas BLIP (Pérez-Llarena y col., 1997b); *blp*, para una proteína similar a BLIP (Thai y col., 2001); y *orf10*, cuyo papel no ha sido completamente dilucidado. El análisis de la resistencia a antibióticos β-lactámicos, como penicilina y cefoxitina, así como el estudio de la expresión heteróloga de estos genes en las diferentes cepas de *S. flavogriseus* y *S. coelicolor* obtenidas, muestran que *pcbR*, *pbp74*, *orf10* y *blp* parecen explicar la alta resistencia a penicilina y cefoxitina. Como se observa en los análisis de RT-qPCR de *S. flavogriseus*::[SCos-CF], *pcbR*, *pbp74*, *orf10* y *cmcT* presentan un nivel de expresión superior al de los genes biosintéticos, lo que sugiere que la transcripción de los genes de resistencia es independiente de la presencia de un gen *ccaR_c* activo, como ocurre para *pcbR* en *S. flavogriseus*::[SCos-CFΔ*ccaR*], y como se observa en las pruebas de resistencia a penicilina y cefoxitina. Sin embargo, en *S. clavuligerus* la ausencia de CcaR afecta al nivel de transcripción de estos genes (Santamarta y col., 2011; Kurt y col., 2013; Álvarez-Álvarez y col., 2013), y el aumento del número de copias de *ccaR* tiene un efecto inverso sobre la expresión de los mismos (Kurt y col., 2013). En cualquier caso, no se ha localizado ningún sitio de unión de CcaR en estos genes de resistencia (Santamarta y col., 2011), por lo que la diferente regulación podría deberse a las diferencias en el fondo genético de *S. clavuligerus* y *S. flavogriseus*.

El regulador ClaR: efecto global en el metabolismo y la diferenciación morfológica

La función del regulador ClaR ha sido considerada específica de la agrupación del ácido clavulánico, ya que el mutante interrumpido no produce ácido clavulánico, pero acumula en medio definido SA el intermediario ácido clavamínico (Paradkar y col., 1998), y la amplificación

del número de copias del gen aumenta la producción de ácido clavulánico (Pérez-Redondo y col., 1998). Sin embargo, en nuestro grupo de investigación se ha observado que este regulador afecta también a la biosíntesis de cefamicina C, de modo que la interrupción de *claR* aumenta su producción (Pérez-Redondo, 2000) y la amplificación del mismo la reduce (Pérez-Redondo y col., 1998). Además, la producción de holomicina por el mutante interrumpido en *claR* (de la Fuente y col., 2002), supuso el primer indicio de un efecto más amplio de este regulador, así como uno de los primeros ejemplos de activación de agrupaciones crípticas o silenciosas.

El estudio del transcriptoma del mutante *S. clavuligerus claR::aac* nos ha permitido profundizar en el papel de ClaR, observando su efecto sobre el metabolismo secundario, la respuesta a estrés oxidativo y el desarrollo morfológico, además de confirmar a nivel de expresión génica los resultados observados previamente de producción de ácido clavulánico, cefamicina C y holomicina (Martínez-Burgo y col., 2015). La ausencia de ClaR afecta además a la transcripción de agrupaciones génicas para otros posibles compuestos β -lactámicos (SMCp25); pero también de agrupaciones para péptidos no ribosomales (SMCp20 y SMCp24), terpenos (SMCp22) y sideróforos (SMC6). ClaR modula asimismo la expresión de genes de estrés oxidativo, como los que forman el regulón RpoE, y de genes implicados en la diferenciación morfológica, como el operón *amfTSBAR*.

Por lo tanto, la compleja red de interacciones funcionales que parece existir entre diferentes rutas biosintéticas en *Streptomyces* refuerza la necesidad de revisar el paradigma según el cual los reguladores de mayor jerarquía actúan sobre los reguladores específicos de ruta de metabolismo secundario en las especies de este género.

El megaplásmido pSCL4: efecto sobre los genes cromosomales de *S. clavuligerus*

La mitad de las agrupaciones génicas de metabolitos secundarios de *S. clavuligerus* se localizan en el megaplásmido pSCL4 (Medema y col., 2010). Nuestro grupo (Álvarez-Álvarez y col., 2014a) describió el importante papel de pSCL4 en la producción de la holomicina, codificada en el cromosoma (Li y Walsh, 2010; Huang y col., 2011), y en la diferenciación morfológica en esta especie. Sin embargo, este elemento extracromosomal es dispensable para la viabilidad de *S. clavuligerus* (Álvarez-Álvarez y col., 2014a). Estudios *in silico* han indicado una regulación cruzada entre el cromosoma y el megaplásmido pSCL4 (Medema y col., 2010). Por ello, se decidió estudiar las posibles interacciones entre estos dos elementos genómicos mediante micromatrices comparando la cepa carente del megaplásmido, *S. clavuligerus* pSCL4⁻ (Álvarez-Álvarez y col., 2014a), con la cepa parental, *S. clavuligerus* ATCC 27064.

En *S. clavuligerus* pSCL4⁻, la ausencia del megaplásmido afectó al nivel de expresión de casi todas las agrupaciones cromosómicas de metabolitos secundarios, provocando la subexpresión de casi todos sus genes en once de ellas, incluyendo las del ácido clavulánico y la cefamicina C, y la sobreexpresión de todos los genes de las de SMC5, tunicamicina y SMC18 (holomicina). Por lo tanto, el megaplásmido pSCL4 no solamente es un importante reservorio de nuevos metabolitos secundarios (Medema y col., 2010), sino que, además, ejerce un importante papel modulador en la expresión de las agrupaciones cromosómicas de metabolitos secundarios.

El análisis de los casi 50 genes con función reguladora y los más de 500 con funciones diversas en la célula que están diferencialmente expresados en *S. clavuligerus* pSCL4 indica que la ausencia del megaplásmido no sólo afecta al metabolismo secundario y la diferenciación morfológica, sino que, además, parece estar afectando a genes de virulencia (agrupación *mce*) y generando un estrés osmótico y oxidativo.

Los plásmidos son elementos genéticos móviles que desempeñan un papel clave en la evolución de las bacterias, contribuyendo a la plasticidad de su genoma y a la transferencia lateral de información genética útil para la supervivencia de la cepa en su ambiente. El megaplásmido pSCL4 es un gran reservorio de agrupaciones de nuevos compuestos bioactivos típicamente localizadas en los extremos de los brazos del cromosoma de otros *Streptomyces*, lo que sugiere un importante papel del flujo genómico, y por tanto, en la dinámica evolución genómica que se ha descrito en los actinomicetos (Choulet y col., 2006). Entre las hipótesis sobre el origen de pSCL4 (Medema y col., 2010), una describe la integración de un plásmido relativamente pequeño en uno de los brazos del cromosoma y la posterior generación de un corte en él para dar lugar a un replicón independiente, lo que explicaría el elevado número de agrupaciones de metabolitos secundarios en este elemento extracromosomal. Nuestros análisis transcriptómicos en la cepa carente del megaplásmido pSCL4, muestran que aproximadamente 200 genes de uno de los extremos del cromosoma ven reducida su expresión. Este hecho, junto con la regulación cruzada que parece establecerse entre el megaplásmido pSCL4 y el cromosoma (Medema y col., 2010; presente trabajo), podría validar esta hipótesis sobre el origen de este megaplásmido.

Expresión heteróloga del regulador PimM en *S. clavuligerus*: activación de agrupaciones génicas silenciosas

El regulador transcripcional PimM está codificado en la agrupación de pimaricina de *S. natalensis* y ha sido tradicionalmente considerado específico de la biosíntesis de este polieno

(Martín y Aparicio, 2009). Este regulador PAS-LuxR constituye un cuello de botella en la biosíntesis de pimaricina, dado que el incremento de la dosis génica de *pimM* en *S. natalensis* aumenta la producción del tetraeno. Además, es totalmente intercambiable con otros reguladores PAS-LuxR ortólogos, como son PteF y AmphRIV, de las agrupaciones génicas de los polienos filipina y anfotericina, respectivamente (Santos-Aberturas y col., 2011a).

Mediante estudios *in silico* y EMSA se han caracterizado sitios de unión de PimM en *S. avermitilis*, que posee un regulador homólogo a este llamado PteF (Vicente y col., 2015). Este estudio ha revelado que los reguladores PAS-LuxR, como PimM, no han de ser considerados como específicos de ruta, sino como reguladores pleiotrópicos que ejercen un control directo y cruzado de múltiples y diferentes agrupaciones génicas (Vicente y col., 2015). Además, la expresión heteróloga del regulador PimM en *S. albus*, especie que presenta un gen homólogo en la agrupación génica de candidicina, permite activar la producción de este policétido de tipo I y del híbrido policétido-péptido no ribosomal antimicina, cuyas agrupaciones de biosíntesis se encontraban silenciadas (Olano y col., 2014).

Entre las casi 50 agrupaciones biosintéticas de metabolitos secundarios crípticos descritas en *S. clavuligerus* (Medema y col., 2010; Chen y col., 2010), 8 parecen estar implicadas en la biosíntesis de policétidos y 6 en la de híbridos péptidos no ribosomales-policétidos o portadoras de NRPS y PKS.

Por todo ello, en el Capítulo 4.4 de Resultados se aborda el análisis del efecto de la expresión heteróloga de PimM en esta especie tanto a nivel transcriptómico como de producción de nuevos metabolitos, comparando *S. clavuligerus::pimM*, que contiene *pimM* integrado, con *S. clavuligerus::pIB139*, como cepa control.

En *S. clavuligerus* se identificó un regulador cromosomal, SCLAV_0213, que presenta una elevada similitud con la secuencia aminoacídica del regulador PimM, tanto en el dominio PAS y como en el LuxR de reguladores de la biosíntesis de macrólidos poliénicos descritos por Antón y col. (2007). Sin embargo, a diferencia de la mayoría de este tipo de reguladores asociados a la biosíntesis de polienos, el gen SCLAV_0213 se sitúa entre las agrupaciones SMC4, posiblemente implicada en la biosíntesis de terpenos, y SMC5, que presenta una policétido sintasa de tipo I, es decir, fuera de cualquiera de las agrupaciones de metabolismo secundario descritas en *S. clavuligerus*.

La expresión heteróloga de PimM en *S. clavuligerus* activó la producción de un compuesto antifúngico, de naturaleza aparentemente no poliénica y cuya estructura no ha sido aún identificada. Tras el análisis transcriptómico mediante micromatrices, se identificaron como candidatas responsables de su biosíntesis las agrupaciones plasmídica SMCp5 y cromosómica SMC13, ya que presentaban sobreexpresadas las dos únicas policétido sintetas y la única NRPS-PKS debido a la presencia de PimM, y, asimismo, casi todos los genes de estas agrupaciones.

Entre los genes afectados por la presencia del regulador PimM se encuentran, además de las agrupaciones SMCp5 y SMC13, otros genes implicados en el metabolismo secundario y la formación de micelio aéreo, 6 genes que codifican proteínas con función reguladora y más de 50 genes implicados en funciones celulares diversas. El análisis de posibles sitios de unión de PimM en estos genes ayudará a esclarecer el mecanismo de regulación que se produce en *S. clavuligerus::pimM*. Por otro lado, la expresión heteróloga del regulador PimM en *S. clavuligerus* no alteró la formación de micelio aéreo ni la esporulación.

Curiosamente, y sin precedente para la expresión heteróloga de un regulador de tipo PAS-LuxR de la biosíntesis de macrólidos poliénicos, la producción de dos compuestos β -lactámicos, el ácido clavulánico y la cefamicina C, así como la expresión de los genes de ambas agrupaciones, aumentó notablemente. Se observaron producciones entre 4 y 10 veces superiores, y expresiones entre 2 y 8 veces superiores respecto a la cepa control en ambos casos. En este sentido, los genes *ccaR* y *clar*, para el regulador de la superagrupación cefamicina C-ácido clavulánico y del ácido clavulánico, respectivamente, se vieron sobreexpresados entre 2 y 3 veces. Si bien aún se desconoce el efecto de PimM sobre ambos reguladores, el promotor del *ccaR* presenta un posible sitio de unión para PimM con un valor R_i de 2,02 bits. Este valor es relativamente bajo si se considera el rango de valores (entre 2,4 y 21 bits) para los sitios de unión de PimM de genes que interactúan con este regulador mediante EMSA (Santos-Aberturas y col., 2011a; Vicente y col., 2015), pero podría explicar en parte la sobreexpresión de la agrupación.

Este incremento de producción de ácido clavulánico es coherente con el obtenido por Pérez-Redondo y col., (1998) al aumentar el número de copias de *clar* en *S. clavuligerus*, sin embargo, el aumento de la biosíntesis de cefamicina C en *S. clavuligerus::pimM* contrasta con la disminución observada en *S. clavuligerus* cuando contiene múltiples copias de *clar*, indicando que existen factores adicionales aún por esclarecer.

Finalmente, si bien la ausencia de ClaR en *S. clavuligerus* Δ *claR::aac* aumenta la producción de holomicina y afecta notablemente a la expresión de los genes del regulón RpoE, a más de una docena de genes que codifican proteínas con función reguladora y a más de un centenar de genes con funciones diversas en la célula (Martínez-Burgo y col., 2015), la sobreexpresión de *claR* en *S. clavuligerus::pimM* apenas modificó a la tasa de transcripción de estos genes, excepto SCLAV_p1417, SCLAV_p1425 y SCLAV_p1504, que se vieron también subexpresados en *S. clavuligerus::pimM*. Esto pone de manifiesto el complejo entramado de regulación existente en la especie *S. clavuligerus*.

El resultado de estos cuatro capítulos ha permitido ahondar en el conocimiento de los mecanismos regulatorios del metabolismo secundario y del estrés en la célula, así como en la diferenciación morfológica de *S. clavuligerus*, lo que supone un gran avance hacia el desarrollo del potencial industrial de esta especie en la producción de nuevos compuestos de interés.

6. Conclusiones

1. El grado de proximidad filogenética entre *S. clavuligerus* ATCC 27064 y *S. flavogriseus* ATCC 33331 permite la producción heteróloga de cefamicina C en este último microorganismo, mientras que no se detecta la producción heteróloga de este metabolito en las cepas más alejadas filogenéticamente, *S. albus* J1074 y *S. coelicolor* M1146.

2. La integración de la agrupación de cefamicina C de *S. clavuligerus*, a través del cósmido SCos-CF, en el hospedador *S. flavogriseus* ATCC 33331 resulta en niveles mínimos de producción heteróloga de este metabolito debido al bajo nivel de transcripción de los genes biosintéticos. La integración de una copia adicional del gen regulador *ccaR_c*, expresado de modo constitutivo, aumenta la expresión de los genes biosintéticos *pcbAB* y *lat* y supone un aumento de 100 veces en la producción heteróloga de cefamicina C respecto a *S. flavogriseus*::[SCos-CF].

3. El gen *ccaR* de *S. flavogriseus* no es funcional en la activación de la producción de cefamicina C en la cepa *S. flavogriseus*::[SCos-CF Δ *ccaR*].

4. La mayor resistencia a penicilina G y cefoxitina que presenta *S. flavogriseus*::[SCos-CF] respecto a su cepa parental, *S. flavogriseus* ATCC 33331, probablemente se debe a una elevada transcripción de los genes *pbp74*, *pcbR* y *orf10*. La mayor resistencia a penicilina G que posee *S. coelicolor*::[SCos-CF] respecto a su cepa parental, *S. coelicolor* M1146, puede deberse a la elevada transcripción de *pbp74*.

5. *S. clavuligerus* Δ *claR*::*aac* no produce ácido clavulánico, lo que se relaciona con la reducción de la expresión de los genes tempranos y tardíos de la vía biosintética, en un 51 y 98 %, respectivamente. Este mutante produce holomicina, lo que se relaciona con la activación de la transcripción de los genes de biosíntesis de holomicina, metabolito no detectable en la cepa silvestre.

6. El regulador ClaR no es específico de ruta ya que su delección afecta no solo a la expresión de los genes de la superagrupación cefamicina C-ácido clavulánico, sino también a los de las agrupaciones SMCp20, SMCp22, SMCp24 y de holomicina, así como a la expresión de genes para el desarrollo y diferenciación morfológica, genes reguladores, y genes con funciones diversas, entre ellos el regulón RpoE implicado en el control de estrés oxidativo.

7. El análisis transcriptómico de la cepa *S. clavuligerus* pSCL4⁻, carente del megaplásmido pSCL4, respecto a la cepa control muestra un descenso del nivel de expresión en los genes de biosíntesis de cefamicina C y de ácido clavulánico y un aumento del nivel de expresión en los genes de biosíntesis de holomicina, lo que concuerda con la producción de dichos antibióticos

por ambas cepas. Asimismo, la expresión de la mayoría de las agrupaciones cromosómicas para metabolitos secundarios está alterada en *S. clavuligerus* pSCL4⁻.

8. La ausencia del megaplásmido pSCL4 en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ modifica la expresión de unos 50 genes reguladores y de más de 500 genes con funciones diversas en la célula que incluyen: control del estrés oxidativo y osmótico, mecanismos de competencia y defensa ante un medio hostil, división celular e integridad de las envolturas celulares y/o desarrollo morfológico.

9. La expresión heteróloga del gen *pimM* de *S. natalensis* en *S. clavuligerus* demuestra que este regulador tiene un papel potenciador del metabolismo secundario que no se circunscribe a los polienos, ya que en *S. clavuligerus::pimM* se activan o se favorecen las biosíntesis de un compuesto antifúngico de naturaleza aún desconocida, de los antibióticos β -lactámicos cefamicina C y ácido clavulánico, y del sideróforo nocardamina. Además de las agrupaciones correspondientes a estos metabolitos, se activan a nivel transcripcional las agrupaciones SMCp5 y SMC13, mientras que se reprimen SMC22, SMCp25 y casi una decena de genes reguladores. Unos 50 genes con funciones diversas en la célula ven alterado su nivel de transcripción por la expresión heteróloga de *pimM*.

7. Bibliografía

A

Abe, I., Morita, H. (2010). Structure and function of the chalcone synthase superfamily of plant type III polyketide synthases. *Nat Prod Rep.* 27(6):809-38.

Aharonowitz, Y., Demain, A.L. (1978). Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 14(2):159-64.

Aharonowitz, Y. (1980). Nitrogen metabolite regulation of antibiotic biosynthesis. *Annu Rev Microbiol.* 34:209-33.

Aidoo, K.A., Wong, A., Alexander, D.C., Rittammer, R.A., Jensen, S.E. (1994). Cloning, sequencing and disruption of a gene from *Streptomyces clavuligerus* involved in clavulanic acid biosynthesis. *Gene.* 147(1):41-6.

Aigle, B., Wietzorrek, A., Takano, E., Bibb, M.J. (2000). A single amino acid substitution in region 1.2 of the principal sigma factor of *Streptomyces coelicolor* A3(2) results in pleiotropic loss of antibiotic production. *Mol Microbiol.* 37(5):995-1004.

Aigle, B., Corre, C. (2012). Waking up *Streptomyces* secondary metabolism by constitutive expression of activators or genetic disruption of repressors. *Methods Enzymol.* 517:343-66.

Alam, M.T., Merlo, M.E., Takano, E., Breitling, R. (2010). Genome-based phylogenetic analysis of *Streptomyces* and its relatives. *Mol Phylogenet Evol.* 54(3):763-72.

Alexander, D.C., Jensen, S.E. (1998). Investigation of the *Streptomyces clavuligerus* cephamycin C gene cluster and its regulation by the CcaR protein. *J Bacteriol.* 180(16):4068-79.

Alt, S., Burkard, N., Kulik, A., Grond, S., Heide, L. (2011). An artificial pathway to 3,4-dihydroxybenzoic acid allows generation of new aminocoumarin antibiotic recognized by catechol transporters of *E. coli*. *Chem Biol.* 18(3):304-13.

Álvarez-Álvarez, R., Martínez-Burgo, Y., Pérez-Redondo, R., Braña, A.F., Martín, J.F., Liras, P. (2013). Expression of the endogenous and heterologous clavulanic acid cluster in *Streptomyces flavogriseus*: why a silent cluster is sleeping. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97(21):9451-63.

Álvarez-Álvarez, R., Rodríguez-García, A., Martínez-Burgo, Y., Robles-Reglero, V., Santamarta, I., Pérez-Redondo, R., Martín, J.F., Liras, P. (2014a). A 1.8-Mb-reduced *Streptomyces clavuligerus* genome: relevance for secondary metabolism and differentiation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 98(5):2183-95.

Álvarez-Álvarez, R., Rodríguez-García, A., Santamarta, I., Pérez-Redondo, R., Prieto-Domínguez, A., Martínez-Burgo, Y., Liras, P. (2014b). Transcriptomic analysis of *Streptomyces clavuligerus* *ΔccaR::tsr*: effects of the cephamycin C-clavulanic acid cluster regulator CcaR on global regulation. *Microb Biotechnol.* 7(3):221-31.

Álvarez-Álvarez, R., Botas, A., Albillos, S.M., Rumbero, A., Martín, J.F., Liras, P. (2015). Molecular genetics of naringenin biosynthesis, a typical plant secondary metabolite produced by *Streptomyces clavuligerus*. *Microb Cell Fact.* 14(1):178.

Anderson, A.S., Wellington, E.M.H. (2001). The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51:797–814.

Antón, N., Mendes, M.V., Martín, J.F., Aparicio, J.F. (2004). Identification of PimR as a positive regulator of pimarin biosynthesis in *Streptomyces natalensis*. *J Bacteriol.* 186(9):2567-75.

Antón, N., Santos-Aberturas, J., Mendes, M.V., Guerra, S.M., Martín, J.F., Aparicio, J.F. (2007). PimM, a PAS domain positive regulator of pimarin biosynthesis in *Streptomyces natalensis*. *Microbiology.* 153(Pt 9):3174-83.

Antoraz, S., Santamaría, R. I., Díaz, M., Sanz, D., Rodríguez, H. (2015). Toward a new focus in antibiotic and drug discovery from the *Streptomyces* arsenal. *Front Microbiol.* 6:461.

Aparicio, J.F., Molnár, I., Schwecke, T., König, A., Haydock S.F., Khaw L.E., Staunton J., Leadlay, P.F. (1996). Organization of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase. *Gene.* 169(1):9-16.

Aparicio, J.F., Caffrey, P., Gil, J. A., Zotchev, S.B. (2003). Polyene antibiotic biosynthesis gene clusters. *Appl Microbiol Biotechnol.* 61(3):179-88.

Aparicio, J.F., Mendes, M.V., Antón, N., Recio, E., Martín, J.F. (2004). Polyene Macrolide Antibiotic Biosynthesis. *Curr Med Chem.* 11(12):1645-56.

Arakawa, K. (2014). Genetic and biochemical analysis of the antibiotic biosynthetic gene clusters on the *Streptomyces* linear plasmid. *Biosci Biotechnol Biochem.* 78(2):183-9.

Arruda, S., Bomfim, G., Knights, R., Huima-Byron, T., Riley, L.W. (1993). Cloning of an *M. tuberculosis* DNA fragment associated with entry and survival inside cells. *Science.* 261(5127):1454-7.

Arulanantham, H., Kershaw, N.J., Hewitson, K.S., Hughes, C.E., Thirkettle, J.E., Schofield, C.J. (2006). ORF17 from the clavulanic acid biosynthesis gene cluster catalyzes the ATP-dependent formation of N-glycyl-clavaminic acid. *J Biol Chem.* 281(1):279-87.

B

Bachmann, B.O., Li, R., Townsend, C.A. (1998). beta-Lactam synthetase: a new biosynthetic enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95(16):9082-6.

Baker, B.J., Dotzla, J.E., Yeh, W.K. (1991). Deacetoxycephalosporin C hydroxylase of *Streptomyces clavuligerus*. Purification, characterization, bifunctionality, and evolutionary implication. *J Biol Chem.* 266(8):5087-93.

Baldwin, J.E., Adlington, R.M., Bryans, J.S., Bringham, A.O., Coates, J.B., Crouch, N.P., Lloyd, M.D., Schofield, C.J. (1991). Isolation of dihydroclavaminic acid, an intermediate in the biosynthesis of clavulanic acid. *Tetrahedron.* 47(24):4089-100.

Baltz, R.H., Miao, V., Wrigley, S.K. (2005). Natural products to drugs: daptomycin and related lipopeptide antibiotics. *Nat Prod Rep.* 22(6):717-41.

Banik, J.J., Brady, S.F. (2010). Recent application of metagenomic approaches towards the discovery of antimicrobials and other bioactive small molecules. *Curr Opin Microbiol.* 13(5):603-9.

Bass, R.B., Strop, P., Barclay, M., Rees, D.C. (2002). Crystal structure of *Escherichia coli* MscS, a voltage-modulated and mechanosensitive channel. *Science.* 298(5598):1582-7.

Bao, K., Cohen, S.N. (2001). Terminal proteins essential for the replication of linear plasmids and chromosomes in *Streptomyces*. *Genes Dev.* 15(12):1518-27.

Bao, K., Cohen, S. N. (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 Dev.* 17(6):774-85.

Barbe, V., Bouzon, M., Mangenot, S., Badet, B., Poulain, J., Segurens, B., Vallenet, D., Marlière, P., Weissenbach, J. (2011). Complete genome sequence of *Streptomyces cattleya* NRRL 8057, a producer of antibiotics and fluorometabolites. *J Bacteriol.* 193(18):5055-6.

Barona-Gómez, F., Wong, U., Giannakopoulos, A.E., Derrick, P.J., Challis, G.L. (2004). Identification of a cluster of genes that directs desferrioxamine biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* M145. *J Am Chem Soc.* 126(50):16282-3.

Barreiro, C., Prieto, C., Sola-Landa, A., Solera, E., Martínez-Castro, M., Pérez-Redondo, R., García-Estrada, C., Aparicio, J.F., Fernández-Martínez, L.T., Santos-Aberturas, J., Salehi-Najafabadi, Z., Rodríguez-García, A., Tauch, A., Martín, J.F. (2012). Draft genome of *Streptomyces tsukubaensis* NRRL 18488, the producer of the clinically important immunosuppressant tacrolimus (FK506). *J Bacteriol.* 194(14):3756-7.

Barrios-González, J., Fernández, F.J., Tomasini, A. (2003). Microbial Secondary Metabolites Production and Strain Improvement. *Indian Journal of Biotechnology.* 2(3):322-33.

Bentley, P.H., Hunt, E. (1980). Total synthesis of beta-lactamase inhibitors based on the 4-oxa-1-aza-bicyclo[3.2.0]heptan-7-one ring system. *J Chem Soc Pekin* 1. 10:2222-7.

Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeño-Tárraga, A.M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M.A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B.G., Parkhill, J., Hopwood, D.A. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature.* 417(6885):141-7.

Bérdy, J. (2005). Bioactive Microbial Metabolites. *J Antibiot (Tokyo)* 58(1):1-26.

Bibb, M.J., Ward, J.M., Kieser, T., Cohen, S.N., Hopwood, D.A. (1981). Excision of chromosomal DNA sequences from *Streptomyces coelicolor* forms a novel family of plasmids detectable in *Streptomyces lividans*. *Mol Gen Genet.* 184(2):230-40.

Bibb, M.J. (1996). The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology*. 142:1335-44.

Bibb, M.J. (2005). Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Curr Opin Microbiol*. 8(2):208-15.

Bibb, M., Hesketh, A. (2009). Analyzing the regulation of antibiotic production in streptomycetes. *Methods Enzymol*. 458:93-116.

Bierbaum, G., Sahl, H.G. (2009). Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Curr Pharm Biotechnol*. 10(1):2-18.

Bignell, D.R., Warawa, J.L., Strap, J.L., Chater, K.F., Leskiw, B.K. (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(Pt 9):2161-73.

Bignell, D.R., Tahlan, K., Colvin, K.R., Jensen, S.E., Leskiw, B.K. (2005). Expression of *ccaR*, encoding the positive activator of cephamycin C and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*, is dependent on *bldG*. *Antimicrob Agents Chemother*. 49(4):1529-41.

Blanco, G. (2012). Comparative analysis of a cryptic thienamycin-like gene cluster identified in *Streptomyces flavogriseus* by genome mining. *Arch. Microbiol*. 194(6):549-55.

Blin, K., Kazempour, D., Wohlleben, W., Weber, T. (2014). Improved Lanthipeptide Detection and Prediction for antiSMASH. *PLoS ONE* 9(7).

Borel, J.F., Baumann, G., Chapman, I., Donatsch, P., Fahr, A., Mueller, E.A., Vigouret, J.M. (1996). In vivo pharmacological effects of ciclosporin and some analogues. *Adv Pharmacol*. 35:115-246.

Brautaset, T., Bruheim, P., Sletta, H., Hagen, L., Ellingsen, T.E., Strøm, A.R., Valla, S., Zotchev, S.B. (2002). Hexaene derivatives of nystatin produced as a result of an induced rearrangement within the *nysC* polyketide synthase gene in *S. noursei* ATCC 11455. *Chem Biol*. 9(3):367-73.

Brewer, S.J., Taylor, P.M., Turner, M.K. (1980). An adenosine triphosphate-dependent carbamoylphosphate-3-hydroxymethylcephem O-carbamoyltransferase from *Streptomyces clavuligerus*. *Biochem. J*. 185(3):555-64.

Brian, P., Riggle, P. J., Santos, R. A., Champness, W.C. (1996). Global negative regulation of *Streptomyces coelicolor* antibiotic synthesis mediated by an *absA*-encoded putative signal transduction system. *J Bacteriol*. 178(11):3221-31.

Brown, A.G., Butterworth, D., Cole, M., Hanscomb, G., Hood, J.D., Reading, C., Rolinson, G.N. (1976). Naturally-occurring beta-lactamase inhibitors with antibacterial activity. *J Antibiot (Tokyo)*. 29(6):668-9.

Brown, D., Evans, J.R., Fletton, R.A. (1979). Structures of three novel beta-lactams isolated from *Streptomyces clavuligerus*. *J Chem Soc, Chem Commun*. 6:282-3.

Buchanan, R.E. (1916). Studies on the classification and nomenclature of the bacteria: VIII. The subgroups and genera of the *Actinomycetales*. *J Bacteriol*. 111:403-6.

Buermans, H.P.J., den Dunnen, J.T. (2014). Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochim Biophys Acta*. 1842(10):1932-41.

Bullock, W.O., Fernandez, J.M., Short, J.M. (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA E.coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques*. 5(4):376-8.

Burton, K. (1968). Determination of DNA concentration with diphenylamine. *Methods Enzymol*. 12:163-6.

Bustin, S.A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*. 25(2):169-93.

Butaye, P., Devriese, L.A., Haesebrouck, F. (2003). Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. *Clin Microbiol Rev*. 16(2):175-88.

Buttner, M.J., Chater, K.F., Bibb, M.J. (1990). Cloning, disruption, and transcriptional analysis of three RNA polymerase sigma factor genes of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol*. 172(6):3367-78.

C

Campelo, A.B., Gil, J.A. (2002). The candicidin gene cluster from *Streptomyces griseus* IMRU 3570. *Microbiology*. 148(Pt 1):51-9.

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(1):107-15.

Carmody, M., Murphy, B., Byrne, B., Power, P., Rai, D., Rawlings, B., Caffrey P. (2005). Biosynthesis of amphotericin derivatives lacking exocyclic carboxyl groups. *J Biol Chem*. 280(41):34420-6.

Casali, N., Riley, L.W. (2007). A phylogenomic analysis of the *Actinomycetales mce* operons. *BMC Genomics*. 8:60.

Cavia-Saiz, M., Busto, M.D., Pilar-Izquierdo, MC., Ortega, N., Pérez-Mateos, M., Muñiz, P. (2010). Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: a comparative study. *J Sci Food Agric*. 90(7):1238-44.

Cerdeño-Tárraga, A.M., Efstratiou, A., Dover, L.G., Holden, M.T., Pallen, M., Bentley, S.D., Besra, G.S., Churcher, C., James, K.D., De Zoysa, A., Chillingworth, T., Cronin, A., Dowd, L., Feltwell, T., Hamlin, N., Holroyd, S., Jagels, K., Moule, S., Quail, M.A., Rabinowitsch, E., Rutherford, K.M., Thomson, N.R., Unwin, L., Whitehead, S., Barrell, B.G., Parkhill, J. (2003). The complete genome sequence and analysis of *Corynebacterium diphtheriae* NCTC13129. *Nucleic Acids Res*. 31(22):6516-23.

Challis, G.L., Hopwood, D.A. (2003). Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100(Suppl 2):14555-61.

Chang, H.M., Chen, M.Y., Shieh, Y.T., Bibb, M.J., Chen, C.W. (1996). The *cutRS* signal transduction system of *Streptomyces lividans* represses the biosynthesis of the polyketide antibiotic actinorhodin. *Mol Microbiol*. 21(5):1075-85.

Chang, P.C., Cohen, S.N. (1994). Bidirectional replication from an internal origin in a linear *Streptomyces* plasmid. *Science*. 265(5174):952-4.

Chapman, H.D., Jeffers, T.K., Williams, R.B. (2010). Forty years of monensin for the control of coccidiosis in poultry. *Poult Sci*. 89(9):1788-801.

Charusanti, P., Fong, N.L., Nagarajan, H., Pereira, A.R., Li, H.J., Abate, E.A., Su, Y., Gerwick, W.H., Palsson, B.O. (2012). Exploiting adaptive laboratory evolution of *Streptomyces clavuligerus* for antibiotic discovery and overproduction. *PLoS One*. 7(3):e33727.

Chater, K.F., Wilde, L.C. (1976). Restriction of a bacteriophage of *Streptomyces albus* G involving endonuclease *Sall*. *J Bacteriol*. 128(2):644-50.

Chater, K.F., Wilde, L.C. (1980). *Streptomyces albus* G mutants defective in the *SalGI* restriction-modification system. *J Gen Microbiol*. 116(2):323-34.

Chater, K.F., Hopwood, D.A., Kieser, T., Thompson, C.J. (1982). Gene cloning in *Streptomyces*. *Curr Top Microbiol Immunol*. 96:69-95.

Chater, K.F. (1984). Morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*. En: *Microbial Development*. R. Losick, L. Shapiro, eds. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. New York. 89-115.

Chater, K.F., Chandra, G. (2006). The evolution of development in *Streptomyces* analysed by genome comparisons. *FEMS Microbiol Rev*. 30(5):651-72.

Chater, K.F., 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*. *J Microbiol*. 46(1):1-11.

Chater, K.F., Biró, S., Lee, K.J., Palmer, T., Schrempf, H. (2010). The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Rev*. 34(2):171-98.

Chater, K.F. (2011). Differentiation in *Streptomyces*: the properties and programming of diverse cell-types. En: *Streptomyces: Molecular Biology and Biotechnology*. P. Dyson, ed. Caister Academic Press, Swansea, UK. 43-86.

Chen, C.W. (1996). Complications and implications of linear bacterial chromosomes. *Trends Genet*. 12(5):192-6.

Chen, C.W., Huang, C.H., Lee, H.H., Tsai, H.H., Kirby, R. (2002). Once the circle has been broken: dynamics and evolution of *Streptomyces* chromosomes. *Trends Genet*. 18(10):522-9.

- Chen, D., Zhang, Q., Zhang, Q., Cen, P., Xu, Z., Liu, W. (2012). Improvement of FK506 production in *Streptomyces tsukubaensis* by genetic enhancement of the supply of unusual polyketide extender units via utilization of two distinct site-specific recombination systems. *Appl Environ Microbiol.* 78(15):5093-5103.
- Chen, L., Lu, Y., Chen, J., Zhang, W., Shu, D., Qin, Z., Yang, S., Jiang, W. (2008b). Characterization of a negative regulator Avel for avermectin biosynthesis in *Streptomyces avermitilis* NRRL8165. *Appl Microbiol Biotechnol.* 80(2):277-86.
- Chen, L., Wang, Y., Guo, H., Xu, M., Deng, Z., Tao, M. (2012). High-throughput screening for *Streptomyces* antibiotic biosynthesis activators. *Appl Environ Microbiol.* 78(12):4526-8.
- Chen, S., Huang, X., Zhou, X., Bai, L., He, J., Jeong, K.J., Lee, S.Y., Deng, Z. (2003). Organizational and mutational analysis of a complete FR-008/candicidin gene cluster encoding a structurally related polyene complex. *Chem Biol.* 10(11):1065-76.
- Chen, W., Qu, D., Zhai, L., Tao, M., Wang, Y., Lin, S., Price, N.P., Deng, Z. (2010). Characterization of the tunicamycin gene cluster unveiling unique steps involved in its biosynthesis. *Protein Cell.* 1(12):1093-105.
- Chen, Y., Wendt-Pienkowski, E., Shen, B., (2008a). Identification and utility of FdmR1 as a *Streptomyces* antibiotic regulatory protein activator for fredericamycin production in *Streptomyces griseus* ATCC 49344 and heterologous hosts. *J. Bacteriol.* 190(16):5587-96.
- Cheng, Z., Bown, L., Tahlan, K., Bignell, D.R. (2015). Regulation of coronafacoyl phytotoxin production by the PAS-LuxR family regulator CfaR in the common scab pathogen *Streptomyces scabies*. *PLoS One.* 10(3):e0122450.
- Cho, Y.H., Lee, E.J., Ahn, B.E., Roe, J.H. (2001). SigB, an RNA polymerase sigma factor required for osmoprotection and proper differentiation of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol.* 42(1): 205-14.
- Chouayekh, H., Virolle, M.J. (2002). The polyphosphate kinase plays a negative role in the control of antibiotic production in *Streptomyces lividans*. *Mol Microbiol.* 43(4):919-30.
- Chung, S.T. (1987). Tn4556, a 6.8-kilobase-pair transposable element of *Streptomyces fradiae*. *J Bacteriol.* 169(10):4436-41.
- Claessen, D., Stokroos, I., Deelstra, H. J., Penninga, N.A., Bormann, C., Salas, J.A., Dijkhuizen, L., Wösten, H.A. (2004). The formation of the rodlet layer of streptomycetes is the result of the interplay between rodlines and chaplins. *Mol Microbiol.* 53(2):433-43.
- Claessen, D., de Jong, W., Dijkhuizen, L., Wösten, H.A. (2006). Regulation of *Streptomyces* development: reach for the sky! *Trends Microbiol* 14(7):313-9.
- Clark, L.C., Seipke, R.F., Prieto, P., Willemsse, J., van Wezel, G.P., Hutchings, M.I., Hoskisson, P.A. (2013). Mammalian cell entry genes in *Streptomyces* may provide clues to the evolution of bacterial virulence. *Sci Rep.* 3:1109.
- Cohn, F. (1875). Untersuchungen über Bakterien. (Investigations on bacteria). Beiträge zur Biologie der Pflanzen. 1:141-204.

Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E., Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J.E., Taylor, K., Whitehead, S., Barrell, B.G. (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 393(6685):537-44.

Coque, J.J., Enguita, F.J., Martín, J.F., Liras, P. (1995a). A two-protein component 7 alpha-cephem-methoxylase encoded by two genes of the cephamycin C cluster converts cephalosporin C to 7-methoxycephalosporin C. *J Bacteriol*. 177(8):2230-5.

Coque, J.J., Pérez-Llarena, F.J., Enguita, F., Fuente, J.L., Martín, J.F., Liras, P. (1995b). Characterization of the cmcH genes of *Nocardia lactamdurans* and *Streptomyces clavuligerus* encoding a functional 3'-hydroxymethylcephem O-carbamoyltransferase for cephamycin biosynthesis. *Gene*. 162(1):21-7.

Cosson, P., Soldati, T. (2008). Eat, kill or die: when amoeba meets bacteria. *Curr Opin Microbiol*. 11(3):271-6.

Craney, A., Ozimok, C., Pimentel-Elardo, S.M., Capretta, A., Nodwell, J.R. (2012). Chemical perturbation of secondary metabolism demonstrates important links to primary metabolism. *Chem Biol* 19(8):1020-7.

D

Das, A., Khosla, C. (2009). Biosynthesis of aromatic polyketides in bacteria. *Acc Chem Res*. 42(5):631-9.

Datsenko, K.A., Wanner, B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97(12): 6640-5.

Davies, J. (2007). Small molecules: the lexicon of biodiversity. *J Biotechnol*. 129(1):3-5.

De la Fuente, J.L., Rumbero, A., Martín, J.F., Liras, P. (1997). Delta-1-piperidine-6-carboxylate dehydrogenase, a new enzyme that forms alpha-amino adipate in *Streptomyces clavuligerus* and other cephamycin C-producing actinomycetes. *Biochem J*. 327(Pt 1):59-64.

De la Fuente, A., Lorenzana, L. M., Martín, J. F., 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. *J Bacteriol*. 184(23):6559-65.

De la Fuente, A., Martín, J.F., Rodríguez-García, A., Liras, P. (2004). Two proteins with ornithine acetyltransferase activity show different functions in *Streptomyces clavuligerus*: Oat2 modulates clavulanic acid biosynthesis in response to arginine. *J Bacteriol*. 186(19):6501-7.

Demain, A.L. (1981). Industrial microbiology. *Science*. 214(4524):987-95.

Demain, A.L., Fang, A. (2000). The natural functions of secondary metabolites. En: *History of Modern Biotechnology I*. A. Fiechter, ed. Springer. Heidelberg, Berlin. 1-39.

Demain, A.L. (2009). Antibiotics: natural products essential to human health. *Med Res Rev.* 29(6):821–842.

Di Berardo, C., Capstick, D.S., Bibb, M.J., Findlay, K.C., Buttner, M.J., Elliot, M.A. (2008). Function and redundancy of the chaplin cell surface proteins in aerial hypha formation, rodlet assembly, and viability in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol.* 190(17):5879-89.

Doran, J.L., Leskiw, B.K., Aippersbach, S., Jensen, S.E. (1990). Isolation and characterization of a beta-lactamase-inhibitory protein from *Streptomyces clavuligerus* and cloning and analysis of the corresponding gene. *J Bacteriol.* 172(9):4909-18.

Dufour, Y.S., Wesenberg, G.E., Tritt, A.J., Glasner, J.D., Perna, N.T., Mitchell, J.C., Donohue, T.J. (2010). chipD: a web tool to design oligonucleotide probes for high-density tiling arrays. *Nucleic Acids Res.* 38:W321-W325.

Duncan, L., Alper, S. Losick, R. (1996). SpoIIAA governs the release of the cell-type specific transcription factor sigma F from its anti-sigma factor SpoIIAB. *J Mol Biol.* 260(2):147-64.

E

Eaton, D., Ensign, J.C. (1980). *Streptomyces viridochromogenes* spore germination initiated by calcium ions. *J Bacteriol.* 143(1):377-82.

Egan, L.A., Busby, R.W., Iwata-Reuyl, D., Townsend, C. A. (1997). Probable role of clavaminic acid as the terminal intermediate in the common pathway to clavulanic acid and the antipodal clavam metabolites. *J Am Chem Soc.* 119(10):2348-55.

Elliot, M.A., Karoonuthaisiri, N., Huang, J., Bibb, M.J., Cohen, S.N., Kao, C.M., Buttner, M.J. (2003). The chaplins: A family of hydrophobic cell-surface proteins involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*. *Genes Dev.* 17(14):1727-40.

Elliot, M.A., Buttner, M. J., Nodwell, J.R. (2008). Multicellular Development in *Streptomyces*. En: *Myxobacteria: Multicellularity and Differentiation*. D. E. Whitworth, ed. Am Soc Microbiol Press, Washington, D.C. 419-39.

Elson, S.W., Baggaley, K.H., Davison, M., Fulston, M., Nicholson, N.H., Risbridger, G.D., Tyler, J.W. (1993). The identification of three new biosynthetic intermediates and one further biosynthetic enzyme in the clavulanic acid pathway. *J Chem Soc, Chem Commun.* 1212-4.

Enguita, F.J., Liras, P., Leitão, A.L., Martín, J.F. (1996). Interaction of the two proteins of the methoxylation system involved in cephamycin C biosynthesis. Immunoaffinity, protein cross-linking, and fluorescence spectroscopy studies. *J Biol Chem.* 271(52):33225-30.

Ettlinger, L., Gäumann, E., Hütter, R., Keller-Schierlein, W., Kradolfer, F., Neipp, L., Prelog, V., Zähler, H. (1959). Stoffwechselprodukte von Actinomyceten, Holomycin. *Helv Chim Acta* 42:563-9.

Eustáquio, A.S., Gust, B., Galm, U., Li, S.M., Chater, K.F., Heide, L. (2005). Heterologous expression of novobiocin and clorobiocin biosynthetic gene clusters. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(5):2452-9.

Euzéby, J. (1997). List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *Int J Syst Bacteriol.* 47(2):590-2.

Evans, G.A., Lewis, K., Rothenberg, B.E. (1989). High efficiency vectors for cosmid microcloning and genomic analysis. *Gene.* 79(1):9-20.

F

Feinberg, A.P., Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem.* 132(1):6-13.

Fernández, M., Sánchez, J. (2002). Nuclease activities and cell death processes associated with the development of surface cultures of *Streptomyces antibioticus* ETH 7451. *Microbiology.* 148(Pt 2):405-12.

Fischbach, M.A., Walsh, C.T. (2006). Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal Peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms. *Chem Rev.* 106(8):3468-96.

Flärdh, K. (2003a). Growth polarity and cell division in *Streptomyces*. *Curr Opin Microbiol* 6(6):564-71.

Flärdh, K. (2003b). Essential role of DivIVA in polar growth and morphogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol.* 49(6):1523-36.

Flärdh, K., Buttner, M.J. (2009). *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat Rev Microbiol.* 7(1):36-49.

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(9):823-32.

Forsman, M., Häggström, B., Lindgren, L., Jaurin, B. (1990). Molecular analysis of β -lactamases from four species of *Streptomyces*: comparison of amino acid sequences with those of other β -lactamases. *J. Gen. Microbiol.* 136(3):589-98.

Foulston, L.C., Bibb, M.J., (2010). Microbisporicin gene cluster reveals unusual features of lantibiotic biosynthesis in actinomycetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107(30):13461-6.

Fowler-Goldsworthy, K., Gust, B., Mouz, S., Chandra, G., Findlay, K.C., Chater, K.F. (2011). The actinobacteria-specific gene *wbIA* controls major developmental transitions in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology*. 157(Pt 5):1312-28.

Funa, N., Ohnishi, Y., Fujii, I., Shibuya, M., Ebizuka, Y., Horinouchi, S. (2005). A new pathway for polyketide synthesis in microorganisms. *Nature*. 400(6747):897-9.

G

Gao, B., Gupta, R.S. (2012). Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum *Actinobacteria*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 76(1):66-112.

Gehring, A. M., Yoo, N. J., Losick, R. (2001). RNA polymerase sigma factor that blocks morphological differentiation by *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol*. 183(20):5991-6.

Gil, J.A., Naharro, G., Villanueva, J.R., Martín, J.F. (1985). Characterization and regulation of p-aminobenzoic acid synthase from *Streptomyces griseus*. *J Gen Microbiol*. 131(6):1279-87.

Glazebrook, M.A., Doull, J.L., Stuttard, C., Vining, L.C. (1990). Sporulation of *Streptomyces venezuelae* in submerged cultures. *J Gen Microbiol*. 136(3):581-8.

Gomez-Escribano, J.P., Martín, J.F., Hesketh, A., Bibb, M.J., Liras, P. (2008). *Streptomyces clavuligerus relA*-null mutants overproduce clavulanic acid and cephamycin C: negative regulation of secondary metabolism by (p)ppGpp. *Microbiology*. 154(Pt 3):744-55.

Gomez-Escribano, J.P., Bibb, M.J. (2011). Engineering *Streptomyces coelicolor* for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *Microb Biotechnol*. 4(2):207-15.

Gomez-Escribano, J.P., Bibb, M.J. (2012). *Streptomyces coelicolor* as an expression host for heterologous gene clusters. *Methods Enzymol*. 517:279-300.

Gomez-Escribano, J.P., Bibb, M.J. (2014). Heterologous expression of natural product biosynthetic gene clusters in *Streptomyces coelicolor*: from genome mining to manipulation of biosynthetic pathways. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 41(2):425-31.

Goodfellow, M., Fiedler, H.P. (2010). A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 98(2):119-42.

Goodfellow, M. (2012a). Phylum XXVI. *Actinobacteria* phyl. nov. En: *Bergey's Manual Systematic Bacteriology (2ª edición), Volumen 5: The Actinobacteria*. M. Goodfellow, P. Kämpfer, H.J. Busse, M. Trujillo, K. Suzuki, W. Ludwig, W.B. Whitman, eds. Springer, New York. 33-4.

Goodfellow, M. (2012b). Class I. *Actinobacteria*. En: *Bergey's Manual Systematic Bacteriology (2ª edición), Volumen 5: The Actinobacteria*. M. Goodfellow, P. Kämpfer, H.J. Busse, M. Trujillo, K. Suzuki, W. Ludwig, W.B. Whitman, eds. Springer, New York. 34-5.

Goranovič, D., Kosec, G., Mrak, P., Fujs, S., Horvat, J., Kuščer, E., Kopitar, G., Petkovic, H. (2010). Origin of the allyl group in FK506 biosynthesis. *J Biol Chem.* 285(19):14292-300.

Goranovič, D., Blažič, M., Magdevska, V., Horvat, J., Kuščer, E., Polak, T., Santos-Aberturas, J., Martínez-Castro, M., Barreiro, C., Mrak, P., Kopitar, G., Kosec, G., Fujs, S., Martín, J.F., Petković, H., (2012). FK506 biosynthesis is regulated by two positive regulatory elements in *Streptomyces tsukubaensis*. *BMC Microbiol.* 12:238.

Gottelt, M., Kol, S., Gomez-Escribano, J.P., Bibb, M.J., Takano, E. (2010). Deletion of a regulatory gene within the *cpk* gene cluster reveals novel antibacterial activity in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology.* 156(Pt 8):2343-53.

Grantcharova, N., Lustig, U., Flärdh, K. (2005). Dynamics of FtsZ assembly during sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol.* 187(9):3227-37.

Gregory, M.A., Till, R., Smith, M.C. (2003). Integration site for *Streptomyces* phage phiBT1 and development of site-specific integrating vectors. *J Bacteriol.* 185(17):5320-3.

Guerra, S.M., Rodríguez-García, A., Santos-Aberturas, J., Vicente, C.M., Payero, T.D., Martín, J.F., Aparicio, J.F. (2012). LAL regulators SCO0877 and SCO7173 as pleiotropic modulators of phosphate starvation response and actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. *PLoS One* 7(2):e31475.

Gust, B., Kieser, T., Chater, K.F. (2002). REDIRECT technology: PCR-targeting system in *Streptomyces coelicolor*. John Innes Centre, Norwich, United Kingdom.

Gust, B., Chandra, G., Jakimowicz, D., Yuqing, T., Bruton, C.J., Chater, K.F. (2004). Lambda red-mediated genetic manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces*. *Adv Appl Microbiol.* 54: 107-28.

H

Hahn, J.S., Oh, S.Y., Roe, J.H. (2002). Role of OxyR as a peroxide-sensing positive regulator in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol.* 184(19):5214-22.

Haiser, H.J., Yousef, M.R., Elliot, M.A. (2009). Cell wall hydrolases affect germination, vegetative growth, and sporulation in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol.* 191(21):6501-12.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 166(4): 557-80.

Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of *E. coli*. En: *DNA cloning: a practical approach*. D.M. Glover, ed. IRL Press. Oxford. 109-35.

Hansen, G.H.A. (1874). Undersøgelser angående spedalskhedens årsager. (Investigations on the causes of leprosy). *Norsk Mag for Lægervidenskaben.* 4:1-88.

- Hardisson, C., Manzanal, M.B., Salas, J.A., Suárez, J.E. (1978). Fine structure, physiology and biochemistry of arthrospore germination in *Streptomyces antibioticus*. *J Gen Microbiol* 105(2):203-14.
- He, X., Li, R., Pan, Y., Liu, G., Tan, H. (2010). SanG, a transcriptional activator, controls nikkomycin biosynthesis through binding to the *sanN-sanO* intergenic region in *Streptomyces ansochromogenes*. *Microbiology*. 156(Pt 3):828-37.
- Heide, L. (2009). Aminocoumarins mutasynthesis, chemoenzymatic synthesis, and metabolic engineering. *Methods Enzymol*. 459:437-55.
- Hempel, A.M., Cantlay, S., Molle, V., Wang, S.B., Naldrett, M.J., Parker, J.L., Richards, D.M., Jung, Y.G., Buttner, M.J., Flärdh, K. (2012). The Ser/Thr protein kinase AfsK regulates polar growth and hyphal branching in the filamentous bacteria *Streptomyces*. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 109(35):E2371–E2379.
- Henderson, D.J., Brolle, D.F., Kieser, T., Melton, R.E., Hopwood, D.A. (1990). Transposition of IS117 (the *Streptomyces coelicolor* A3(2) mini-circle) to and from a cloned target site and into secondary chromosomal sites. *Mol Gen Genet*. 224(1):65-71.
- Henikoff, S., Haughn, G.W., Calvo, J.M., Wallace, J.C. (1988). A large family of bacterial activator proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85(18):6602-6.
- Herbig, A., Nieselt, K. (2011). nocoRNAC: characterization of non-coding RNAs in prokaryotes. *BMC Bioinformatics*. 12:40.
- Hertweck, C., Luzhetskyy, A., Rebets, Y., Bechthold, A. (2007). Type II polyketide synthases: gaining a deeper insight into enzymatic teamwork. *Nat Prod Rep*. 24(1):162-90.
- Higgins, C.E., Kastner, R.E. (1971). *Streptomyces clavuligerus* sp. nov., a beta-Lactam Antibiotic Producer. *Int J Syst Evol Bacteriol*. 21:326-31.
- Higgins, C.E., Hamil, R.L., Sands, T.H., Hoehn, M.M., Davis, N.E. (1974). Letter: The occurrence of deacetoxycephalosporin C in fungi and streptomycetes. *J Antibiot. (Tokyo)*. 27(4):298-300.
- Higo, A., Horinouchi, S., Ohnishi, Y. (2011). Strict regulation of morphological differentiation and secondary metabolism by a positive feedback loop between two global regulators AdpA and BldA in *Streptomyces griseus*. *Mol Microbiol*. 81(6):1607-22.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)*. 11(9):1026-30.
- Hirano, S., Tanaka, K., Ohnishi, Y., Horinouchi, S. (2008). Conditionally positive effect of the TetR-family transcriptional regulator AtrA on streptomycin production by *Streptomyces griseus*. *Microbiology*. 154(Pt 3):905-14.
- Hobbs, G., Frazer, C.M., Gardner, D.C.J., Cullum, J.A., Oliver, S.G. (1989). Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. *Appl Microbiol Biotechnol*. 31(3):272-277.

Hodgson, D.A. (2000). Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria. *Adv Microb Physiol.* 42:47-238.

Holmes, D.S., Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem.* 114(1):193-7.

Hong, H.J., Paget, M.S.B., Buttner, M.J. (2002). A signal transduction system in *Streptomyces coelicolor* that activates the expression of a putative cell wall glycan operon in response to vancomycin and other cell wall-specific antibiotics. *Mol Microbiol.* 44(5):1199-211.

Hopwood, D.A., Wildermuth, H., Palmer, H.M. (1970). Mutants of *Streptomyces coelicolor* defective in sporulation. *J Gen Microbiol.* 61(3):397-408.

Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiate, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M., Schrempf, H. (1985). Genetic manipulation of *Streptomyces*. A laboratory manual. John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom.

Hopwood, D.A., Sherman, D.H. (1990). Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annu Rev Genet.* 24:37-66.

Hopwood, D.A., Kieser, T. (1993). Conjugative plasmids in *Streptomyces*. En: *Bacterial Conjugation*. Don B. Clewell, ed. Plenum Press. New York. 293-312.

Hopwood, D.A., Chater, K.F., Bibb, M.J. (1995). Genetics of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2), a model streptomycete. *Biotechnology.* 28:65-102.

Hopwood, D.A. (2006). Soil To Genomics: The *Streptomyces* Chromosome. *Annu Rev Genet.* 40:1-23.

Hopwood, D.A. (2007). *Streptomyces* in nature and medicine: the antibiotic markers. Oxford University Press, New York.

Horinouchi, S. (2007). Mining and polishing of the treasure trove in the bacterial genus *Streptomyces*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 71(2):283-99.

Hosaka, T., Ohnishi-Kameyama, M., Muramatsu, H., Murakami, K., Tsurumi, Y., Kodani, S., Yoshida, M., Fujie, A., Ochi, K. (2009). Antibacterial discovery in actinomycetes strains with mutations in RNA polymerase or ribosomal protein S12. *Nat Biotechnol.* 27(5):462-64.

Howarth, T.T., Brown, A.G., King, T.J. (1976). Clavulanic acid, a novel β -lactam isolated from *Streptomyces clavuligerus*; X-ray crystal structure analysis. *J Chem Soc, Chem Commun.* 266b-7.

Hu, W.S., Braña, A.F., Demain, A.L. (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(4):155-160.

Huang, C.H., Lin, Y.S., Yang, Y.L., Huang, S.W., Chen, C.W. (1998). The telomeres of *Streptomyces* chromosomes contain conserved palindromic sequences with potential to form complex secondary structures. *Mol Microbiol.* 28(5):905-16.

Huang, J., Shi, J., Molle, V., Sohlberg, B., Weaver, D., Bibb, M. J., Karoonuthaisiri, N., Lih, C.J., Kao, C.M. Buttner, M.J., Cohen, S.N. (2005). Cross-regulation among disparate antibiotic biosynthetic pathways of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol.* 58(5):1276-87.

Huang, S., Zhao, Y., Qin, Z., Wang, X., Onega, M., Chen, L., He, J., Yu, Y., Deng, H. (2011). Identification and heterologous expression of the biosynthetic gene cluster for holomycin produced by *Streptomyces clavuligerus*. *Process Biochem.* 46(3):811-6.

Hudson, M.E., Zhang, D., Nodwell, J.R. (2002). Membrane association and kinase-like motifs of the RamC protein of *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol.* 184(17):4920-4.

Hutchings, M.I., Hong, H.J., Leibovitz, E., Sutcliffe, I.C., Buttner, M.J. (2006). The sigma(E) cell envelope stress response of *Streptomyces coelicolor* is influenced by a novel lipoprotein, CseA. *J Bacteriol.* 188(20):7222-9.

I

Igarashi, Y., Kan, Y., Fujii, K., Fujita, T., Harada, K., Naoki, H., Tabata, H., Onaka, H., Furumai, T. (2001). Goadsporin, a chemical substance which promotes secondary metabolism and morphogenesis in streptomycetes. II. Structure determination. *J Antibiot (Tokyo).* 54(12):1045-53.

Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M., Omura, S. (2003). Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol.* 21(5):526-31.

Ikeda, H., Kazuo, S.Y., Omura, S. (2014). Genome mining of the *Streptomyces avermitilis* genome and development of genome-minimized hosts for heterologous expression of biosynthetic gene clusters. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 41(2):233-50.

Imlay, J.A. (2015). Transcription factors that defend bacteria against reactive oxygen species. *Annu Rev Microbiol.* 69:93-108.

Ishida, K., Hung, T.V., Liou, K., Lee, H.C., Shin, C.H., Sohng, J.K. (2006). Characterization of *pbpA* and *pbp2* encoding penicillin-binding proteins located on the downstream of clavulanic acid gene cluster in *Streptomyces clavuligerus*. *Biotechnol Lett.* 28(6):409-17.

Ishizuka, H., Horinouchi, S., Kieser, H.M., Hopwood, D.A., Beppu, T. (1992). A putative two-component regulatory system involved in secondary metabolism in *Streptomyces* spp. *J Bacteriol.* 174(23):7585-94.

J

Jagetia, A., Jagetia, G.C., Jha, S. (2007). Naringin, a grapefruit flavanone, protects V79 cells against the bleomycin-induced genotoxicity and decline in survival. *J Appl Toxicol.* 27(2):122-32.

Jakimowicz, D., Żydek, P., Kois, A., Zakrzewska-Czerwińska, J., Chater, K.F. (2007). Alignment of multiple chromosomes along helical ParA scaffolding in sporulating *Streptomyces* hyphae. *Mol Microbiol.* 65(3):625-41.

Jakimowicz, D., Van Wezel, G.P. (2012). Cell division and DNA segregation in *Streptomyces*: How to build a septum in the middle of nowhere?. *Mol Microbiol.* 85(3):393-404.

Jensen, S.E., Westlake, D.W.S., Wolfe, S. (1985). Deacetoxycephalosporin C synthetase and deacetoxycephalosporin C hydroxylase are two separate enzymes in *Streptomyces clavuligerus*. *J Antibiot (Tokyo).* 38(2):263-5.

Jensen, S.E., Leskiw, B.K., Vining, L.C., Aharonowitz, Y., Westlake, D.W.S., Wolfe, S. (1986). Purification of isopenicillin N synthetase from *Streptomyces clavuligerus*. *Can J Microbiol.* 32(12):953-8.

Jensen, S.E., Elder, K.J., Aidoo, K.A., Paradkar, A.S. (2000). Enzymes catalyzing the early steps of clavulanic acid biosynthesis are encoded by two sets of paralogous genes in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 44(3):720-6.

Jensen, S.E., Paradkar, A.S., Mosher, R.H., Anders, C., Beatty, P.H., Brumlik, M.J., Griffin, A., Barton, B. (2004). Five additional genes are involved in clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(1):192-202.

Jensen, S.E. (2012). Biosynthesis of clavam metabolites. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 39(10):1407-19.

Jiang, J., He, X., Cane, D.E. (2006). Geosmin biosynthesis. *Streptomyces coelicolor* germacradienol/germacrene D synthase converts farnesyl diphosphate to geosmin. *J Am Chem Soc.* 128(25):8128-9.

Jones, A.C., Gust, B., Kulik, A., Heide, L., Buttner, M.J., Bibb, M.J. (2013). Phage p1-derived artificial chromosomes facilitate heterologous expression of the FK506 gene cluster. *PLoS One.* 8(7):e69319.

K

Kämpfer, P. (2012a). Order XIV. *Streptomycetales* ord. nov. En: *Bergey's Manual Systematic Bacteriology (2ª edición), Volumen 5: The Actinobacteria*. M. Goodfellow, P. Kämpfer, H.J. Busse, M. Trujillo, K. Suzuki, W. Ludwig, W.B. Whitman, eds. Springer, New York. 1446.

Kämpfer, P. (2012b). Family I. *Streptomycetaceae*. En: *Bergey's Manual Systematic Bacteriology (2ª edición), Volumen 5: The Actinobacteria*. M. Goodfellow, P. Kämpfer, H.J. Busse, M. Trujillo, K. Suzuki, W. Ludwig, W.B. Whitman, eds. Springer, New York. 1446-55.

Kämpfer, P. (2012c). Genus I. *Streptomyces*. En: *Bergey's Manual Systematic Bacteriology (2ª edición), Volumen 5: The Actinobacteria*. M. Goodfellow, P. Kämpfer, H.J. Busse, M. Trujillo, K. Suzuki, W. Ludwig, W.B. Whitman, eds. Springer, New York. 1455-767.

- Kang, J.G., Paget, M.S.B., Seok, Y.J., Hahn, M.Y., Bae, J.B., Hahn, J.S., Kleanthous, C., Buttner, M.J., Roe, J.H. (1999). RsrA, an anti-sigma factor regulated by redox change. *EMBO J.* 18(15):4292-8.
- Kang, S.H., Huang, J., Lee, H.N., Hur, Y.A., Cohen, S.N., Kim, E.S. (2007). Interspecies DNA microarray analysis identifies WblA as a pleiotropic down-regulator of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *J Bacteriol.* 189(11):4315-9.
- Katz, L., Donadio, S. (1993). Polyketide synthesis: prospects for hybrid antibiotics. *Annu Rev Microbiol.* 47:875-912.
- Kawai, K., Wang, G., Okamoto, S., Ochi, K. (2007). The rare earth, scandium, causes antibiotic overproduction in *Streptomyces* spp. *FEMS Microbiol Lett.* 274(2):311-5.
- Keen, C.L., Mendelovitz, S., Cohen, G., Aharonowitz, Y., Roy, K.L. (1988). Isolation and characterization of a linear DNA plasmid from *Streptomyces clavuligerus*. *Mol Gen Genet.* 212(1):172-6.
- Keijser, B.J.F., van Wezel, G.P., Canters, G.W., Vijgenboom, E. (2002). Developmental regulation of the *Streptomyces lividans ram* genes: involvement of RamR in regulation of the *ramCSAB* operon. *J Bacteriol.* 184(16):4420-9.
- Kelemen, G.H., Viollier, P.H., Tenor, J.L., Marri, L., Buttner, M.J., Thompson, C.J. (2001). A connection between stress and development in the multicellular prokaryote *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol.* 40(4):804-14.
- Kendrick, K.E., Ensign, J.C. (1983). Sporulation of *Streptomyces griseus* in submerged culture. *J Bacteriol.* 155(1):357-66.
- Kenig, M., Reading, C. (1979). Holomycin and an antibiotic (MM 19290) related to tunicamycin, metabolites of *Streptomyces clavuligerus*. *J Antibiot (Tokyo).* 32(6):549-54.
- Khaleeli, N., Rongfeng, L., Townsend, C.A. (1999). Origin of the β -lactam carbons in clavulanic acid from an usual thiamine pyrophosphate-mediated reaction. *J Am Chem Soc.* 121(39):9223-4.
- Khodakaramian, G., Lissenden, S., Gust, B., Moir, L., Hoskisson, P.A., Chater, K.F., Smith, M.C. (2006). Expression of Cre recombinase during transient phage infection permits efficient marker removal in *Streptomyces*. *Nucleic Acids Res.* 34(3):e20.
- Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., Hopwood, D.A. (2000). *Practical Streptomyces Genetics*. John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom.
- Kim, E.S., Hong, H.J., Choi, C.Y., Cohen S.N. (2001). Modulation of actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces lividans* by glucose repression of *afsR2* gene transcription. *J Bacteriol.* 183(7): 2198-203.
- Kim, H.S., Lee, Y.J., Lee, C.K., Choi, S.U., Yeo, S.H., Hwang, Y.I., Yu, T.S., Kinoshita, H., Nihira, T. (2004). Cloning and characterization of a gene encoding the gamma-butyrolactone autoregulator receptor from *Streptomyces clavuligerus*. *Arch Microbiol.* 182(1):44-50.

Kim, H.S., Park, Y.I. (2007). Lipase activity and tacrolimus production in *Streptomyces clavuligerus* CKD 1119 mutant strains. *J Microbiol Biotechnol.* 17(10):1638-44.

Kim, J.S., Lee, H.N., Kim, P., Lee, H.S., Kim, E.S. (2012b). Negative role of *wblA* in response to oxidative stress in *Streptomyces coelicolor*. *J Microbiol Biotechnol.* 22(6):736-41.

Kim, M.S., Dufour, Y.S., Yoo, J.S., Cho, Y.B., Park, J.H., Nam, G.B., Kim, H.M., Lee, K.L., Donohue, T.J., Roe, J.H. (2012a). Conservation of thiol-oxidative stress responses regulated by SigR orthologues in actinomycetes. *Mol Microbiol.* 85(2):326-44.

Kin, T., Yamada, K., Terai, G., Okida, H., Yoshinari, Y., Ono, Y., Kojima, A., Kimura, Y., Komori, T., Asai, K. (2007). fRNAdb: a platform for mining/ annotating functional RNA candidates from non-coding RNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 35:D145-D148.

Kinashi, H. (2011). Giant linear plasmids in *Streptomyces*: a treasure trove of antibiotic biosynthetic clusters. *J Antibiot (Tokyo).* 64(1):19-25.

Kirby, R., Hopwood, D.A. (1977). Genetic determination of methylenomycin synthesis by the SCP1 plasmid of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Gen Microbiol.* 98(1):239-52.

Kirby, R. (1978). An unstable genetic element affecting the production of the antibiotic holomycin by *Streptomyces clavuligerus*. *FEMS Microbiol Lett.* 3(5):283-6.

Kirby, R. (2011). Chromosome diversity and similarity within the *Actinomycetales*. *FEMS Microbiol Lett.* 319(1):1-10.

Koch, R. (1882). Die Aetiologie der Tuberkulose. (The cause of tuberculosis). *Berliner klinische Wochenschrift.* 19:221-30.

Kodani, S., Hudson, M.E., Durrant, M.C., Buttner, M.J., Nodwell, J.R., Willey, J.M. (2004). The SapB morphogen is a lantibiotic-like peptide derived from the product of the developmental gene *ramS* in *Streptomyces coelicolor*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101(31):11448-53.

Komatsu, M., Uchiyama, T., Omura, S., Cane, D.E., Ikeda, H. (2010). Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism. *Proc Natl Acad Sci.* 107(6):2646-51.

Komatsu, M., Komatsu, K., Koiwai, H., Yamada, Y., Kozono, I., Izumikawa, M., Hashimoto, J., Takagi, M., Omura, S. Shin-ya, K., Cane, D.E., Ikeda, H. (2013). Engineered *Streptomyces avermitilis* host for heterologous expression of biosynthetic gene cluster for secondary metabolites. *ACS Synth Biol.* 2(7):384-96.

Kovacevic, S., Weigel, B.J., Tobin, M.B., Ingolia, T.D., Miller, J.R. (1989). Cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Streptomyces clavuligerus* gene encoding deacetoxycephalosporin C synthetase. *J Bacteriol.* 171(2):754-60.

Kovacevic, S., Tobin, M.B., Miller, J.R. (1990). The beta-lactam biosynthesis genes for isopenicillin N epimerase and deacetoxycephalosporin C synthetase are expressed from a single transcript in *Streptomyces clavuligerus*. *J Bacteriol.* 172(7):3952-8.

Kovacevic, S., Miller, J.R. (1991). Cloning and sequencing of the beta-lactam hydroxylase gene (*cefF*) from *Streptomyces clavuligerus*: gene duplication may have led to separate hydroxylase and expandase activities in the actinomycetes. *J Bacteriol.* 173(1):398-400.

Kumar, V., de la Fuente, J.L., Leitão, A.L., Liras, P., Martín, J.F. (1996). Effect of amplification or targeted disruption of the beta-lactamase gene of *Nocardia lactamdurans* on cephamycin biosynthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45(5):621-8.

Kurt, A., Álvarez-Álvarez, R., Liras, P., Özcengiz, G. (2013). Role of the *cmCH-ccaR* intergenic region and *ccaR* overexpression in cephamycin C biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97(13):5869-80.

Kuščer, 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*. *J Bacteriol.* 189(13):4756-63.

L

Lamari, L., Zitouni, A., Boudjelli, H., Badji, H., Sabaou, N., Lebrihi, A., Lefebvre, G., Seguin, E., Tillequin, F. (2002). New dithiolopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J Antibiot (Tokyo).* 55(8):696-701.

Laureti, L., Song, L., Huang, S., Corre, C., Leblond, P., Challis, G.L., Aigle, B. (2011). Identification of a bioactive 51-membered macrolide complex by activation of a silent polyketide synthase in *Streptomyces ambofaciens*. *Proc Natl Acad Sci.* 108(15):6258-63.

Leadlay, P.F., Staunton, J., Oliynyk, M., Bisang, C., Cortés, J., Frost, E., Hughes-Thomas, Z.A., Jones, M.A., Kendrew, S.G., Lester, J.B., Long, P.F., McArthur, H.A., McCormick, E.L., Oliynyk, Z., Stark, C.B., Wilkinson, C. J. (2001). Engineering of complex polyketide biosynthesis--insights from sequencing of the monensin biosynthetic gene cluster. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 27(6):360-7.

Lechevalier, M.P., Lechevalier, H. (1970). Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int J Syst Bacteriol.* 20:435-43.

Lechevalier, M.P. (1977). Lipids in bacterial taxonomy - a taxonomist's view. *CRC Crit Rev Microbiol.* 5(2):109-210.

Lechevalier, M.P., Stern, A.E., Lechevalier, H.A. (1981). Phospholipids in the taxonomy of actinomycetes. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg I Abt Orig Suppl* 11:111-116.

Lee, E.J., Karoonuthaisiri, N., Kim, H.S., Park, J.H., Cha, C.J., Kao, C.M., Roe, J.H. (2005). A master regulator sigmaB governs osmotic and oxidative response as well as differentiation via a network of sigma factors in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol.* 57(5):1252-64.

Lee, C., Kim, J., Shin, S.G., Hwang, S. (2006). Absolute and relative qPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli*. *J Biotechnol.* 123(3):273-80.

Lehnen, D., Blumer, C., Polen, T., Wackwitz, B., Wendisch, V.F., Uden, G. (2002). LrhA as a new transcriptional key regulator of flagella, motility and chemotaxis in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 45(2):521-32.

Leite, C.A., Cavallieri, A.P., Araujo, M.L. (2013). Enhancing effect of lysine combined with other compounds on cephamycin C production in *Streptomyces clavuligerus*. *BMC Microbiol.* 13:296.

Leskiw, B.K., Lawlor, E.J., Fernandez-Abalos, J.M., Chater, K.F. (1991). TTA codons in some genes prevent their expression in a class of developmental, antibiotic-negative, *Streptomyces* mutants. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88(6):2461-5.

Leskiw, B.K., Aharonowitz, Y., Mevarech, M., Wolfe, S., Vining, L.C., Westlake, D.W.S. y Jensen, S. (1988). Cloning and nucleotide sequence determination of the isopenicillin N synthetase gene from *Streptomyces clavuligerus*. *Gene* 62(2):187-196.

Lewis, K. (2013). Platforms for antibiotic discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 12(5):371-87.

Li, B., Lyle, M.P., Chen, G., Li, J., Hu, K., Tang, L., Alaoui-Jamali, M.A., 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. *Bioorg Med Chem.* 15(13):4601-8.

Li, B., Walsh, C.T. (2010). Identification of the gene cluster for the dithiopyrrolone antibiotic holomycin in *Streptomyces clavuligerus*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107(46):19731-5.

Li, B., Walsh, C.T. (2011). *Streptomyces clavuligerus* Hlml is an intramolecular disulfide-forming dithiol oxidase in holomycin biosynthesis. *Biochemistry.* 50(21):4615-22.

Li, B., Forseth, R.R., Bowers, A.A., Schroeder, F.C., Walsh, C.T. (2012). A backup plan for self-protection: S-methylation of holomycin biosynthetic intermediates in *Streptomyces clavuligerus*. *Chembiochem.* 13(17):2521-6.

Li, B., Wever, W.J., Walsh, C.T., Bowers, A.A. (2014). Dithiopyrrolones: biosynthesis, synthesis, and activity of a unique class of disulfide-containing antibiotics. *Nat Prod Rep.* 31(7):905-23.

Li, R., Khaleeli, N., Townsend, C.A. (2000). Expansion of the clavulanic acid gene cluster: identification and in vivo functional analysis of three new genes required for biosynthesis of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. *J Bacteriol.* 182(14):4087-95.

Li, R., Townsend, C.A. (2006). Rational strain improvement for enhanced clavulanic acid production by genetic engineering of the glycolytic pathway in *Streptomyces clavuligerus*. *Metab Eng.* 8(3):240-52.

Li, R., Xie, Z., Tian, Y., Yang, H., Chen, W., You, D., Liu, G., Deng, Z., Tan, H. (2009). *polR*, a pathway-specific transcriptional regulatory gene, positively controls polyoxin biosynthesis in *Streptomyces cacaoi* subsp. *asoensis*. *Microbiology.* 155(Pt 6):1819-31.

- Li, T., Du, Y., Cui, Q., Zhang, J., Zhu, W., Hong, K., Li, W. (2013). Cloning, characterization and heterologous expression of the indolocarbazole biosynthetic gene cluster from marine-derived *Streptomyces sanyensis* FMA. *Mar Drugs*. 11(2):466-88.
- Li, Y.Q., Chen, P.L., Chen, S.F., Wu, D., Zheng, J. (2004). A pair of two-component regulatory genes *ecrA1/A2* in *S. coelicolor*. *J Zhejiang Univ Sci*. 5(2):173-9.
- Lin, Y.S., Kieser, H.M., Hopwood, D.A., Chen, C.W. (1993). The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. *Mol Microbiol*. 10(5):923-33.
- Ling, L.L., Schneider, T., Peoples, A.J., Spoering, A.L., Engels, I., Conlon, B.P., Mueller, A., Schäberle, T.F., Hughes, D.E., Epstein, S., Jones, M., Lazarides, L., Steadman, V.A., Cohen, D.R., Felix, C.R., Fetterman, K.A., Millett, W.P., Nitti, A.G., Zullo, A.M., Chen, C., Lewis, K. (2015). A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature*. 517(7535):455-9.
- Liras, P. (1999). Biosynthesis and molecular genetics of cephamycins. Cephamycins produced by *Actinomycetes*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 75(1-2):109-24.
- Liras, P., Gomez-Escribano, J.P., Santamarta, I. (2008). Regulatory mechanisms controlling antibiotic production in *Streptomyces clavuligerus*. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 35(7):667-76.
- Liras, P., Demain, A.L. (2009). Chapter 16. Enzymology of beta-lactam compounds with cephem structure produced by actinomycete. *Methods Enzymol*. 458:401-29.
- Liras, P. (2014). Holomycin, a dithiolopyrrolone compound produced by *Streptomyces clavuligerus*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 98(3):1023-30.
- Liu, G., Chater, K.F., Chandra, G., Niu, G., Tan, H. (2013). Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 77(1):112-43.
- Liu, T., Cane, D.E., Deng, Z. (2009). The enzymology of polyether biosynthesis. *Methods Enzymol*. 459:187-214.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods*. 25(4):402-8.
- Locci, R. (1989). *Streptomyces* and related genera. En: *Bergey's Manual Systematic Bacteriology*. S. T. Williams, M. D. Sharpe, J. G. Holt, eds. Williams, Wilkins. Baltimore, USA. 2451-92.
- López-Calleja, A.C., Cuadra, T., Barrios-González, J., Fierro, F., Fernández, F.J. (2012). Solid-state and submerged fermentations show different gene expression profiles in cephalosporin C production by *Acremonium chrysogenum*. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 22(2):126-34.
- López-García, M.T. (2010). Producción de ácido clavulánico en *Streptomyces clavuligerus*: caracterización de la función de AdpA y control transcripcional por los reguladores específicos CcaR y ClaR. Tesis doctoral. Departamento de Biología Molecular. Universidad de León.
- López-García, M.T., Santamarta, I., Liras, P. (2010). Morphological differentiation and clavulanic acid formation are affected in a *Streptomyces clavuligerus adpA*-deleted mutant. *Microbiology*. 156(Pt 8):2354-65.

Lorenzana, L.M., Pérez-Redondo, R., Santamarta, I., Martín, J.F., 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. *J Bacteriol.* 186(11):3431-8.

Lu, Y., Wang, W., Shu, D., Zhang, W., Chen, L., Qin, Z., Yang, S., Jiang, W. (2007). Characterization of a novel two-component regulatory system involved in the regulation of both actinorhodin and a type I polyketide in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 77(3):625-35.

Ludwig, W., Euzéby, J., Schumann, P., Busse, H.J., Trujillo, M.E., Kämpfer, P., Whitman, W.B. (2012a). Road map of the phylum *Actinobacteria*. En: *Bergey's Manual Systematic Bacteriology (2ª edición), Volumen 5: The Actinobacteria*. M. Goodfellow, P. Kämpfer, H.-J. Busse, M. Trujillo, K. Suzuki, W. Ludwig, W.B. Whitman, eds. Springer, New York. 1-28.

Ludwig, W., Euzéby, J., Whitman, W.B. (2012b). Taxonomic outline of the phylum *Actinobacteria*. En: *Bergey's Manual Systematic Bacteriology (2ª edición), Volumen 5: The Actinobacteria*. M. Goodfellow, P. Kämpfer, H.-J. Busse, M. Trujillo, K. Suzuki, W. Ludwig, W.B. Whitman, eds. Springer, New York. 29-31.

M

MacNeil, D.J., Gewain, K.M., Ruby, C.L., Dezeny, G., Gibbons, P.H., MacNeil, T. (1992). Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene.* 111(1):61-8.

Maddocks, S.E., Oyston, P.C. (2008). Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology.* 154(Pt 12):3609-23.

Madduri, K., Stuttard, C., Vining, L.C. (1991). Cloning and location of a gene governing lysine ϵ -aminotransferase, an enzyme initiating β -lactam biosynthesis in *Streptomyces* spp. *J Bacteriol.* 173(3):985-8.

Malpartida, F., Hopwood, D.A. (1984). Molecular cloning of the whole biosynthetic pathway of a *Streptomyces* antibiotic and its expression in a heterologous host. *Nature.* 309(5967):462-4.

Manteca, A., Fernández, M., Sánchez, J. (2005). A death round affecting a young compartmentalized mycelium precedes aerial mycelium dismantling in confluent surface cultures of *Streptomyces antibioticus*. *Microbiology.* 151(Pt 11):3689-97.

Manteca, A., Fernandez, M., Sanchez, J. (2006a). Cytological and biochemical evidence for an early cell dismantling event in surface cultures of *Streptomyces antibioticus*. *Res Microbiol.* 157(2):143-52.

Manteca, A., Mäder, U., Connolly, B.A., Sanchez, J. (2006b). A proteomic analysis of *Streptomyces coelicolor* programmed cell death. *Proteomics.* 6(22):6008-22.

Manteca, A., Claessen, D., Lopez-Iglesias, C., Sanchez, J. (2007). Aerial hyphae in surface cultures of *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* originate from viable segments surviving an early programmed cell death event. *FEMS Microbiol Lett.* 274(1):118-25.

Manteca, A., Alvarez, R., Salazar, N., Yagüe, P., Sanchez, J. (2008). Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of *Streptomyces coelicolor*. *Appl Environ Microbiol.* 74(12):3877-86.

Manteca, A., Sanchez, J. (2009). *Streptomyces* development in colonies and soils. *Appl Environ Microbiol.* 75(9):2920-4.

Manteca, A., Jung, H.R., Schwämmle, V., Jensen, O.N., Sanchez, J. (2010a). Quantitative proteome analysis of *Streptomyces coelicolor* nonsporulating liquid cultures demonstrates a complex differentiation process comparable to that occurring in sporulating solid cultures. *J Proteome Res.* 9(9):4801-1.

Manteca, A., Sanchez, J., Jung, H.R., Schwämmle, V., Jensen, O.N. (2010b). Quantitative proteomics analysis of *Streptomyces coelicolor* development demonstrates that onset of secondary metabolism coincides with hypha differentiation. *Mol Cell Proteomics.* 9(7):1423-36.

Mao, X.M., Sun, Z.H., Liang, B.R., Wang, Z.B., Feng, W.H., Huang, F.L., Li, Y.Q. (2013). Positive feedback regulation of *stgR* expression for secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol.* 195(9):2072-8.

Marsh, E.N., Chang, M.D., Townsend, C.A. (1992). Two isozymes of clavamate synthase central to clavulanic acid formation: cloning and sequencing of both genes from *Streptomyces clavuligerus*. *Biochemistry.* 31(50):12648-57.

Martín, J.F. (1977a). Control of antibiotic synthesis by phosphate. En: *Advances in biochemical engineering*. T. K. Ghose, A. Fiechter, N. Blakebrough, eds. Springer. Heidelberg.

Martín, J.F. (1977b). Biosynthesis of polyene macrolide antibiotics. *Annu Rev Microbiol.* 31: 13-38.

Martín, J.F. (2004). Phosphate control of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites is mediated by the PhoR-PhoP system: an unfinished story. *J Bacteriol.* 186(16):5197-201.

Martín, J.F., Aparicio, J.F. (2009). Enzymology of the polyenes pimaricin and candicidin biosynthesis. *Methods Enzymol.* 459:215-42.

Martín, J.F., Liras, P. (2010). Engineering of regulatory cascades and networks controlling antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Curr Opin Microbiol.* 13(3):263-73.

Martín, J.F., Sola-Landa, A., Santos-Beneit, F., Fernández-Martínez, L.T., Prieto, C., Rodríguez-García, A. (2011). Cross-talk of global nutritional regulators in the control of primary and secondary metabolism in *Streptomyces*. *Microb Biotechnol.* 4(2):165-74.

Martín, J.F., Liras, P. (2012). Cascades and networks of regulatory genes that control antibiotic biosynthesis. En: *Reprogramming Microbial Metabolic Pathways*. X. Wang, J. Chen, P. Quinn, eds. Springer, Dordrecht, Netherlands. 115-38.

- Martínez-Burgo, Y., Álvarez-Álvarez, R., Pérez-Redondo, R., Liras, P. (2014). Heterologous expression of *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 cephamycin C gene cluster. *J Biotechnol.* 186:21-9.
- Martínez-Burgo, Y., Álvarez-Álvarez, R., Rodríguez-García, A., Liras, P. (2015). The pathway-specific regulator ClaR of *Streptomyces clavuligerus* has a global effect on the expression of genes for secondary metabolism and differentiation. *Appl Environ Microbiol.* 81(19):6637-48.
- Martínez-Castro, M., Solera, E., Martín, J.F., Barreiro, C. (2009). Efficient pyramidal arrangement of an ordered cosmid library: rapid screening of genes of the tacrolimus-producer *Streptomyces* sp. ATCC 55098. *J Microbiol Methods.* 78(2):150-4.
- Martínez-Costa, O.H., Martín-Triana, A.J., Martínez, E., Fernández-Moreno, M.A., Malpartida, F. (1999). An additional regulatory gene for actinorhodin production in *Streptomyces lividans* involves a LysR-type transcriptional regulator. *J Bacteriol.* 181(14):4353-64.
- Mazodier, P., Thompson, C., Boccard, F. (1990). The chromosomal integration site of the *Streptomyces* element pSAM2 overlaps a putative tRNA gene conserved among actinomycetes. *Mol Gen Genet.* 222(2-3):431-4.
- Mazza, P., Noens, E.E., Schirner, K., Grantcharova, N., Mommaas, A.M., Koerten, H.K., Muth, G., Flärdh, K., van Wezel, G.P., Wohlleben, W. (2006). MreB of *Streptomyces coelicolor* is not essential for vegetative growth but is required for the integrity of aerial hyphae and spores. *Mol Microbiol.* 60(4):838-52.
- Mazzei, T., Mini, E., Novelli, A., Periti, P. (1993). Chemistry and mode of action of macrolides. *J Antimicrob Chemother.* 31 Suppl C:1-9.
- McAuliffe, O., Ross, R.P., Hill, C. (2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol Rev.* 25(3):285-308.
- McBride, M.J., Ensign, J.C. (1987). Metabolism of endogenous trehalose by *Streptomyces griseus* spores and by spores or cells of other actinomycetes. *J Bacteriol.* 169(11):5002-7.
- McCormick, J.R., Flärdh, K. (2012). Signals and regulators that govern *Streptomyces* development. *FEMS Microbiol Rev.* 36(1):206-31.
- McKenzie, N. L., Nodwell, J.R. (2007). Phosphorylated AbsA2 negatively regulates antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* through interactions with pathway-specific regulatory gene promoters. *J Bacteriol.* 189(14):5284-92.
- Medema, M.H., Trefzer, A., Kovalchuk, A., van den Berg, M., Müller, U., Heijne, W., Wu, L., Alam, M.T., Ronning, C.M., Nierman, W.C., Bovenberg, R.A., Breitling, R., Takano, E. (2010). The sequence of a 1.8-Mb bacterial linear plasmid reveals a rich evolutionary reservoir of secondary metabolic pathways. *Genome Biol Evol.* 2:212-24.
- Medema, M.H., Alam, M.T., Heijne, W.H., van den Berg, M.A., Müller, U., Trefzer, A., Bovenberg, R.A., Breitling, R., Takano, E. (2011). Genome-wide gene expression changes in an industrial clavulanic acid overproduction strain of *Streptomyces clavuligerus*. *Microb Biotechnol.* 4(2):300-5.

- Mehra, S., Lian, W., Jayapal, K.P., Charaniya, S.P., Sherman, D.H., Hu, W.S. (2006). A framework to analyze multiple time series data: a case study with *Streptomyces coelicolor*. J Ind Microbiol Biotechnol. 33(2):159-72.
- Mellado, E., Lorenzana, L.M., Rodríguez-Sáiz, M., Díez, B., Liras, P., Barredo, J.L. (2002). The clavulanic acid biosynthetic cluster of *Streptomyces clavuligerus*: genetic organization of the region upstream of the *car* gene. Microbiology. 148(Pt 5):1427-38.
- Méndez, C., Braña, A.F., Manzanal, M.B., Hardisson, C. (1985). Role of substrate mycelium in colony development in *Streptomyces*. Can J Microbiol. 31(5):446-50.
- Metzker, M.L. (2010). Sequencing technologies-the next generation. Nat Rev Genet. 11(1):31-46.
- Miguélez, E.M., Hardisson, C., Manzanal, M.B. (1999). Hyphal death during colony development in *Streptomyces antibioticus*: Morphological evidence for the existence of a process of cell deletion in a multicellular prokaryote. J Cell Biol. 145(3):515-25.
- Miller, J.H. (1972). Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Minter, D.W. (2009). *Cyberlindnera*, a replacement name for *Lindnera* Kurtzman et al., nom. illegit. Mycotaxon 110:473-6.
- Mo, S.J., Yoo, Y.J., Ban, Y.H., Lee, S.K., Kim, E., Suh, J.W., Yoon, Y.J. (2012). Roles of *fkbN* in positive regulation and *tcs7* in negative regulation of FK506 biosynthesis in *Streptomyces* sp. strain KCTC 11604BP. Appl Environ Microbiol. 78(7):2249-55.
- Mochizuki, S., Hiratsu, K., Suwa, M., Ishii, T., Sugino, F., Yamada, K., Kinashi, H. (2003). The large linear plasmid pSLA2-L of *Streptomyces rochei* has an unusually condensed gene organization for secondary metabolism. Mol Microbiol. 48(6):1501-10.
- Molnár, I., Aparicio, J.F., Haydock, S.F., Khaw, L.E., Schwecke, T., König, A., Staunton, J., Leadlay, P.F. (1996). Organisation of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of genes flanking the polyketide synthase. Gene. 169(1):1-7.
- Mosher, R.H., Paradkar, A.S., Anders, C., Barton, B., Jensen, S.E. (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*. Antimicrob Agents Chemother. 43(5):1215-24.
- Motamedi, H., Shafiee, A. (1998). The biosynthetic gene cluster for the macrolactone ring of the immunosuppressant FK506. Eur J Biochem. 256(3):528-34.
- Mueller, O., Hahnenberger, K., Dittmann, M., Yee, H., Dubrow, R., Nagle, R., Ilsley, D. (2000). A microfluidic system for high-speed reproducible DNA sizing and quantitation. Electrophoresis. 21(1):128-34.
- Mullis, K.B., Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 155:335-50.

Musialowski, M.S., Flett, F., Scott, G.B., Hobbs, G., Smith, C.P., Oliver, S.G. (1994). Functional evidence that the principal DNA replication origin of the *Streptomyces coelicolor* chromosome is close to the *dnaA-gyrB* region. *J Bacteriol.* 176(16):5123-5.

N

Nagarajan, R., Boeck, L.D., Gorman, M., Hamill, R.L., Higgins, C.E., Hoehn, M.M., Stark, W.M., Whitney, J.G. (1971). Beta-lactam antibiotics from *Streptomyces*. *J Am Chem Soc.* 93(9):2308-10.

Nárdiz, N., Santamarta, I., Lorenzana, L.M., Martín, J.F., 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. *Microb Biotechnol.* 4(2):216-25.

Nedal, A., Zotchev, S.B. (2004). Biosynthesis of deoxyaminosugars in antibiotic-producing bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* 64(1):7-15.

Nedal, A., Sletta, H., Brautaset, T., Borgos, S.E.F., Sekurova, O.N., Ellingsen, T.E., Zotchev, S.B. (2007). Analysis of the mycosamine biosynthesis and attachment genes in the nystatin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces noursei* ATCC 11455. *Appl Environ Microbiol.* 73(22):7400-7.

Netolitzky, D.J., Wu, X., Jensen, S.E., Roy, K.L. (1995). Giant linear plasmids of beta-lactam antibiotic producing *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Lett.* 131(1):27-34.

Newman, D.J., Cragg, G.M. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod.* 75(3):311-35.

Nichols, D., Cahoon, N., Trakhtenberg, E.M., Pham, L., Mehta, A., Belanger, A., Kanigan, T., Lewis, K., Epstein, S.S. (2010). Use of ichip for high-throughput in situ cultivation of 'uncultivable' microbial species. *Appl Environ Microbiol.* 76(8):2445-50.

Nicholson, N.H., Baggaley, K.H., Cassels, R., Davison, M., Elson, S.W., Fulston, M., Tyler, J.W., Woroniecki, S.R. (1994). Evidence that the immediate biosynthetic precursor of clavulanic acid is its N-aldehyde analogue. *J Chem Soc, Chem Commun.* 11:1281-2.

Noens, E.E., Mersinias, V., Traag, B.A., Smith, C.P., Koerten, H.K., van Wezel, G.P. (2005). SsgA-like proteins determine the fate of peptidoglycan during sporulation of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol.* 58(4):929-44.

Nothaft, H., Rigali, S., Boomsma, B., Swiatek, M., McDowall, K.J., van Wezel, G.P., Titgemeyer, F. (2010). The permease gene *nagE2* is the key to N-acetylglucosamine sensing and utilization in *Streptomyces coelicolor* and is subject to multi-level control. *Mol Microbiol.* 75(5):1133-44.

O

- Ochi, K. (2007). From microbial differentiation to ribosome engineering. *Biosci Biotechnol Biochem.* 71(6):1373-86.
- Ochi, K., Okamoto, S. (2012). A magic bullet for antibiotic discovery. *Chem Biol.* 19(8):932-34.
- Ochi, K., Hosaka, T. (2013). New strategies for drug discovery: activation of silent or weakly expressed microbial gene clusters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97(1):87-98.
- O'Connor, T.J., Kanellis, P., Nodwell, J.R. (2002). The *ramC* gene is required for morphogenesis in *Streptomyces coelicolor* and expressed in a cell type-specific manner under the direct control of RamR. *Mol Microbiol.* 45(1):45-57.
- O'Connor, T.J., Nodwell, J.R. (2005). Pivotal roles for the receiver domain in the mechanism of action of the response regulator RamR of *Streptomyces coelicolor*. *J Mol Biol.* 351(5):1030-47.
- Ohnishi, Y., Kameyama, S., Osaka, H., Horinouchi, S., (1999). The A-factor regulatory cascade leading to streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: identification of a target gene of the A-factor receptor. *Mol Microbiol.* 34(1):102-11.
- Ohnishi, Y., Nishiyama, Y., Sato, R., Kameyama, S., Horinouchi, S. (2000). An oligoribonuclease gene in *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol.* 182(16):4647-53.
- Ohnishi, Y., Horinouchi, S. (2005). The A-factor regulatory cascade that leads to morphological development and secondary metabolism in *Streptomyces*. *Biofilms.* 1(4):319-28.
- Ohnishi, Y., Yamazaki, H., Kato, J.Y., 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*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 69(3):431-9.
- Ohnishi, Y., Ishikawa, J., Hara, H., Suzuki, H., Ikenoya, M., Ikeda, H., Yamashita, A., Hattori, M., Horinouchi, S. (2008). Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J Bacteriol.* 190(11):4050:60.
- Okamura, K., Soga, K., Shimauchi, Y., Ishikura, T., Lein, J. (1977), Holomycin and N-propionylholothin, antibiotics produced by a cephamycin C producer. *J Antibiot (Tokyo).* 30(4):334-6.
- Olano, C., Lombó, F., Méndez, C., Salas, J.A. (2008). Improving production of bioactive secondary metabolites in actinomycetes by metabolic engineering. *Metab Eng.* 10(5):281-92.
- Olano, C., Méndez, C., Salas, J.A. (2009). Antitumor compounds from marine actinomycetes. *Mar Drugs.* 7(2):210-48.
- Olano, C., García, I., González, A., Rodríguez, M., Rozas, D., Rubio, J., Sánchez-Hidalgo, M., Braña, A.F., Méndez, C., Salas, J.A. (2014). Activation and identification of five clusters for secondary metabolites in *Streptomyces albus* J1074. *Microb Biotechnol.* 7(3):242-56.

Oliva, B., O'Neill, A., Wilson, J.M., O'Hanlon, P.J., Chopra, I. (2001). Antimicrobial properties and mode of action of the pyrrothine holomycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 45(2):532-9.

Olmos, E., Mehmood, N., Haj Husein, L.H., Goergen, J.L., Fick, M., Delaunay, S. (2013). Effects of bioreactor hydrodynamics on the physiology of *Streptomyces*. *Bioprocess Biosyst Eng.* 36(3):259-72.

Omura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Takahashi, C., Shinose, M., Takahashi, Y., Horikawa, H., Nakazawa, H., Osonoe, T., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M. (2001). Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98(21):12215-20.

Onaka, H., Tabata, H., Igarashi, Y., Sato, Y., Furumai, T. (2001). Goadsporin, a chemical substance which promotes secondary metabolism and morphogenesis in streptomycetes. I. Purification and characterization. *J Antibiot (Tokyo).* 54(12):1036-44.

Onaka, H., Taniguchi, S., Igarashi, Y., Furumai, T. (2002). Cloning of the staurosporine biosynthetic gene cluster from *Streptomyces* sp. TP-A0274 and its heterologous expression in *Streptomyces lividans*. *J Antibiot (Tokyo).* 55(12):1063-71.

Ortiz de Orué Lucana, D., Tröller, M., Schrempf, H. (2003). Amino acid residues involved in reversible thiol formation and zinc ion binding in the *Streptomyces reticuli* redox regulator FurS. *Mol Genet Genomics.* 268(5):618-27.

Oster, L.M., Lester, D.R., Terwisscha van Scheltinga, A., Svenda, M., van Lun, M., Génereux, C., Andersson, I. (2006). Insights into cephamycin biosynthesis: the crystal structure of Cmcl from *Streptomyces clavuligerus*. *J Mol Biol.* 358(2):546-58.

P

Paget, M.S.B., Chamberlin, L., Atrih, A., Foster, S.J., Buttner, M.J. (1999a). Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor sigmaE is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol.* 181(1):204-11.

Paget, M.S.B., Leibovitz, E., Buttner, M.J. (1999b). A putative two-component signal transduction system regulates sigmaE, a sigma factor required for normal cell wall integrity in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol.* 33(1):97-107.

Paget, M.S.B., Molle, V., Cohen, G., Aharonowitz, Y., Buttner, M.J. (2001). Defining the disulphide stress response in *Streptomyces coelicolor* A3(2): identification of the sigmaR regulon. *Mol Microbiol.* 42(4):1007-20.

Pan, Y., Liu, G., Yang, H., Tian, Y., Tan, H. (2009). The pleiotropic regulator AdpA-L directly controls the pathway specific activator of nikkomycin biosynthesis in *Streptomyces ansochromogenes*. *Mol Microbiol.* 72(3):710-23.

- Paradkar, A.S., Aidoo, K.A., Wong, A., Jensen, S.E. (1996). Molecular analysis of a beta-lactam resistance gene encoded within the cephamycin gene cluster of *Streptomyces clavuligerus*. *J Bacteriol.* 178(21):6266-74.
- Paradkar, A.S., Aidoo, K.A., Jensen, S.E. (1998). A pathway-specific transcriptional activator regulates late steps of clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Mol Microbiol.* 27(4):831-43.
- Parashar, A., Colvin, K.R., Bignell, D.R., Leskiw, B.K. (2009). BldG and SCO3548 interact antagonistically to control key developmental processes in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol.* 191(8):2541-50.
- Park, J.W., Mo, S.J., Park, S.R., Ban, Y.H., Yoo, Y.J., Yoon, Y.J. (2009). Liquid chromatography-mass spectrometry characterization of FK506 biosynthetic intermediates in *Streptomyces clavuligerus* KCTC 10561BP. *Anal Biochem.* 393(1):1-7.
- Parsek, M.R., Ye, R.W., Pun, P., Chakrabarty, A.M. (1994). Critical nucleotides in the interaction of a LysR-type regulator with its target promoter region. *catBC* promoter activation by CatR. *J Biol Chem.* 269(15):11279-84.
- Peng, S., Zeng, A., Zhong, L., Zhang, R., Zhou, M., Cheng, Q., Zhao, L., Wang, T., Tan, H., Qin, Z. (2013). Three functional replication origins of the linear and artificially circularized plasmid SCP1 of *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology.* 159(Pt 10):2127-40.
- Pereda, A., Summers, R., Katz, L. (1997). Nucleotide sequence of the *ermE* distal flank of the erythromycin biosynthesis cluster in *Saccharopolyspora erythraea*. *Gene.* 193(1):65-71.
- Pérez-Llarena, F.J. (1997). Caracterización de la agrupación de genes de cefamicina C en *Streptomyces clavuligerus*. Tesis doctoral. Departamento de Ecología, Genética y Microbiología. Universidad de León.
- Pérez-Llarena, F.J., Liras, P., Rodríguez-García, A. y Martín, J.F. (1997a). A regulatory gene (*ccaR*) required for cephamycin and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*: amplification results in overproduction of both beta-lactam compounds. *J Bacteriol.* 179(6):2053-9.
- Pérez-Llarena, F.J., Martín, J.F., Galleni, M., Coque, J.J., Fuente, J.L., Frère, J.M., Liras, P. (1997b). The *bla* gene of the cephamycin cluster of *Streptomyces clavuligerus* encodes a class A beta-lactamase of low enzymatic activity. *J Bacteriol.* 179(19):6035-40.
- Pérez-Llarena, F.J., Rodríguez-García, A., Enguita, F.J., Martín, J.F., Liras, P. (1998). The *pcd* gene encoding piperidine-6-carboxylate dehydrogenase involved in biosynthesis of alpha-amino adipic acid is located in the cephamycin cluster of *Streptomyces clavuligerus*. *J Bacteriol.* 180(17):4753-6.
- Pérez-Redondo, R., Rodríguez-García, A., Martín, J.F., 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(2):311-21.

Pérez-Redondo, R., Rodríguez-García, A, Martín, J.F., Liras, P. (1999). Deletion of the *pyc* gene blocks clavulanic acid biosynthesis except in glycerol-containing medium: evidence for two different genes in formation of the C3 unit. *J Bacteriol.* 181(22):6922-8.

Pérez-Redondo, R. (2000). Genética de la producción de ácido clavulánico en *Streptomyces clavuligerus*. Tesis doctoral. Departamento de Ecología, Genética y Microbiología. Universidad de León.

Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29(9):e45.

Pivetti, C.D., Yen, M.R., Miller, S., Busch, W., Tseng, Y.H., Booth, I.R., Saier, M.H.Jr. (2003). Two families of mechanosensitive channel proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67(1):66-85.

Ponchel, F. (2006). Real-Time PCR using SYBR® Green. En: *Real-Time PCR*. M.T. Dorak, ed. Taylor and Francis Group, Abingdon, United Kingdom.

Pospiech, A., Neumann. B. (1995). A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. *Trends Genet.* 11(6):217-8.

Price, N.P., Tsvetanova, B. (2007). Biosynthesis of the tunicamycins: a review. *J Antibiot (Tokyo).* 60(8):485-91.

Q

Qin, Z., Huang, S., Yu, Y., Deng, H. (2013a). Dithiolopyrrolone natural products: Isolation, synthesis and biosynthesis. *Mar Drugs.* 11(10):3970-97.

Qin, Z., Baker, A.T., Raab, A., Huang, S., Wang, T., Yu, Y., Jaspars, M., Secombes, C.J., Deng, H. (2013b). The fish pathogen *Yersinia ruckeri* produces holomycin and uses an RNA methyltransferase for self-resistance. *J Biol Chem.* 288(21):14688-97.

Qu, X., Lei, C., Liu, W. (2011). Transcriptome mining of active biosynthetic pathways and their associated products in *Streptomyces flaveolus*. *Angew Chem Int Ed Engl.* 50(41):9651-4.

R

Ravel, J., Wellington, E.M.H., Hill, R.T. (2000). Interspecific transfer of *Streptomyces* giant linear plasmids in sterile amended soil microcosms. *Appl Environ Microbiol.* 66(2):529-34.

Rawlings, B.J. (1997). Biosynthesis of polyketides. *Nat Prod Rep.* 14:523-56.

Reading, C., Cole, M. (1977). Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 11(5):852-7.

- Reddy, T.B., Thomas, A.D., Stamatis, D., Bertsch, J., Isbandi, M., Jansson, J., Mallajosyula, J., Pagani, I., Lobos, E.A., Kyrpides, N.C. (2015). The Genomes OnLine Database (GOLD) v.5: a metadata management system based on a four level (meta)genome project classification. *Nucleic Acids Res.* 43:D1099-D1106.
- Redenbach, M., Kieser, H.M., Denapaite, D., Eichner, A., Cullum, J., Kinashi, H., Hopwood, D.A. (1996). A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Mol Microbiol.* 21(1):77-96.
- Rich, J.O., Michels, P.C., Khmelnitsky, Y.L. (2002). Combinatorial biocatalysis. *Curr Opin Chem Biol.* 6(2):161-7.
- Rigali, S., Nothaft, H., Noens, E.E., Schlicht, M., Colson, S., Müller, M., Joris, B., Koerten, H.K., Hopwood, D.A., Titgemeyer, F., van Wezel, G.P. (2006). The sugar phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is regulated by the GntR-family regulator DasR and links N-acetylglucosamine metabolism to the control of development. *Mol Microbiol.* 61(5):1237-51.
- Rigali, S., Titgemeyer, F., Barends, S., Mulder, S., Thomae, A.W., Hopwood, D.A., van Wezel, G.P. (2008). Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. *EMBO Rep.* 9(7):670-5.
- Robles-Reglero, V., Santamarta, I., Álvarez-Álvarez, R., Martín, J.F., Liras, P. (2013). Transcriptional analysis and proteomics of the holomycin gene cluster in overproducer mutants of *Streptomyces clavuligerus*. *J Biotechnol.* 163(1):69-76.
- Robles-Reglero, V. (2014). Caracterización de la agrupación génica de biosíntesis de holomicina en *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064. Tesis doctoral. Departamento de Biología Molecular. Universidad de León.
- Rodríguez, H., Rico, S., Díaz, M., Santamaría, R.I. (2013). Two-component systems in *Streptomyces*: key regulators of antibiotic complex pathways. *Microb Cell Fact.* 12:127.
- Rodríguez, M., Núñez, L.E., Braña, A.F., Méndez, C., Salas, J.A., Blanco, G. (2008). Identification of transcriptional activators for thienamycin and cephamycin C biosynthetic genes within the thienamycin gene cluster from *Streptomyces cattleya*. *Mol Microbiol.* 69(3):633-45.
- Rodríguez-García, A., de la Fuente, A., Pérez-Redondo, R., Martín, J.F., Liras, P. (2000). Characterization and expression of the arginine biosynthesis gene cluster of *Streptomyces clavuligerus*. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2(4):543-50.
- Rokas, A., Williams, B.L., King, N., Carroll, S.B. (2003). Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. *Nature.* 425(6960):798-804.
- Romero, J., Liras, P., Martín, J.F. (1984). Dissociation of cephamycin and clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 20:318-25.
- Rozas, D., Gullón, S., Mellado, R.P. (2012). A novel two-component system involved in the transition to secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor*. *PLoS One.* 7(2):e31760.

Ruiz, B., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Sánchez, M., Rocha, D., Sánchez, B., Rodríguez-Sanoja, R., Sánchez, S., Langley, E. (2010). Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. *Crit Rev Microbiol.* 36(2):146-67.

Rutledge, P.J., Challis, G.L. (2015). Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters. *Nat Rev Microbiol.* 13(8):509-23.

Ryu, Y.G., Butler, M.J., Chater, K.F., Lee, K.J. (2006). Engineering of primary carbohydrate metabolism for increased production of actinorhodin in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Environ Microbiol.* 72(11):7132-9.

S

Salas, J.A., Guijarro, J.A., Hardisson, C. (1983). High calcium content in *Streptomyces* spores and its release as an early event during spore germination. *J Bacteriol.* 155(3):1316-23.

Salehi-Najafabadi, Z., Barreiro, C., Rodríguez-García, A., Cruz, A., López, G.E., Martín, J.F., (2014). The gamma-butyrolactone receptors BulR1 and BulR2 of *Streptomyces tsukubaensis*: tacrolimus (FK506) and butyrolactone synthetases production control. *Appl Microbiol Biotechnol.* 98(11):4919-36

Salowe, S.P., Marsh, E.N., Townsend, C.A. (1990). Purification and characterization of clavamate synthase from *Streptomyces clavuligerus*: an unusual oxidative enzyme in natural product biosynthesis. *Biochemistry.* 29(27):6499-508.

Salowe, S.P., Krol, W.J., Iwata-Reuyl, D., Townsend, C.A. (1991). Elucidation of the order of oxidations and identification of an intermediate in the multistep clavamate synthase reaction. *Biochemistry.* 30(8):2281-92.

Sambrook, J., Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3ª edición). Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.

Sánchez, L., Braña, A.F. (1996). Cell density influences antibiotic biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Microbiology.* 142(Pt 5):1209-20.

Sánchez, S., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Sánchez, M., Rocha, D., Sánchez, B., Ávalos, M., Guzmán-Trampe, S., Rodríguez-Sanoja, R., Langley, E., Ruiz, B. (2010). Carbon source regulation of antibiotic production. *J Antibiot (Tokyo).* 63(8):442-59.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 74(12):5463-7.

Santamarta, I., Rodríguez-García, A., Pérez-Redondo, R., Martín, J.F., 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*. *J Bacteriol.* 184(11):3106-13.

Santamarta, I., Pérez-Redondo, R., Lorenzana, L.M., Martín, J.F., Liras, P. (2005). Different proteins bind to the butyrolactone receptor protein ARE sequence located upstream of the regulatory *ccaR* gene of *Streptomyces clavuligerus*. *Mol Microbiol.* 56(3):824-35.

Santamarta, I., López-García, M.T., Pérez-Redondo, R., Koekman, B., Martín, J.F., Liras, P. (2007). Connecting primary and secondary metabolism: AreB, an IclR-like protein, binds the ARE_{*ccaR*} sequence of *S. clavuligerus* and modulates leucine biosynthesis and cephamycin C and clavulanic acid production. *Mol Microbiol.* 66(2):511-24.

Santamarta, I., López-García, M.T., Kurt, A., Nárdiz, N., Álvarez-Álvarez, R., Pérez-Redondo, R., Martín, J.F., Liras, P. (2011). Characterization of DNA-binding sequences for CcaR in the cephamycin-clavulanic acid supercluster of *Streptomyces clavuligerus*. *Mol Microbiol.* 81(4):968-81.

Santos-Aberturas, J. (2011). Modulación de la síntesis de macrólidos poliénicos: el paradigma de la pimaricina. Tesis doctoral. Departamento de Biología Molecular. Universidad de León.

Santos-Aberturas, J., Payero, T.D., Vicente, C.M., Guerra, S.M., Cañibano, C., Martín, J.F., Aparicio, J.F. (2011a). Functional conservation of PAS-LuxR transcriptional regulators in polyene macrolide biosynthesis. *Metab Eng.* 13(6):756-7.

Santos-Aberturas, J., Vicente, C.M., Guerra, S.M., Payero, T.D., Martín, J.F., Aparicio, J.F. (2011b). Molecular control of polyene macrolide biosynthesis: direct binding of the regulator PimM to eight promoters of pimaricin genes and identification of binding boxes. *J Biol Chem.* 286(11):9150-61.

Santos-Aberturas, J., Vicente, C.M., Payero, T.D., Martín-Sánchez, L., Cañibano, C., Martín, J. F., Aparicio, J.F. (2012). Hierarchical control on polyene macrolide biosynthesis: PimR modulates pimaricin production via the PAS-LuxR transcriptional activator PimM. *PLoS One.* 7(6):e38536.

Santos-Beneit, F., Rodríguez-García, A., Franco-Domínguez, E., Martín, J. F. (2008). Phosphate-dependent regulation of the low- and high-affinity transport systems in the model actinomycete *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology.* 154(Pt 8):2356-70.

Santos-Beneit, F., Rodríguez-García, A., Sola-Landa, A., Martín, J.F. (2009). Cross-talk between two global regulators in *Streptomyces*: PhoP and AfsR interact in the control of *afsS*, *pstS* and *phoRP* transcription. *Mol Microbiol.* 72(1):53-68.

Santos-Beneit, F. (2015). The Pho regulon: a huge regulatory network in bacteria. *Front Microbiol.* 6:402.

Sasaki, J., Mizoue, K., Morimoto, S., Omura, S. (1996). Microbial glycosylation of macrolide antibiotics by *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 31080 and distribution of a macrolide glycosyl transferase in several *Streptomyces* strains. *J Antibiot (Tokyo).* 49(11):1110-8.

Sekurova, O.N., Brautaset, T., Sletta, H., Borgos, S.E.F., Jakobsen, O.M., Ellingsen, T.E., Strom, A.R., Valla, S., Zotchev, S.B. (2004). In vivo analysis of the regulatory genes in the nystatin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces noursei* ATCC 11455 reveals their differential control over antibiotic biosynthesis. *J Bacteriol.* 186(5):1345-54.

Sendouda, A., Urabe H., Ogawara. H. (1993). Cloning, nucleotide sequence and expression of a β -lactamase gene from *Streptomyces lavendulae*. FEMS Microbiol Lett. 112(3):343-8.

Schell, M.A. (1993). Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. Annu Rev Microbiol. 47:597-626.

Schlaman, H.R., Okker, R.J., Lugtenberg, B.J. (1992). Regulation of nodulation gene expression by NodD in rhizobia. J Bacteriol. 174(16):5177-82.

Schmittgen, T.D., Zakrajsek, B.A. (2000). Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. J Biochem Biophys Methods. 46(1-2):69-81.

Schroeckh, V., Scherlach, K., Nützmann, H.W., Shelest, E., Schmidt-Heck, W., Schuemann, J., Martin, K., Hertweck, C., Brakhage, A.A. (2009). Intimate bacterial-fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans*. Proc Natl Acad Sci USA. 106(34):14558-63.

Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M., Ragg, T. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. BMC Mol Biol. 7:3.

Schwarzer, D., Finking, R., Marahiel, M.A. (2003). Nonribosomal peptides: from genes to products. Nat Prod Rep. 20(3):275-87.

Schwecke, T., Aharonowitz, Y., Palissa, H., von Döhren, H., Kleinkauf, H., van Liempt, H. (1992). Enzymatic characterisation of the multifunctional enzyme delta-(L-alpha-aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase from *Streptomyces clavuligerus*. Eur J Biochem. 205(2):687-94.

Schwecke, T., Aparicio, J.F., Molnár, I., König, A., Khaw, L.E.E., Haydock, S.F., Oliynyk, M., Caffrey, P., Cortés, J., Lester, J.B. (1995). The biosynthetic gene cluster for the polyketide immunosuppressant rapamycin. Proc Natl Acad Sci U S A. 92(17):7839-43.

Seshime, Y., Juvvadi, P.R., Fujii, I., Kitamoto, K. (2005). Discovery of a novel superfamily of type III polyketide synthases in *Aspergillus oryzae*. Biochem Biophys Res Commun. 331(1):253-60.

Shao, L., Huang, J.J., Yu, Y., Li, M.X., Pu, T., Kan, S.D., Chen, D.J. (2014). Improvement of 7 α -methoxycephalosporins production by overexpression of *cmcJ* and *cmcl* controlled by promoter *ermEp** in *Streptomyces clavuligerus*. J Appl Microbiol. 117(6):1645-54.

Shen, B. (2003). Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. Curr Opin Chem Biol. 7(2):285-95.

Singh, R.K., Singh, P., Sharma, R., Mohapatra, T.M. (2012). Nonribosomal peptide synthesis in microbes. En: *Recent Advances in Microbiology (1ª edición), Volumen 1, Capítulo: 11*. S. P. Tiwari, R. Sharma, R. K. Singh, eds. Nova Science Publisher, New York, USA. 183-194.

Shirling, E.B., Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. Int J Syst Bacteriol. 16(3):313-40.

- Shirling, E.B., Gottlieb, D. (1969). Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. IV. Species descriptions from the second, third and fourth studies. *Int J Syst Bacteriol.* 19: 391-512.
- Shirling, E.B., Gottlieb, D. (1972). Cooperative description of type strains of *Streptomyces*. *Int J Syst Bacteriol.* 22(4):265-394.
- Shu, D., Chen, L., Wang, W., Yu, Z., Ren, C, Zhang, W., Yang, S., Lu, Y., Jiang, W. (2009). *afsQ1-Q2-sigQ* is a pleiotropic but conditionally required signal transduction system for both secondary metabolism and morphological development in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 81(6):1149-60.
- Sim, J., Sim, T.S. (2000). Mutational evidence supporting the involvement of tripartite residues His183, Asp185, and His243 in *Streptomyces clavuligerus* deacetoxycephalosporin C synthase for catalysis. *Biosci Biotechnol Biochem.* 64(4):828-32.
- Smyth, G. (2005). limma: linear models for microarray data. En: *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor. Statistics for biology and health.* Gentleman, R., Carey, V.J., Huber, W., Irizarry, R.A., Dudoit, S. (ed). Springer, New York, NY. 397-420.
- Sola-Landa, A., Rodríguez-García, A., Franco-Domínguez, E., Martín, J.F. (2005). Binding of PhoP to promoters of phosphate-regulated genes in *Streptomyces coelicolor*: identification of PHO boxes. *Mol Microbiol.* 56(5):1373-85.
- Solenberg, P.J., Burgett, S.G. (1989). Method for selection of transposable DNA and characterization of a new insertion sequence, IS493, from *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol.* 171(9):4807-13.
- Song, J.Y., Jeong, H., Yu, D.S., Fischbach, M.A., Park, H.S., Kim, J.J., Seo, J.S., Jensen, S.E., Oh, T.K. Lee, K.J., Kim, J.F. (2010). Draft genome sequence of *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585, a producer of diverse secondary metabolites. *J Bacteriol.* 192(23):6317-8.
- Staunton, J., Caffrey, P., Aparicio, J.F., Roberts, G.A., Bethell, S.S., Leadlay, P.F. (1996). Evidence for a double-helical structure for modular polyketide synthases. *Nat Struct Biol.* 3:188-192.
- Stackebrandt, E., Rainey, F.A., Ward-Rainey, N.L. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 47:479-91.
- Stratigopoulos, G., Gandecha, A.R., Cundliffe, E. (2002). Regulation of tylosin production and morphological differentiation in *Streptomyces fradiae* by TylP, a deduced gamma-butyrolactone receptor. *Mol Microbiol.* 45(3):735-44.
- Sun, H., Liu, Z., Zhao, H., Ang, E.L. (2015). Recent advances in combinatorial biosynthesis for drug discovery. *Drug Des Devel Ther.* 9:823-33.

T

Tahlan, K., Anders, C, Jensen, S.E. (2004a). The Paralogous Pairs of Genes Involved in Clavulanic Acid and Clavam Metabolite Biosynthesis Are Differently Regulated in *Streptomyces clavuligerus*. *J Bacteriol.* 186(18): 6286–97.

Tahlan, K., Park, H.U., Wong, A., Beatty P.H., Jensen, S.E. (2004b). Two sets of paralogous genes encode the enzymes involved in the early stages of clavulanic acid and clavam metabolite biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob Agents Chemother* 48(3):930-9.

Tahlan, K., Anders, C., Wong, A., Mosher, R.H., Beatty, P.H., Brumlik, M.J., Griffin, A., Hughes, C., Griffin, J., Barton, B., Jensen, S.E. (2007). 5S clavam biosynthetic genes are located in both the clavam and paralog gene clusters in *Streptomyces clavuligerus*. *Chem Biol.* 14(2):131-42.

Takano, E. (2006). γ -Butyrolactones: *Streptomyces* signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation. *Curr Opin Microbiol.* 9(3):287-94.

Takatsuki, A., Arima, K., Tamura, G. (1971). Tunicamycin, a new antibiotic. I. Isolation and characterization of tunicamycin. *J Antibiot (Tokyo).* 24(4):215-23.

Tamura, K., Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol.* 10(3):512-26.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A., Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 30(12):2725-9.

Tanaka, A., Takano, Y., Ohnishi, Y., Horinouchi, S. (2007). AfsR recruits RNA polymerase to the *afsS* promoter: a model for transcriptional activation by SARPs. *J Mol Biol.* 369(2):322-33.

Tanaka, Y., Komatsu, M., Okamoto, S., Tokuyama, S., Kaji, A., Ikeda, H., Ochi, K. (2009). Antibiotic overproduction by *rpsL* and *rsmG* mutants of various actinomycetes. *Appl Environ Microbiol.* 75(14):4919-22.

Tanaka, Y., Kasahara, K., Hirose, Y., Murakami, K., Kugimiya, R., Ochi, K. (2013). Activation and products of the cryptic secondary metabolite biosynthetic gene clusters by rifampin resistance (*rpoB*) mutations in *Actinomycetes*. *J Bacteriol.* 195(13):2959-70.

Tao, K., Fujita, N., Ishihama, A. (1993). Involvement of the RNA polymerase alpha subunit C-terminal region in co-operative interaction and transcriptional activation with OxyR protein. *Mol Microbiol.* 7(6):859-64.

Tartof, K.D., Hobbs, C.A. (1987). Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Focus.* 9:2-12.

Tautz, D., Renz, M. (1983). An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. *Anal Biochem.* 132(1):14-9.

Taylor, B.L., Zhulin, I.B. (1999). PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev.* 63(2):479-506.

Te Poele, E.M., Samborsky, M., Oliynyk, M., Leadlay, P.F., Bolhuis, H., Dijkhuizen, L. (2008). Actinomycete integrative and conjugative pMEA-like elements of *Amycolatopsis* and *Saccharopolyspora* decoded. *Plasmid*. 59(3):202-16.

Thai, W., Paradkar, A.S., Jensen, S.E. (2001). Construction and analysis of ss-lactamase-inhibitory protein (BLIP) non-producer mutants of *Streptomyces clavuligerus*. *Microbiology*. 147(Pt 2):325-35.

Thompson, C.J., Ward, J.M., Hopwood, D.A. (1980). DNA cloning in *Streptomyces*: resistance genes from antibiotic-producing species. *Nature*. 286(5772):525-7.

Thompson, C.J., Ward, J.M., Hopwood, D.A. (1982). Cloning of antibiotic resistance and nutritional genes in streptomycetes. *J. Bacteriol.* 151(2):668-77.

Tobin, M.B., Kovacevic, S., Madduri, K., Hoskins, J.A., Skatrud, P.L., Vining, L.C., Stuttard, C., Miller, J.R. (1991). Localization of the lysine epsilon-aminotransferase (*lat*) and delta-(L-alpha-aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase (*pcbAB*) genes from *Streptomyces clavuligerus* and production of lysine epsilon-aminotransferase activity in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 173(19):6223-9.

Trepanier, N.K., Jensen, S.E., Alexander, D.C., Leskiw, B.K. (2002). The positive activator of cephamycin C and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus* is mistranslated in a *bldA* mutant. *Microbiology*. 148(Pt 3):643-56.

Tropel, D., van der Meer, J.R. (2004). Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds. *Microbiol Mol Biol Rev.* 68(3):474-500.

Tsai, H.H., Huang, C.H., Tessmer, I., Erie, D.A., Chen, C.W. (2011). Linear *Streptomyces* plasmids form superhelical circles through interactions between their terminal proteins. *Nucleic Acids Res.* 39(6):2165-74.

Tseng, H.C., Chen, C.W. (1991). A cloned *ompR*-like gene of *Streptomyces lividans* 66 suppresses defective *melC1*, a putative copper-transfer gene. *Mol Microbiol.* 5(5):1187-96.

Tsvetanova, B.C., Kiemle, D.J., Price, N.P. (2002). Biosynthesis of tunicamycin and metabolic origin of the 11-carbon dialdose sugar, tunicamine. *J Biol Chem.* 277(38):35289-96.

Turner, W.B. (1973). Secondary metabolism with special reference to *Actinomycetales*. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser.* 2:209-17.

U

Ueda, K., Oinuma, K.I., Ikeda, K., Hosono, K., Ohnishi, Y., Horinouchi, S., Beppu, T. (2002). AmfS, an extracellular peptidic morphogen in *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol.* 184(5):1488-92.

Ueda, K., Takano, H., Nishimoto, M., Inaba, H., Beppu, T. (2005). Dual transcriptional control of *amfTSBA*, which regulates the onset of cellular differentiation in *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol.* 187(1):135-42.

Uguru, G.C., Stephens, K.E., Stead, J.A., Towle, J.E., Baumberg, S., McDowall, K.J. (2005). Transcriptional activation of the pathway-specific regulator of the actinorhodin biosynthetic genes in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol.* 58(1):131-50.

Usui, S., Yu, C.A. (1989). Purification and properties of isopenicillin N epimerase from *Streptomyces clavuligerus*. *Biochim Biophys Acta.* 999(1):78-85.

V

Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K., Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev.* 60(2):407-38.

Van Keulen, G., Jonkers, H.M., Claessen, D., Dijkhuizen, L., Wösten, H.A.B. (2003). Differentiation and anaerobiosis in standing liquid cultures of *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol.* 185(4):1455-8.

Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G. F., Chater, K. F., van Sinderen, D. (2007). Genomics of *Actinobacteria*: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol Mol Biol Rev.* 71(3):495-548.

Vicente, C.M., Payero, T.D., Santos-Aberturas, J., Barreales, E.G., de Pedro, A., Aparicio, J.F. (2015). Pathway-specific regulation revisited: cross-regulation of multiple disparate gene clusters by PAS-LuxR transcriptional regulators. *Appl Microbiol Biotechnol.* 99(12):5123-35.

Volff, J.N., Altenbuchner, J. (1998). Genetic instability of the *Streptomyces* chromosome. *Mol Microbiol.* 27(2):239-46.

Volff, J.N., Altenbuchner, J. (2000). A new beginning with new ends: linearisation of circular chromosomes during bacterial evolution. *FEMS Microbiol Lett.* 186(2):143-50.

W

Wakamiya, T., Ueki, Y., Shiba, T., Kido, Y., Motoki, Y. (1985). The structure of ancovenin, a new peptide inhibitor of angiotensin I converting enzyme. *Tetrahedron Lett.* 26(5):665-8

Waksman, S.A., Henrici, A.T. (1943). The nomenclature and classification of the *Actinomycetes*. *J. Bacteriol.* 46:337-41.

Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., Gay, N.J. (1982). Distantly related sequence in the alpha- and beta- subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1(8):945-51.

Wang, X.J., Yan, Y.J., Zhang, B., An, J., Wang, J.J., Tian, J., Jiang, L., Chen, Y.H., Huang, S.X., Yin, M., Zhang, J., Gao, A.L., Liu, C.X., Zhu, Z.X., Xiang, W.S. (2010). Genome sequence of the milbemycin-producing bacterium *Streptomyces bingchenggensis*. *J Bacteriol.* 192(17):4526-7.

Ward, J.M., Hodgson, J.E. (1993). The biosynthetic genes for clavulanic acid and cephamycin production occur as a 'super-cluster' in three *Streptomyces*. FEMS Microbiol Lett. 110(2):239-42.

Watrous, J., Roach, P., Alexandrov, T., Heath, B.S., Yang, J.Y., Kersten, R.D., van der Voort, M., Pogliano, K., Gross, H., Raaijmakers, J.M., Moore, B.S., Laskin, J., Bandeira, N., Dorrestein, P.C. (2012). Mass spectral molecular networking of living microbial colonies. Proc Natl Acad Sci. 109(26):E1743-E1752.

Watve, M.G., Tickoo, R., Jog, M.M., Bhole, B.D. (2001). How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*?. Arch Microbiol. 176(5):386-90.

Weber, T., Blin, K., Duddela, S., Krug, D., Kim, H.U., Brucoleri, R., Lee, S.Y., Fischbach, M.A., Müller, R., Wohlleben, W., Breitling, R., Takano, E., Medema, M.H. (2015). antiSMASH 3.0-a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. Nucleic Acids Res. 43(W1):W237-43.

Widdick, D.A., Dodd, H.M., Barraille, P., White, J., Stein, T.H., Chater, K.F., Gasson, M.J., Bibb, M.J. (2003). Cloning and engineering of the cinnamycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces cinnamoneus cinnamoneus* DSM 40005. Proc Natl Acad Sci U S A. 100(7):4316-21.

Webster, J.M., Li, J., Chen, G. (2000). Anticancer property of dithiopyrrolones. U.S. patent number 6,020,360.

Whitney, J.G., Brannon, D.R., Mabe, J.A., Wicker, K.J. (1972). Incorporation of labeled precursors into A16886B, a novel-lactam antibiotic produced by *Streptomyces clavuligerus*. Antimicrob Agents Chemother. 1(3):247-51.

Wietz, M., Mansson, M., Gotfredsen, C.H., Larsen, T.O., Gram, L. (2010). Antibacterial compounds from marine *Vibrionaceae* isolated on a global expedition. Mar Drugs. 8(12):2946-60.

Wietzorrek, A., Bibb, M.J. (1997). A novel family of proteins that regulates antibiotic production in streptomycetes appears to contain an OmpR-like DNA-binding fold. Mol Microbiol. 25(6):1181-4.

Wildermuth, H. (1970). Development and organization of the aerial mycelium in *Streptomyces coelicolor*. J Gen Microbiol. 60(1):43-50.

Wilkinson, C.J., Hughes-Thomas, Z.A., Martin, C.J., Böhm, I., Mironenko, T., Deacon, M., Wheatcroft, M., Wirtz, G., Staunton, J., Leadlay, P.F. (2002). Increasing the efficiency of heterologous promoters in actinomycetes. J Mol Microbiol Biotechnol. 4(4):417-26.

Willemsse, J., Borst, J.W., de Waal, E., Bisseling, T., van Wezel, G.P. (2011). Positive control of cell division: FtsZ is recruited by SsgB during sporulation of *Streptomyces*. Genes Dev. 25(1):89-99.

Wiley, J., Santamaría, R., Guijarro, J., Geistlich, M., Losick, R. (1991). Extracellular complementation of a developmental mutation implicates a small sporulation protein in aerial mycelium formation by *S. coelicolor*. Cell. 65(4):641-50.

Williams, S.T., Goodfellow, M., Alderson, G., Wellington, E.M.H., Sneath, P.H.A., Sackin, M.J. (1983). Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J Gen Microbiol.* 129(6):1743-1813.

Wright, F., Bibb, M.J. (1992). Codon usage in the G+C-rich *Streptomyces* genome. *Gene.* 113(1):55-65.

Wu, K., Chung, L., Revill, W.P., Katz, L., Reeves, C.D. (2000). The FK520 gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* (ATCC 14891) contains genes for biosynthesis of unusual polyketide extender units. *Gene.* 251(1):81-90.

Wu, X., Roy, K.L. (1993). Complete nucleotide sequence of a linear plasmid from *Streptomyces clavuligerus* and characterization of its RNA transcripts. *J Bacteriol.* 175(1):37-52.

X

Xiao, X., Hintermann, G., Häusler, A., Barker, P.J., Foor, F., Demain, A.L., Piret, J. (1993). Cloning of a *Streptomyces clavuligerus* DNA fragment encoding the cephalosporin 7 alpha-hydroxylase and its expression in *Streptomyces lividans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 37(1):84-8.

Xu, G., Wang, J., Wang, L., Tian, X., Yang, H., Fan, K., Yang, K., Tan, H. (2010). 'Pseudo' gammabutyrolactone receptors respond to antibiotic signals to coordinate antibiotic biosynthesis. *J Biol Chem.* 285(35):27440-8.

Y

Yagüe, P., López-García, M.T., Rioseras, B., Sanchez, J., Manteca, A. (2012). New insights on the development of *Streptomyces* and their relationships with secondary metabolite production. *Curr Trends Microbiol.* 8:65-73.

Yagüe, P., López-García, M.T., Rioseras, B., Sánchez, J., Manteca, A. (2013a). Pre-sporulation stages of *Streptomyces* differentiation: state-of-the-art and future perspectives. *FEMS Microbiol Lett.* 342(2):79-88.

Yagüe, P., Rodríguez-García, A., López-García, M.T., Martín, J.F., Rioseras, B., Sánchez, J., Manteca, A. (2013b). Transcriptomic analysis of *Streptomyces coelicolor* differentiation in solid sporulating cultures: first compartmentalized and second multinucleated mycelia have different and distinctive transcriptomes. *PLoS One.* 8(3):e60665.

Yamada, Y., Kuzuyama, T., Komatsu, M., Shin-Ya, K., Omura, S., Cane, D.E., Ikeda, H. (2015). Terpene synthases are widely distributed in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 112(3):857-62.

Yamanaka, K., Oikawa, H., Ogawa, H.O., Hosono, K., Shinmachi, F., Takano, H., Sakuda, S., Beppu, T., Ueda, K. (2005). Desferrioxamine E produced by *Streptomyces griseus* stimulates growth and development of *Streptomyces tanashiensis*. *Microbiology.* 151(Pt 9):2899-905.

Yamazaki, H., Takano, Y., Ohnishi, Y., Horinouchi, S. (2003). *amfR*, an essential gene for aerial mycelium formation, is a member of the AdpA regulon in the A-factor regulatory cascade in *Streptomyces griseus*. *Mol Microbiol.* 50(4):1173-87.

Yang, C.C., Tseng, S.M., Chen, C.W. (2015). Telomere-associated proteins add deoxynucleotides to terminal proteins during replication of the telomeres of linear chromosomes and plasmids in *Streptomyces*. *Nucleic Acids Res.* 43(13):6373-83.

Yepes, A., Rico, S., Rodríguez-García, A., Santamaría, R. I., Díaz, M. (2011). Novel two-component systems implied in antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *PLoS One.* 6(5):e19980.

Yilmaz, E.I., Caydasi, A.K., Ozcengiz, G. (2008). Targeted disruption of homoserine dehydrogenase gene and its effect on cephamycin C production in *Streptomyces clavuligerus*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 35(1):1-7.

Yim, G., Wang, H.H., Davies, J. (2007). Antibiotics as signalling molecules. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 362(1483):1195-200.

Yu, Z., Zhu, H., Dang, F., Zhang, W., Qin, Z., Yang, S., Tan, H., Lu, Y., Jiang, W. (2012). Differential regulation of antibiotic biosynthesis by DraR-K, a novel two-component system in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol.* 85(3):535-56.

Z

Zakrzewska-Czerwińska, J., Schrempf, H. (1992). Characterization of an autonomously replicating region from the *Streptomyces lividans* chromosome. *J Bacteriol.* 174(8):2688-93.

Zelyas, N.J., Cai, H., Kwong, T., Jensen, S.E. (2008). Alanylclavam biosynthetic genes are clustered together with one group of clavulanic acid biosynthetic genes in *Streptomyces clavuligerus*. *J Bacteriol.* 190(24):7957-65.

Zheng, M., Wang, X., Templeton, L.J., Smulski, D.R., LaRossa, R.A., Storz, G. (2001). DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *J Bacteriol.* 183(15):4562-70.

Zhi, X.Y., Li, W.J., Stackebrandt, E. (2009). An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class *Actinobacteria*, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *Int J Syst Evol Microbiol.* 59(Pt 3):589-608.

Zhou, H., Xie, X., Tang, Y. (2008). Engineering natural products using combinatorial biosynthesis and biocatalysis. *Curr Opin Biotechnol.* 19(6):590-6.

Zhou, Z., Gu, J., Du, Y.L., Li, Y.Q., Wang, Y. (2011). The - omics era - toward a systems-level understanding of *Streptomyces*. *Curr Genomics.* 12(6):404-16.

8. Anexo

Anexo

Tabla 7.1. Listado de oligonucleótidos empleados en este trabajo. (*) Temperatura de hibridación empírica (°C).

Nombre	Secuencia de nucleótidos (5' - 3')	Temperatura(*)	Experimento
Capítulo 1			
pbp74_F	GGCGTGCTGCTCGTCAT	60	RT-qPCR
pbp74_R	TGTCGCGCAGGGTGAGGA	60	RT-qPCR
cmcT_F	GGCGGTCATGCTGCTGGTCT	64	RT-qPCR
cmcT_R	CGCTGTGCGGGGGTGATGG	64	RT-qPCR
pcd_F	CAGCAATCAGTGGTACCGACGAGA	66	RT-qPCR
pcd_R	CGCGCAGGCCGAACAGAT	66	RT-qPCR
cefE_F	ACCTCGCCCGTCCCCACCA	62	RT-qPCR
cefE_R	GTCCAGATCCGCTCGAAGTCACCG	62	RT-qPCR
cefD_F	GCTGTGGCAGGCGCGGGAGAG	66	RT-qPCR
cefD_R	GCAGTGACGACGCGACGAGGTTGA	66	RT-qPCR
cmcl_F	TACACACCCAGCTCCACGAT	67	RT-qPCR
cmcl_R	GGACTTCTCCCCGTACCAGT	67	RT-qPCR
cmcJ_F	AGATGCGGCGACTGATG	64	RT-qPCR
cmcJ_R	AGCGGGAGACCGAAGAG	64	RT-qPCR
cefF_F	CGCGCCGCACATCACGACG	62	RT-qPCR
cefF_R	GGATGGCCCCGCACTACGACCTG	62	RT-qPCR
cmcH_F	CCATCAGCTTGCCCCGCTCGTTC	64	RT-qPCR
cmcH_R	CGTGGGCGCGTTTACCTCGTCG	64	RT-qPCR
ccaR_QF	GCTTCCTTGAGATGACCTG	62	RT-qPCR
ccaR_QR	CACCTGGAATGATGTGACGA	62	RT-qPCR
orf10_F	CGCAGGGGCAGCCGTGAAT	60	RT-qPCR
orf10_R	TGCGCTGGCTGGGGGTCTC	60	RT-qPCR
blp_F	GCCTCCGTCATGCCCGTCTG	64	RT-qPCR
blp_R	CGCAGGGCCACTTCTTCTCAAC	64	RT-qPCR

lat_F	CGTACGGCACCGAATAAAGA	60	RT-qPCR
lat_R	TCACCCAGAAGCGGTATCTC	60	RT-qPCR
pcbAB_F	GTGGTGCCGGTTGGTGACGA	64	RT-qPCR
pcbAB_R	CACGCTCGGCATCTGGAAGG	64	RT-qPCR
pcbC_F	GGATCGCCAGGTCGTGCTTCTC	62	RT-qPCR
pcbC_R	CGCGGCTCGGGCTTCTTCTAC	62	RT-qPCR
pcbR_F	GTGGGGCTCGGCTATTGGGGTTAC	60	RT-qPCR
pcbR_R	CCAGGCGCCGAGGAAGGTGT	60	RT-qPCR
hrdB_F (o rpoD_F)	CGCGGCATGCTCTTCT	60	RT-qPCR
hrdB_R (o rpoD_R)	AGGTGGCGTACGTGGAGAAC	60	RT-qPCR
cmcH_ccaR_FD	CAGGAGCCGGATCGTCACAT	Kurt y col., 2013	Localización del cósmido SCos-CF
cmcH_ccaR_RP	ACGGCGACGGGTTCACTAA	Kurt y col., 2013	Localización del cósmido SCos-CF
ccaR_F	ATCATACCATGGACACCTGGAATGATGT	63	Amplificación de ccaR sin promotor
ccaR_R	AATGACAAGCTTTCAGGCCGGGGTACCGACCC	63	Amplificación de ccaR sin promotor
ccaR_REDIRECT_F	CGGCGAGGGCGTGGTTCCTTACAAGGGGGA CCGCCATGATTCGGGGATCCGTGACC	48	Delección de ccaR por ReDirect®
ccaR_REDIRECT_R	GAAACGTCGACAAACATTCCTGATCGCGCGC GGTTTCATGTAGGCTGGAGCTGCTTC	48	Delección de ccaR por ReDirect®
Am_F	CTATGATCGACTGATGTCATCAGCGGTGGAGT GCAATGTC	Bajada gradual de 60 a 50	Confirmación de la delección de ccaR
QRT-2-D	GGGGTAGGGAGGGGAGAGT	Bajada gradual de 60 a 50	Confirmación de la delección de ccaR
cmcJ_FC	GTCGTGAAAGATAAGAGCGC	64	Confirmación de la agrupación de cefamicina
cmcJ_RC	GGTGGAGTTCTTCGACGTCA	64	Confirmación de la agrupación de cefamicina
T3	ATTAACCCTCACTAAAGGGA		Oligonucleótidos para secuenciación
T7	TAATACGACTCACTATAGGG		Oligonucleótidos para secuenciación
Capítulo 2			
claR_F	TCTTTACTGGACGCGGTGGGACACTGCG GAGACCTCATGATTCGGGGATCCGTGACC	48	Delección de claR por ReDirect®
claR_R	CCCGCCCGGTCCGTCCGGACCCGGTCCG CGGCCCGCTCATGTAGGCTGGAGCTGCTTC	48	Delección de claR por ReDirect®
cyp_F	ACATCGGGACCATCTCCTC	Touch down de 68 a 58	Confirmación de la delección de claR

Am_R	TCAGCCAATCGACTGGCGAGCGGCATCG CATTCTTCGCAT	Touch down de 68 a 58	Confirmación de la delección de <i>claR</i>
claR_cF	GGGCGCGTTCGGCTTCCCG	65	Complementación de <i>claR</i>
claR_cR	CCGCTCAGCCGGACATCCG	65	Complementación de <i>claR</i>
SclaA2_010100027570_F	GACCAGGCGGACGACGAG	58	Cuantificación de pSCL1 por qPCR
SclaA2_010100027570_R	ACGAGCAACAGCGACTT	58	Cuantificación de pSCL1 por qPCR
SclaA2_010100027590_F	CCGAGAACCTGTGGGTGAT	60	Cuantificación de pSCL1 por qPCR
SclaA2_010100027590_R	GACAACCGCTCTTCTTCG	60	Cuantificación de pSCL1 por qPCR
parA_F	GCCGAAATCCTTCACAGC	60	Cuantificación de pSCL2 por qPCR
parA_R	AGTCCTCCTCGTCCAGCAT	60	Cuantificación de pSCL2 por qPCR
brp_F	AGGGGGCGCTCTACTTCCACTTC	60	Cuantificación de pSCL4 por qPCR
brp_R	TCGCCTCATCGATCGCCTCT	60	Cuantificación de pSCL4 por qPCR
pSCL4-parB_F	GACGGAGCAGCAGGAGAA	62	Cuantificación de pSCL4 por qPCR
pSCL4-parB_R	AAGCGACTGGAGCGACTG	62	Cuantificación de pSCL4 por qPCR
traA_F	GACCCACCGAGACACC	60	Cuantificación de pSCL4 por qPCR
traA_R	CGAGCAGGACGAAGACG	60	Cuantificación de pSCL4 por qPCR
adpA_F	CCCCATTTTTGAGAGTTCCATC	60	Cuantificación de pSCL por qPCR
adpA_R	GCTACGGTGC GGTCAGTTC	60	Cuantificación de pSCL por qPCR
SCLAV_3946_F	TCCCGTCTCCATCCAC	62	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_3946_R	GCCGAACCTCTGTCAA	62	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_4183_F	CTGCGGCTCGTCTCCTC	64	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_4183_R	CGGGGTCGGTCCGATAG	64	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_4199_F	GACCGACCAGGAGAAGCAC	62	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_4199_R	CGGGTTGAGGTAACAGAAGG	62	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_4764_F	ATCCCCCATTACGATGTCC	60	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_4764_R	GTGCCAGGAGTTGTGAGCAG	60	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_4956_F	CGGAGAGCAAGAAGGAGCAG	60	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_4956_R	ATCGGTGACGAGTATGTCG	60	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_5146_F	GCTGAAGAACCCCGAAGAC	58	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_5146_R	CGTGTGACGCTGTTGGTG	58	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_5267_F	ACGGGGAGGGCTGGAAC	64	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_5267_R	CGGGTCGGTGAGGTAGTG	64	Validación de micromatrices por RT-qPCR

SCLAV_5275_F	GGAGTTCATACGGGGTGAGG	64	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_5275_R	TACGGGCAGTGAGCAGA	64	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_5384_F	TACCTGTCCGAGGAGATCGT	64	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_5384_R	GCGTTGGTGGAACCTCGTAG	64	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_5409_F	CGAACCCGAACACCATCC	62	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_5409_R	CGTCAGCTCCTCGTCCA	62	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_5692_F	CGCTGTACCTCACCCATC	64	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_5692_R	GTGGCCGAGCAGGATCT	64	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_p0566_F	GCACGCTGGAGGAGCAG	67	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_p0566_R	CGCCACGGAGAGACAGG	67	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_p1006_F	CATCGTGACCGACAGCA	62	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_p1006_R	GCAGACACCGCTCCACTC	62	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_p1122_F	CCCAACGCACGAACACT	64	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_p1122_R	GCCTCCACCAAGAACCAC	64	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_p1581_F	GACCTGGATCGGGCTGTAT	58	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_p1581_R	AGGCGGCGGATCACCAC	58	Validación de micromatrices por RT-qPCR
hrdB_F (o rpoD_F)	CGCGGCATGCTCTTCT	60	Validación de micromatrices por RT-qPCR
hrdB_R (o rpoD_R)	AGGTGGCGTACGTGGAGAAC	60	Validación de micromatrices por RT-qPCR
Capítulo 3			
SCLAV_0014_F	CGGCTGTGGGAACCTCGTC	62	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_0014_R	GTCGGGGTCGGGGTGGT	62	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_0785_F	CGGCAAGTCCTCCCTCAT	62	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_0785_R	ACAGGTTGAAGTGCTGGAAG	62	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_3410_F	GCGGTTGGAGCATGTGG	64	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_3410_R	GCGACCCAGAGGTGGAG	64	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_4035_F	GGAAGGGCAAGGACAAGAG	62	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_4035_R	GTGGCGAGGTAGGGGAAC	62	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_4464_F	CGCCGATGTCCTGCTGAC	66	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_4464_R	AGAACGGGGGTGTGCTC	66	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_4484_F	CGCACTTCGCCTACGAC	62	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_4484_R	GCGGATTCTCACGGTTGTTT	62	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_4650_F	CGGCATCGAGGAGATGAG	62	Validación de micromatrices por RT-qPCR

SCLAV_4650_R	AGGGGTAGAGGGTGGCGTA	62	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_5491_F	CGGCTACGACGATGTGC	64	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_5491_R	GAACCCCTTGGACACGAG	64	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_5580_F	GCAGCAGTGTGGAGTGA	62	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_5580_R	GGCGGTTGACGGTGGTG	62	Validación de micromatrices por RT-qPCR
Capítulo 4			
PMRBSD	TACAGGATCCGCTTGCCAGC CTCCGAATTGAC	60	Confirmación de la integración de pimM
PMRBSR	GGAATTCGCCTGTGCCGCT CACTTCACG	60	Confirmación de la integración de pimM
Am_F	CTATGATCGACTGATGTCATC AGCGGTGGAGTGCAATGTC	65	Confirmación de la integración de pIB139
Am_R	TCAGCCAATCGACTGGCGAG CGGCATCGCATTCTTCGCAT	65	Confirmación de la integración de pIB139
SclaA2_010100027690_F	TGCCGTCCCACCACTAGC	60	Cuantificación de pSCL2 por qPCR
SclaA2_010100027690_R	CACCACCGAACCGAAGAAT	60	Cuantificación de pSCL2 por qPCR
SclaA2_010100027930_F	ACGAAGGTCCCCAGGTAGTC	60	Cuantificación de pSCL2 por qPCR
SclaA2_010100027930_R	GCGGCTCAGGAAGATGGA	60	Cuantificación de pSCL2 por qPCR
pimM_F	TTGGAGAATTGACGCACCAG	60	Validación de micromatrices por RT-qPCR
pimM_R	ATCCAGCAGGCGAACCAG	60	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_0142_F	GTGACTACAAGCCCGAGAAC	64	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_0142_R	GGTCCCGCCCTGCCACT	64	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_0833_F	CGGGTCGGCAAGGAGAT	60	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_0833_R	GAAGACGATGTTGGGGCTCT	60	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_0835_F	CGAGCGGATGGGGATAAG	60	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_0835_R	GGGGCAGGACGAAGGTG	60	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_1951_F	TGGCAGTGGTGAACAAA	60	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_1951_R	TGCTGGGCGAGATAGTCGT	60	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_4197_F	GGAAGGTGTTTGGGGTTGT	60	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_4197_R	AACTCGTGGCGGGTCAG	60	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_4207_F	AGCGGGAGACCGAAGAG	64	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_4207_R	AGATGCGGCGACTGATG	64	Validación de micromatrices por RT-qPCR

SCLAV_4466_F	GCGGGGGACAAGGAGCA	66	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_4466_R	CGAGGGAGGACGAGCAG	66	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_5308_F	TTCGGAGAGCAGTTGGAGTT	64	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_5308_R	AACAGAGCAGCGGACCAG	64	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_p0511_F	TCGGAGTTCATCGCAGGA	64	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_p0511_R	CAGGAGTCGGTGGTCAGG	64	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_p0520_F	TGGTCCTGGTGATACTGCTC	60	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_p0520_R	CACATAGGCTGTCGGGTCT	60	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_p0568_F	GGGACGGTGAGTTCTACAGC	62	Validación de micromatrices por RT-qPCR
SCLAV_p0568_R	ACGAAGCAGGCGGTGGT	62	Validación de micromatrices por RT-qPCR
hrdB_F (o rpoD_F)	CGCGGCATGCTCTTCT	60	Validación de micromatrices por RT-qPCR
hrdB_R (o rpoD_R)	AGGTGGCGTACGTGGAGAAC	60	Validación de micromatrices por RT-qPCR

Tabla 7.2. Agrupaciones génicas de metabolitos secundarios cuya expresión se ve modificada en *S. clavuligerus* Δ *cllA*::*aac* en relación a *S. clavuligerus* ATCC 27064. Se muestran los valores de expresión génica relativa, M_c ; de probabilidad corregida por Benjamini-Hochberg, p BH; y el de cambio de expresión, en los tres tiempos de cultivo analizados. Un gen estadísticamente significativo ha de cumplir valores de $M_c \leq -1$ o $M_c \geq 1$ y de p BH $\leq 0,05$. (1) Nombre de los genes de la agrupación génica. (2) Código SCLAV del gen según la base de datos StrepDB. (3) Proteína codificada. (4) El cambio de expresión se indica en veces respecto a la cepa control, tomando esta última como valor 1,0.

Gen ⁽¹⁾	SCLAV ⁽²⁾	Producto ⁽³⁾	M_c			p BH			Cambio de expresión ⁽⁴⁾		
			22,5 h	46,5 h	60 h	22,5 h	46,5 h	60 h	22,5 h	46,5 h	60 h
Agrupación de ácido clavulánico (SMC10)											
<i>ceaS2</i>	SCLAV_4197	Carboxyethylarginine synthase 2	0,20	-1,10	-1,69	8,14E-01	2,22E-02	7,24E-04	1,15	0,47	0,31
<i>bls2</i>	SCLAV_4196	Carboxyethylarginine beta-lactam-synthetase 2	-0,14	-1,37	-1,95	8,83E-01	5,67E-03	2,11E-04	0,91	0,39	0,26
<i>pah2</i>	SCLAV_4195	Proclavaminat amidinohidrolasa 2	0,31	-0,89	-1,51	7,53E-01	1,51E-01	9,77E-03	1,24	0,54	0,35

<i>cas2</i>	SCLAV_4194	Clavamate synthase 2	0,17	-0,84	-1,98	8,71E-01	9,93E-02	2,29E-04	1,13	0,56	0,25
<i>oat2</i>	SCLAV_4193	Glutamate N-acetyltransferase 2	-0,58	-2,49	0,29	2,69E-01	3,01E-06	5,44E-01	0,67	0,18	1,22
<i>oppA1</i>	SCLAV_4192	ABC-type dipeptide transport system	-4,49	-5,00	-4,02	3,10E-10	7,60E-11	1,52E-09	0,04	0,03	0,06
<i>claR</i>	SCLAV_4191	Transcriptional activator	-6,30	-6,28	-5,25	2,11E-09	2,82E-09	3,74E-08	0,01	0,01	0,03
<i>car</i>	SCLAV_4190	Clavalddehyde reductase	-3,29	-3,63	-2,68	9,66E-09	3,68E-09	5,80E-07	0,10	0,08	0,16
<i>cyp</i>	SCLAV_4189	Cytochrome P450-SU2	-6,46	-6,21	-5,25	1,76E-11	2,20E-11	2,27E-10	0,01	0,01	0,03
<i>fd</i>	SCLAV_4188	Ferredoxin	-5,92	-5,51	-4,83	4,13E-12	6,45E-12	5,14E-11	0,02	0,02	0,04
<i>orf12</i>	SCLAV_4187	Beta-lactamase	-5,12	-4,85	-3,83	1,82E-10	2,56E-10	7,08E-09	0,03	0,03	0,07
<i>orf13</i>	SCLAV_4186	Integral membrane protein	-4,32	-4,46	-2,91	5,22E-10	3,51E-10	1,18E-07	0,05	0,05	0,13
<i>orf14</i>	SCLAV_4185	Acetyltransferase GNAT family protein	-5,16	-5,50	-4,11	2,07E-09	1,09E-09	6,48E-08	0,03	0,02	0,06
<i>oppA2</i>	SCLAV_4183	ABC-type dipeptide transport system	-6,21	-6,37	-5,24	4,13E-12	2,59E-12	3,76E-11	0,01	0,01	0,03
<i>orf16</i>	SCLAV_4182	DUF482 domain-containing protein	-6,47	-6,61	-5,67	1,20E-10	2,57E-11	2,29E-10	0,01	0,01	0,02
<i>gcaS</i>	SCLAV_4181	Biotin carboxylase	-5,79	-6,15	-5,14	5,94E-11	2,20E-11	2,53E-10	0,02	0,01	0,03
<i>pbpA</i>	SCLAV_4180	Penicillin-binding protein PBP	0,50	0,55	0,94	7,17E-02	2,80E-02	3,24E-04	1,41	1,46	1,93
<i>pbp2</i>	SCLAV_4179	Penicillin-binding protein	0,33	0,36	0,02	2,05E-02	6,82E-03	9,08E-01	1,26	1,28	1,01
Agrupación de clavamas (SMC9)											
<i>cvm9</i>	SCLAV_2921	DNA-binding protein	-0,20	-0,43	0,06	3,90E-01	1,79E-02	7,74E-01	0,87	0,74	1,05
<i>cvm6</i>	SCLAV_2922	Putative pyridoxal phosphate-dependent aminotransferase	-0,73	-0,40	-0,30	4,27E-01	6,69E-01	7,21E-01	0,60	0,76	0,81
<i>cvm5</i>	SCLAV_2923	Flavin-dependent oxidoreductase	1,07	1,00	-0,08	1,17E-01	1,03E-01	9,21E-01	2,10	2,00	0,94
<i>cvm4</i>	SCLAV_2924	Alpha/beta hydrolase	-0,17	0,26	-0,22	8,02E-01	5,89E-01	6,17E-01	0,89	1,20	0,86
<i>cas1</i>	SCLAV_2925	Clavamate synthase 1	0,20	0,41	-0,81	8,76E-01	6,22E-01	2,19E-01	1,15	1,33	0,57
<i>cvm1</i>	SCLAV_2926	Aldo/keto reductase	-0,08	-0,39	-0,32	8,86E-01	2,08E-01	2,81E-01	0,94	0,77	0,80
<i>cvm2</i>	SCLAV_2927	Hypothetical protein	-0,09	-0,56	-0,45	9,04E-01	1,49E-01	2,30E-01	0,94	0,68	0,73
<i>cvm3</i>	SCLAV_2928	Flavin reductase-like protein	-0,97	-1,29	-0,69	1,14E-01	1,72E-02	1,98E-01	0,51	0,41	0,62
<i>cvm7</i>	SCLAV_2929	Dnrl/RedD/AfsR-family transcriptional regulator	0,64	1,29	0,81	7,30E-02	2,14E-04	9,64E-03	1,56	2,45	1,75
<i>cvm11</i>	SCLAV_2930	Putative translocator	-0,01	0,09	0,84	9,91E-01	8,49E-01	6,14E-03	0,99	1,06	1,78

<i>cvm12</i>	SCLAV_2931	Putative transcriptional regulatory protein	-0,16	-0,17	-0,85	7,60E-01	6,75E-01	5,69E-03	0,90	0,89	0,56
<i>cvm13</i>	SCLAV_2932	Beta-aspartyl-peptidase	0,13	0,38	0,23	8,40E-01	3,10E-01	5,35E-01	1,09	1,30	1,18
<i>cvmH</i>	SCLAV_2933	LanU-like protein	0,14	-0,39	-0,53	8,80E-01	4,76E-01	2,55E-01	1,10	0,76	0,69
<i>cvmP</i>	SCLAV_2934	Putative protein-arginine deiminase	0,51	-1,15	0,25	3,37E-01	6,87E-03	6,06E-01	1,42	0,45	1,19
<i>cvmG</i>	SCLAV_2935	Hypothetical protein	-0,27	0,26	-0,65	6,14E-01	5,51E-01	6,16E-02	0,83	1,20	0,64
Agrupación paróloga de clavamas (SMCp13)											
<i>orfD</i>	SCLAV_p1069	Dehydratase	0,08	0,05	0,04	9,63E-01	9,69E-01	9,68E-01	1,05	1,03	1,02
<i>orfC</i>	SCLAV_p1070	Aminotransferase	0,00	-0,41	-0,29	9,99E-01	4,29E-01	5,73E-01	1,00	0,75	0,82
<i>orfB</i>	SCLAV_p1071	YjgF family regulator	2,44	2,54	0,90	1,66E-05	8,30E-06	4,99E-02	5,43	5,84	1,87
<i>orfA</i>	SCLAV_p1072	Serine hydroxymethyltransferase	0,29	0,01	-0,27	6,93E-01	9,92E-01	6,05E-01	1,22	1,01	0,83
<i>ceaS1</i>	SCLAV_p1074	Carboxyethylarginine synthase isoenzyme 1	0,97	0,43	-0,07	3,37E-01	6,92E-01	9,49E-01	1,95	1,34	0,95
<i>bls1</i>	SCLAV_p1075	Beta-lactam synthetase isoenzyme 1	1,07	1,12	0,03	3,64E-02	1,63E-02	9,64E-01	2,09	2,17	1,02
<i>pah1</i>	SCLAV_p1076	Proclavamate amidinohidrolase 1	1,23	1,15	-0,03	1,05E-01	9,28E-02	9,73E-01	2,34	2,22	0,98
<i>oat1</i>	SCLAV_p1077	Probable glutamate N-acetyltransferase 1	0,38	-0,34	-0,80	8,45E-01	8,28E-01	4,72E-01	1,30	0,79	0,58
<i>cvm6P</i>	SCLAV_p1078	Putative pyridoxal phosphate-dependent aminotransferase	1,07	1,87	0,30	2,48E-02	1,10E-04	5,25E-01	2,09	3,65	1,23
<i>cvm7P</i>	SCLAV_p1079	Putative transcriptional regulator	0,54	0,41	0,15	2,52E-01	3,32E-01	7,52E-01	1,45	1,33	1,11
<i>snk</i>	SCLAV_p1080	Two-component system sensor kinase	-0,58	-0,95	-0,19	4,13E-01	8,05E-02	7,73E-01	0,67	0,52	0,88
<i>res1</i>	SCLAV_p1081	Response regulator receiver protein	-0,09	-0,10	-0,23	8,52E-01	7,89E-01	3,85E-01	0,94	0,94	0,85
<i>res2</i>	SCLAV_p1082	Probable response regulator, two-component system	0,79	0,42	0,15	1,43E-01	4,31E-01	7,96E-01	1,73	1,34	1,11
Agrupación SMCp25											
	SCLAV_p1508	Putative carbamoyl transferase	-3,87	-4,40	-4,10	7,67E-10	1,68E-10	5,86E-10	0,07	0,05	0,06
	SCLAV_p1509	Clavamate synthase-like oxygenase	-3,35	-4,17	-3,76	4,74E-07	2,69E-08	1,38E-07	0,10	0,06	0,07
	SCLAV_p1510	Glycosyl transferase, group 1	-3,85	-4,60	-3,95	2,56E-05	2,25E-06	1,51E-05	0,07	0,04	0,06
Agrupación de cefamicina C (SMC11)											

<i>bla</i>	SCLAV_4215	Type I β -lactamase	1,05	-0,19	-2,25	2,99E-01	8,88E-01	5,39E-03	2,07	0,88	0,21
<i>pbp74</i>	SCLAV_4214	Penicillin-binding protein	-0,05	-0,58	0,18	8,80E-01	1,46E-03	3,25E-01	0,96	0,67	1,13
<i>cmcT</i>	SCLAV_4213	CmcT protein	0,44	-0,40	-0,62	2,85E-01	2,61E-01	5,36E-02	1,36	0,76	0,65
<i>pcd</i>	SCLAV_4212	Piperideine carboxylate dehydrogenase	0,48	-0,35	-0,91	1,57E-01	2,70E-01	1,94E-03	1,39	0,79	0,53
<i>cefE</i>	SCLAV_4211	Deacetoxycephalosporin C synthase	0,66	-0,56	-1,85	4,70E-01	4,84E-01	9,69E-03	1,59	0,68	0,28
<i>cefD</i>	SCLAV_4210	Isopenicillin N epimerase	0,82	-0,63	-2,50	4,53E-01	5,26E-01	2,27E-03	1,77	0,65	0,18
<i>cmcl</i>	SCLAV_4208	Cephalosporin hydroxylase	0,97	-0,49	-2,38	2,52E-01	5,77E-01	9,03E-04	1,96	0,71	0,19
<i>cmcl</i>	SCLAV_4207	Methyltransferase	0,86	-0,79	-2,47	2,92E-01	2,63E-01	3,93E-04	1,81	0,58	0,18
<i>cefF</i>	SCLAV_4206	Deacetoxycephalosporin C hydroxylase	0,89	-0,41	-2,10	3,23E-01	6,69E-01	3,20E-03	1,85	0,76	0,23
<i>cmcH</i>	SCLAV_4205	3'-Hydroxymethylcephem-O-carbamoyltransferase	0,59	-0,94	-2,41	2,18E-01	2,09E-02	2,29E-06	1,51	0,52	0,19
<i>ccaR</i>	SCLAV_4204	Transcriptional regulator	0,86	0,75	-0,41	5,00E-03	8,40E-03	1,38E-01	1,82	1,69	0,75
<i>orf10</i>	SCLAV_4203	Secreted protein	0,67	0,42	0,27	1,48E-01	3,50E-01	5,35E-01	1,59	1,33	1,21
<i>blp</i>	SCLAV_4202	Beta-Lactamase Inhibitory Protein-Like Protein	1,61	0,23	0,14	7,06E-02	8,48E-01	8,96E-01	3,05	1,18	1,10
<i>lat</i>	SCLAV_4201	L-lysine-epsilon aminotransferase	0,65	-0,61	-1,79	4,52E-01	4,08E-01	5,04E-03	1,57	0,66	0,29
<i>pcbAB</i>	SCLAV_4200	ACV synthetase	1,07	-0,49	-2,14	1,06E-01	4,76E-01	4,89E-04	2,10	0,71	0,23
<i>pcbC</i>	SCLAV_4199	Isopenicillin N synthetase	0,61	-0,04	-1,77	1,53E-01	9,55E-01	3,24E-05	1,53	0,97	0,29
<i>pcbR</i>	SCLAV_4198	Beta-lactam antibiotic resistance	0,39	-0,16	0,26	6,93E-02	4,86E-01	1,69E-01	1,31	0,90	1,20
Agrupación de holomicina (SMC18)											
<i>hlmA</i>	SCLAV_5267	Acetyltransferase	8,43	5,68	5,22	7,59E-10	1,29E-07	5,08E-07	345,33	51,28	37,38
<i>hlmB</i>	SCLAV_5268	Acyl-CoA dehydrogenase	6,94	4,31	2,90	5,35E-09	3,46E-06	2,90E-04	122,49	19,78	7,47
<i>hlmC</i>	SCLAV_5269	Thioesterase	8,11	5,66	4,32	5,94E-11	3,68E-09	1,53E-07	275,45	50,48	19,91
<i>hlmD</i>	SCLAV_5270	Glucose-methanol-choline oxidoreductase	8,22	5,41	4,31	2,18E-10	3,79E-08	8,65E-07	297,15	42,54	19,79
<i>hlmE</i>	SCLAV_5271	Non-ribosomal peptide synthetase	8,41	5,55	4,57	2,09E-11	2,62E-09	4,19E-08	339,04	46,93	23,72
<i>hlmF</i>	SCLAV_5272	Cysteine decarboxylase like-protein	8,64	5,42	4,93	1,37E-10	3,94E-08	1,73E-07	399,57	42,84	30,54
<i>hlmG</i>	SCLAV_5273	Globin	7,95	4,84	3,84	1,22E-10	4,59E-08	1,10E-06	247,56	28,56	14,27

	SCLAV_p1471	Hypothetical protein	-1,89	-1,62	-2,15	1,09E-03	2,85E-03	1,71E-04	0,27	0,32	0,22
	SCLAV_p1472	Hypothetical protein	-0,85	-0,84	-0,49	2,84E-01	2,13E-01	4,71E-01	0,56	0,56	0,71
	SCLAV_p1473	Hypothetical protein	-1,49	-1,16	-1,15	3,03E-03	1,01E-02	1,06E-02	0,36	0,45	0,45
	SCLAV_p1474	Putative indigoidine synthase IndC	-5,47	-4,99	-3,87	4,87E-12	1,15E-11	3,09E-10	0,02	0,03	0,07
	SCLAV_p1475	Possible transport protein	-5,44	-5,15	-4,83	5,84E-10	1,16E-09	3,61E-09	0,02	0,03	0,04
	SCLAV_p1476	Serine O-acetyltransferase	-2,86	-2,62	-2,59	2,76E-06	7,47E-06	8,85E-06	0,14	0,16	0,17
	SCLAV_p1477	Cysteine synthase	-1,34	-1,30	-1,04	2,74E-02	1,95E-02	5,29E-02	0,39	0,41	0,48
	SCLAV_p1478	Hypothetical protein	-5,48	-4,58	-4,38	9,13E-10	1,13E-08	2,48E-08	0,02	0,04	0,05
	SCLAV_p1479	Hypothetical protein	-1,18	-1,46	-1,57	9,47E-02	2,04E-02	1,09E-02	0,44	0,36	0,34
	SCLAV_p1480	Inhibitor_I36 domain-containing protein	-2,48	-2,24	-2,10	1,18E-06	4,44E-06	9,60E-06	0,18	0,21	0,23
	SCLAV_p1481	Hypothetical protein	-2,95	-3,10	-3,02	3,37E-05	1,49E-05	1,96E-05	0,13	0,12	0,12
	SCLAV_p1482	DUF1254 multi-domain protein	-5,31	-6,34	-5,73	7,40E-09	9,18E-10	4,61E-09	0,03	0,01	0,02
	SCLAV_p1483	DUF1214 domain-containing protein	-4,49	-4,76	-3,75	2,31E-08	1,44E-08	3,95E-07	0,04	0,04	0,07
Agrupación SMC6											
	SCLAV_1942	TetR-family transcriptional regulator	0,28	0,65	-1,88	5,10E-01	3,76E-02	1,87E-06	1,22	1,57	0,27
	SCLAV_1943	Acetyl/propionyl CoA carboxylase	0,26	2,42	-3,54	7,64E-01	3,76E-05	3,84E-07	1,20	5,36	0,09
	SCLAV_1944	Acetyl/propionyl CoA carboxylase alpha subunit	0,01	1,64	-3,48	9,95E-01	8,25E-05	7,31E-09	1,01	3,12	0,09
	SCLAV_1945	Putative hydroxymethylglutaryl-CoA lyase	-0,57	1,98	-3,93	3,18E-01	1,04E-04	2,30E-08	0,67	3,94	0,07
	SCLAV_1946	Acyl-CoA dehydrogenase	-0,18	1,97	-3,99	8,40E-01	2,14E-04	4,26E-08	0,88	3,92	0,06
	SCLAV_1947	Siderophore-interacting protein	-0,16	-3,94	-3,17	9,60E-01	3,42E-03	1,31E-02	0,89	0,06	0,11
	SCLAV_1948	Pyridoxal-dependent decarboxylase	-0,67	-6,92	-2,09	8,37E-01	2,48E-04	2,31E-01	0,63	0,01	0,24
	SCLAV_1949	Cadaverine N-monooxygenase	-1,03	-6,46	-1,66	6,81E-01	2,19E-04	3,10E-01	0,49	0,01	0,32
	SCLAV_1950	Acetyltransferase	-1,41	-6,90	-2,51	5,17E-01	9,05E-05	1,04E-01	0,38	0,01	0,18
	SCLAV_1951	Nocardamine synthetase	-1,48	-6,79	-2,34	4,41E-01	4,04E-05	9,77E-02	0,36	0,01	0,20
	SCLAV_1952	Hypothetical protein	-0,39	-1,73	-0,32	5,97E-01	9,99E-04	5,58E-01	0,76	0,30	0,80

	SCLAV_1953	Hypothetical protein	-0,22	-0,68	0,14	5,71E-01	1,19E-02	6,63E-01	0,86	0,62	1,10
	SCLAV_1954	Hypothetical protein	-0,07	0,12	-0,04	9,67E-01	9,22E-01	9,66E-01	0,95	1,08	0,97
	SCLAV_1955	L-glutamine-D-fructose-6-phosphate amidotransferase	-0,37	-0,98	0,50	2,60E-01	6,61E-04	5,80E-02	0,77	0,51	1,41
Agrupación SMCp14 (Estaurosporina)											
	SCLAV_p1107	Transcriptional regulator	0,08	-0,77	0,08	9,29E-01	5,39E-02	8,84E-01	1,06	0,59	1,05
	<i>staC</i>	Monoxygenase StaC	-0,17	-0,20	-0,25	7,54E-01	6,44E-01	4,70E-01	0,89	0,87	0,84
	<i>staMB</i>	Methyltransferase StaMB	-0,42	-0,81	-0,09	6,88E-01	2,55E-01	9,25E-01	0,75	0,57	0,94
	<i>staE</i>	3,5-Epimerase StaE	-0,24	-0,16	-0,08	7,32E-01	7,99E-01	8,91E-01	0,84	0,89	0,95
	<i>stal</i>	Aminotransferase Stal	0,00	0,47	0,96	9,99E-01	7,98E-01	4,79E-01	1,00	1,39	1,95
	<i>staK</i>	4-Ketoreductase StaK	0,17	0,37	-0,35	8,85E-01	6,15E-01	5,89E-01	1,12	1,29	0,78
	<i>staJ</i>	2,3-Dehydratase StaJ	0,07	-0,23	-0,40	9,51E-01	7,35E-01	4,46E-01	1,05	0,85	0,76
	<i>staMA</i>	Methyltransferase StaMA	0,03	-0,24	-0,86	9,85E-01	7,79E-01	1,48E-01	1,02	0,85	0,55
	<i>staP</i>	Cytochrome P450 StaP	-0,39	-0,10	-0,78	6,21E-01	9,08E-01	1,30E-01	0,76	0,93	0,58
	<i>staD</i>	Chromopyrrolic acid synthase StaD	-0,31	-0,62	0,01	6,56E-01	2,02E-01	9,84E-01	0,80	0,65	1,01
	<i>staO</i>	L-amino acid oxidase StaO	0,09	0,00	-0,02	9,26E-01	1,00E+00	9,73E-01	1,06	1,00	0,99
	<i>staG</i>	N-glycosyltransferase StaG	-0,23	-0,87	-0,21	8,66E-01	2,54E-01	8,10E-01	0,85	0,55	0,87
	<i>staN</i>	Cytochrome P450 StaN	0,00	-0,14	-0,01	9,99E-01	7,63E-01	9,82E-01	1,00	0,91	0,99
	<i>staA</i>	Glucose-1-phosphate thymidyltransferase StaA	-0,27	-0,11	-0,43	4,78E-01	7,71E-01	1,09E-01	0,83	0,92	0,74
	<i>staB</i>	dTDP-glucose 4,6- dehydratase StaB	-0,64	-0,33	-0,25	2,61E-02	2,51E-01	3,72E-01	0,64	0,80	0,84
	<i>staR</i>	Transcriptional activator StaR	1,55	2,95	2,30	1,79E-02	2,40E-05	3,10E-04	2,92	7,71	4,93
	SCLAV_p1123	Putative methyltransferase	4,57	6,13	6,07	7,30E-07	1,60E-08	2,40E-08	23,83	70,03	66,95

Tabla 7.3. Genes reguladores sobreexpresados o subexpresados en *S. clavuligerus* Δ *clavR::aac* en relación a *S. clavuligerus* ATCC 27064. Ver la leyenda de la tabla 7.2.

SCLAV ⁽²⁾	Producto ⁽³⁾	M _c			p BH			Cambio de expresión ⁽⁴⁾		
		22,5 h	46,5 h	60 h	22,5 h	46,5 h	60 h	22,5 h	46,5 h	60 h
Sobreexpresados										
SCLAV_4082	RNA polymerase sigma factor, RpoE	1,98	2,60	1,18	3,93E-09	1,67E-10	4,57E-06	3,96	6,06	2,27
SCLAV_4083	Putative anti-sigma factor, RsrA	1,70	2,03	0,62	8,71E-07	8,18E-08	1,65E-02	3,25	4,08	1,54
SCLAV_5384	GntR-family transcriptional regulator	1,08	1,11	1,59	4,71E-03	2,16E-03	5,78E-05	2,11	2,16	3,01
SCLAV_5409	ArsR-family transcriptional regulator	1,20	1,48	1,78	5,64E-05	3,52E-06	3,94E-07	2,30	2,79	3,43
SCLAV_5692	LysR-family transcriptional regulator	1,33	1,33	1,99	7,86E-03	4,70E-03	9,51E-05	2,51	2,51	3,96
SCLAV_p1122	Staurosporine biosynthesis transcriptional activator, StaR (in SMCp14)	1,55	2,95	2,30	1,79E-02	2,40E-05	3,10E-04	2,92	7,71	4,93
Subexpresados										
SCLAV_2257	Two-component system response regulator	-1,16	-1,75	-1,41	3,81E-04	5,43E-06	6,77E-05	0,45	0,30	0,38
SCLAV_4956	Transcriptional regulator, AmfR	-5,28	-5,93	-5,63	1,37E-10	2,57E-11	8,70E-11	0,03	0,02	0,02
SCLAV_p0151	Putative transcriptional activator srcap-like protein	-1,53	-1,91	-1,71	3,15E-04	1,78E-05	6,14E-05	0,35	0,27	0,31
SCLAV_p1354	AraC-family transcriptional regulator (in SMCp21)	-5,30	-4,83	-3,71	2,27E-10	5,90E-10	2,46E-08	0,03	0,04	0,08
SCLAV_p1419	Putative MarR-family transcriptional regulator	-1,44	-1,27	-1,68	4,22E-02	4,97E-02	7,79E-03	0,37	0,41	0,31
SCLAV_p1438	Sensor protein, CutS	-3,93	-4,26	-2,33	1,38E-07	7,14E-08	1,27E-04	0,07	0,05	0,20
SCLAV_p1439	Response regulator receiver, CutR	-3,22	-3,33	-2,34	8,89E-06	5,01E-06	2,53E-04	0,11	0,10	0,20
SCLAV_p1461	Two component transcriptional regulator, winged helix family	-1,21	-1,30	-1,10	3,66E-03	1,19E-03	3,81E-03	0,43	0,41	0,47
SCLAV_p1462	Histidine kinase	-1,75	-1,65	-1,19	2,41E-04	3,26E-04	4,57E-03	0,30	0,32	0,44
SCLAV_p1581	BadM/Rrf2-family transcriptional regulator	-4,53	-4,26	-4,72	1,88E-08	5,43E-08	1,94E-08	0,04	0,05	0,04
SCLAV_p1587	LysR-family transcriptional regulator	-3,20	-3,31	-3,63	9,77E-06	3,93E-06	1,36E-06	0,11	0,10	0,08

Tabla 7.4. Ortólogos del regulón SigR de *S. coelicolor* cuya expresión se ve modificada en *S. clavuligerus* Δ *clar::aac* en relación a *S. clavuligerus* ATCC 27064. (1) Clasificación según Kim y col. (2012) de las 14 categorías (Cat.) en las que se agrupan los genes del regulón SigR: 1) homeostasis del tiol; 2) metabolismo del azufre; 3) modulación de ribosomas y/o traducción; 4) metabolismo del nucleótido guanina; 5) degradación de proteínas; 6) reguladores transcripcionales o proteínas de unión a ADN; 7) transportadores o proteínas integrales de membrana; 8) oxidorreductasas; 9) metabolismo energético; 10) reparación el daño a ADN y recombinación; 11) metabolismo de cofactores; 12) metabolismo de lípidos; 13) otros; 14) funciones no predichas. (2) y (3) código de los ortólogos de *S. coelicolor* y *S. clavuligerus* según la base de datos StrepDB, respectivamente. Los genes de *S. coelicolor* cuyo promotor presenta sitio de unión para SigR se marcan con un asterisco (*) y los altamente conservados en actinomicetos con (C). (4) Proteína codificada). Cuando corresponde, se indica entre paréntesis la agrupación de metabolitos secundarios a la que pertenece el gen. (5) El cambio de expresión se indica en veces respecto a la cepa control, tomando esta última como valor 1,0.

Cat. ⁽¹⁾	SCO ⁽²⁾	SCLAV ⁽³⁾	Gen	Producto ⁽⁴⁾	M _c			p BH			Cambio de expresión ⁽⁵⁾		
					22,5 h	46,5 h	60 h	22,5 h	46,5 h	60 h	22,5 h	46,5 h	60 h
1	SCO3890* ^C	SCLAV_2898	<i>trxB</i>	Thioredoxin reductase	2,15	2,29	0,97	6,48E-06	2,47E-06	1,12E-02	4,44	4,89	1,96
1	SCO3889	SCLAV_2899	<i>trxA</i>	Thioredoxin	2,23	2,82	0,68	8,47E-05	2,50E-06	1,51E-01	4,69	7,06	1,60
1	SCO4204*	SCLAV_3213		Glycosyltransferase	2,79	2,72	1,11	< 1E-06	< 1E-06	3,98E-05	6,92	6,59	2,16
1	SCO4205	SCLAV_3214		DUF2596 domain-containing protein	1,53	1,40	1,42	3,75E-05	8,39E-05	6,56E-05	2,89	2,64	2,68
1	SCO4967*	SCLAV_3864		LmbE-family protein	1,69	1,51	0,66	< 1E-06	< 1E-06	2,37E-03	3,23	2,85	1,58
1	SCO4968	SCLAV_3865		Hypothetical protein	0,54	0,68	0,25	5,53E-01	3,47E-01	7,49E-01	1,46	1,60	1,19
1	SCO5187* ^C	SCLAV_4051		Putative glutaredoxin-like protein	1,76	2,09	1,00	2,79E-04	2,76E-05	1,75E-02	3,39	4,26	2,00
2	SCO2910	SCLAV_2020		Cysteine synthase	1,24	-0,17	1,08	2,50E-04	6,70E-01	6,04E-04	2,37	0,89	2,11
2	SCO2911*	SCLAV_2021		ThiS domain-containing protein	1,21	0,07	1,72	1,85E-03	9,06E-01	2,94E-05	2,31	1,05	3,29
2	SCO4956* ^C	SCLAV_3848		Peptide methionine sulfoxide reductase	1,69	2,22	0,72	1,75E-05	< 1E-06	2,50E-02	3,23	4,66	1,65
2	SCO6061*	SCLAV_4869		Oxidoreductase	1,13	2,57	1,14	6,63E-05	< 1E-06	4,42E-05	2,19	5,94	2,20

3	SCO1513*	SCLAV_0744	<i>relA1</i>	Putative ppGpp synthetase	0,30	0,87	0,20	3,85E-01	1,63E-03	4,94E-01	1,23	1,83	1,15
3	SCO1598*	SCLAV_0823	<i>rplT</i>	50S ribosomal protein L20	-0,16	-0,14	0,24	7,64E-01	7,59E-01	4,83E-01	0,90	0,91	1,18
3	SCO1599*	SCLAV_0824	<i>rplM</i>	50S ribosomal protein L35	-0,19	-0,12	0,25	5,08E-01	6,63E-01	2,18E-01	0,88	0,92	1,19
3	SCO1600*	SCLAV_0825	<i>infC</i>	Translation initiation factor IF-3	0,08	-0,03	0,13	9,34E-01	9,67E-01	8,13E-01	1,06	0,98	1,09
3	SCO1758*	SCLAV_0971	<i>engA</i>	GTP-binding protein engA	0,24	-0,13	0,36	2,83E-01	5,67E-01	4,21E-02	1,18	0,91	1,29
3	SCO2595*	SCLAV_1763	<i>obgE</i>	GTPase obg	0,01	0,07	0,38	9,96E-01	9,04E-01	2,54E-01	1,00	1,05	1,30
3	SCO5359* ^C	SCLAV_4257	<i>rpmE</i>	50S ribosomal protein L31	0,84	1,12	0,61	3,04E-03	1,09E-04	1,56E-02	1,79	2,17	1,53
3	SCO5360 ^C	SCLAV_4258		Peptide chain release factor 1	1,10	0,83	1,33	1,35E-02	4,36E-02	1,37E-03	2,14	1,78	2,51
3	SCO5361	SCLAV_4259		Methyltransferase	0,36	0,05	1,09	7,06E-01	9,64E-01	6,23E-02	1,28	1,04	2,13
3	SCO5705*	SCLAV_4600		DUF448 domain-containing protein	0,08	0,26	-0,45	8,45E-01	2,83E-01	3,96E-02	1,06	1,20	0,73
3	SCO5706	SCLAV_4602	<i>infB2</i>	Translation initiation factor IF-2	-0,05	-0,03	-0,50	8,93E-01	9,39E-01	6,04E-03	0,97	0,98	0,71
3	SCO5707	SCLAV_4603		DUF503 domain-containing protein	-0,27	0,04	-0,14	4,91E-01	9,40E-01	6,79E-01	0,83	1,03	0,91
3	SCO5708	SCLAV_4604	<i>rbfA</i>	Ribosome-binding factor A	-0,03	0,26	0,18	9,66E-01	3,71E-01	5,33E-01	0,98	1,20	1,13
3	SCO5709	SCLAV_4605	<i>truB</i>	tRNA pseudouridine synthase B	0,03	0,11	0,23	9,78E-01	8,39E-01	5,79E-01	1,02	1,08	1,17
3	SCO5796* ^C	SCLAV_4676		ATP/GTP-binding protein	0,63	1,26	0,10	8,41E-04	< 1E-06	6,15E-01	1,55	2,40	1,07
4	SCO4770*	SCLAV_3701	<i>guaB2</i>	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	0,98	1,61	1,18	1,64E-04	< 1E-06	1,38E-05	1,97	3,05	2,27
4	SCO4771	SCLAV_3702		Inositol-5-monophosphate dehydrogenase	0,18	0,01	0,10	7,27E-01	9,90E-01	7,98E-01	1,14	1,01	1,08
5	SCO1643	SCLAV_0860		20S proteasome alpha-subunit	0,19	0,68	-0,75	6,72E-01	1,82E-02	7,51E-03	1,14	1,60	0,59
5	SCO1644	SCLAV_0861	<i>prcB</i>	20S proteasome beta-subunit	-0,13	0,34	-0,99	7,16E-01	1,45E-01	8,68E-05	0,91	1,27	0,50

5	SCO1645	SCLAV_0862		Putative endonuclease VII	0,05	0,65	-1,10	9,23E-01	1,05E-02	9,13E-05	1,04	1,57	0,47
5	SCO1646	SCLAV_0863		DUF797 domain-containing protein	0,12	1,17	-1,10	7,63E-01	1,61E-05	3,15E-05	1,08	2,24	0,47
5	SCO1647	SCLAV_0864		Proteasome component	0,33	0,60	-0,55	4,00E-01	4,93E-02	6,08E-02	1,26	1,52	0,68
5	SCO1648*	SCLAV_0865		ATPase	0,28	0,44	-0,74	3,14E-01	4,61E-02	9,63E-04	1,21	1,35	0,60
5	SCO2617	SCLAV_1784	<i>clpX</i>	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpX	0,60	0,82	-0,06	1,18E-01	1,60E-02	8,90E-01	1,52	1,77	0,96
5	SCO2618	SCLAV_1785		ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	1,19	0,94	0,56	1,63E-03	7,33E-03	9,58E-02	2,28	1,92	1,47
5	SCO2619*	SCLAV_1786		ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	1,23	0,80	0,44	2,33E-03	3,02E-02	2,38E-01	2,35	1,74	1,36
5	SCO2635*	SCLAV_1809		Aminopeptidase N	0,81	-1,03	-0,04	1,73E-02	1,51E-03	9,35E-01	1,75	0,49	0,97
5	SCO2643*	SCLAV_1814a		Aminopeptidase N	-0,55	-0,60	0,60	6,75E-02	2,77E-02	2,25E-02	0,68	0,66	1,52
5	SCO3373* ^C	SCLAV_2385		Clp-family ATP-binding protease	0,38	0,67	-0,67	6,52E-02	6,46E-04	5,08E-04	1,30	1,59	0,63
5	SCO5285*	SCLAV_4136		ATP-dependent protease La	1,14	1,40	0,46	1,42E-02	1,64E-03	2,84E-01	2,20	2,64	1,38
6	SCO1425*	SCLAV_0663		AsnC-family transcriptional regulatory protein	-0,11	0,47	0,17	8,66E-01	1,98E-01	6,84E-01	0,92	1,39	1,12
6	SCO1618*	SCLAV_0838		ABC-type Fe ³⁺ -hydroxamate transport system, extracellular component	-0,46	0,07	-1,23	5,04E-01	9,37E-01	1,17E-02	0,73	1,05	0,43
6	SCO1619*	SCLAV_0839		Regulatory protein	0,04	0,22	-0,82	9,68E-01	6,04E-01	1,33E-02	1,02	1,17	0,57
6	SCO2539	SCLAV_1710	<i>era</i>	GTP-binding protein Era	0,11	0,51	0,77	8,18E-01	5,57E-02	3,68E-03	1,08	1,43	1,70
6	SCO2538	SCLAV_1714		Hypothetical protein	-0,17	-0,41	0,64	8,00E-01	3,41E-01	9,51E-02	0,89	0,75	1,55
6	SCO3207*	SCLAV_2340		TetR-family transcriptional regulator	1,45	1,01	0,76	9,10E-04	1,19E-02	4,86E-02	2,73	2,01	1,69

6	SCO5216* ^C	SCLAV_4082	<i>rpoE</i>	RNA polymerase sigma factor RpoE	1,98	2,60	1,18	< 1E-06	< 1E-06	4,57E-06	3,94	6,06	2,27
6	SCO5217* ^C	SCLAV_4083		Putative anti-sigma factor	1,70	2,03	0,62	< 1E-06	< 1E-06	1,65E-02	3,25	4,08	1,54
6	SCO5357*	SCLAV_4254	<i>rho</i>	Transcription termination factor Rho	0,04	0,04	-0,97	9,27E-01	9,13E-01	7,59E-05	1,03	1,03	0,51
6	SCO5552*	SCLAV_4500		IcIR-family transcriptional regulator	-0,76	-0,95	0,89	1,26E-01	2,86E-02	3,43E-02	0,59	0,52	1,86
6	SCO5820*	SCLAV_4698	<i>rpoD</i>	RNA polymerase sigma factor	0,38	0,96	-0,12	2,75E-01	1,12E-03	7,33E-01	1,30	1,95	0,92
6	SCO6775*	SCLAV_5246		TetR-family transcriptional regulator (SMC17)	0,81	1,09	1,49	1,56E-02	8,19E-04	2,86E-05	1,75	2,13	2,81
6	SCO7140*	SCLAV_p1403		DNA-binding protein	-5,49	-5,26	-4,43	< 1E-06	< 1E-06	< 1E-06	0,02	0,03	0,05
7	SCO2124*	SCLAV_1338		Hypothetical protein	0,09	0,58	-0,04	8,75E-01	5,99E-02	9,11E-01	1,06	1,50	0,97
7	SCO2154*	SCLAV_1370		Integral membrane protein	-0,14	0,12	1,57	8,77E-01	8,65E-01	9,75E-04	0,91	1,09	2,98
7	SCO2763*	SCLAV_1921		ABC transporter protein	2,39	2,57	0,93	< 1E-06	< 1E-06	1,42E-03	5,24	5,94	1,91
7	SCO3083* ^C	SCLAV_2205		Putative integral membrane protein	0,14	0,75	-0,23	8,42E-01	4,72E-02	5,93E-01	1,10	1,68	0,85
7	SCO3206*	SCLAV_2339		Transmembrane efflux protein	0,84	0,77	0,49	4,06E-02	3,90E-02	1,84E-01	1,79	1,71	1,40
7	SCO0973	SCLAV_p0893		Putative integral membrane protein	0,25	0,28	-0,83	8,45E-01	7,64E-01	2,00E-01	1,19	1,21	0,56
7	SCO2310*	SCLAV_p0941		Arabinose efflux permease family protein	0,08	0,33	0,06	8,84E-01	2,96E-01	8,75E-01	1,06	1,26	1,04
8	SCO1142*	SCLAV_0444		Putative oxidoreductase	0,23	1,33	0,38	6,62E-01	2,97E-04	2,76E-01	1,17	2,52	1,30
8	SCO2634* ^C	SCLAV_1808		DsbA oxidoreductase	2,17	2,38	1,49	< 1E-06	< 1E-06	5,70E-06	4,50	5,21	2,81
8	SCO2816* ^C	SCLAV_1975		LuxAB-like protein oxygenase	2,54	2,77	0,93	2,84E-05	7,93E-06	6,31E-02	5,82	6,82	1,91
8	SCO3296* ^C	SCLAV_2793		Putative luciferase-family oxidoreductase	0,18	0,11	0,85	7,92E-01	8,60E-01	2,53E-02	1,13	1,08	1,81

8	SCO3295 ^c	SCLAV_2794		Putative NAD P H-dependent FMN reductase	-0,16	-0,23	0,28	8,15E-01	6,31E-01	4,77E-01	0,90	0,85	1,22
8	SCO4833	SCLAV_3743		Transferase	-0,72	1,16	-1,92	6,81E-01	3,56E-01	7,87E-02	0,61	2,23	0,26
8	SCO4835*	SCLAV_3744		Alkylhydroperoxidase AhpD core	-0,11	-0,29	0,47	8,99E-01	5,74E-01	2,56E-01	0,93	0,82	1,39
8	SCO6551*	SCLAV_5103		Oxidoreductase	-0,06	-0,75	1,07	9,29E-01	2,08E-02	1,22E-03	0,96	0,59	2,10
8	SCO0882*	SCLAV_5455		Hypothetical protein	0,52	1,21	0,45	4,00E-01	1,06E-02	3,56E-01	1,43	2,31	1,37
8	SCO2849*	SCLAV_p0693		Bacterial luciferase domain-containing protein (SMCp8)	1,86	1,64	1,61	9,22E-04	1,95E-03	1,76E-03	3,63	3,12	3,05
9	SCO1936*	SCLAV_1134	<i>tal</i>	Transaldolase 2	0,70	1,00	1,57	8,66E-03	2,01E-04	1,01E-06	1,62	2,00	2,97
9	SCO1937	SCLAV_1135		Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	0,95	1,08	1,31	3,84E-04	6,34E-05	6,53E-06	1,93	2,11	2,48
9	SCO1938	SCLAV_1136	<i>opcA</i>	Oxppcycle protein	0,91	1,02	1,33	2,47E-04	4,74E-05	1,86E-06	1,88	2,03	2,51
9	SCO1939	SCLAV_1137	<i>pgl</i>	6-Phosphogluconolactonase	-0,06	0,24	0,37	9,68E-01	7,53E-01	5,34E-01	0,96	1,18	1,29
9	SCO5042*	SCLAV_3946		Fumarate hydratase	2,36	3,62	2,05	< 1E-06	< 1E-06	7,56E-07	5,13	12,30	4,14
10	SCO1958*	SCLAV_1159		UvrABC system protein A	0,10	0,22	-0,15	8,81E-01	5,86E-01	6,85E-01	1,07	1,17	0,90
10	SCO4797*	SCLAV_3721		Putative ATP-dependent DNA helicase	0,20	0,10	0,17	4,74E-01	7,26E-01	4,30E-01	1,15	1,07	1,13
10	SCO5188*	SCLAV_4052		ATP-dependent DNA helicase	0,28	0,04	-0,07	9,58E-02	8,48E-01	6,72E-01	1,21	1,03	0,95
10	SCO5754*	SCLAV_4643		Putative competence-damage inducible protein	0,38	0,40	0,40	2,66E-01	1,82E-01	1,47E-01	1,30	1,32	1,32
11	SCO4419*	SCLAV_0944		Pyridoxamine 5'-phosphate oxidase family protein	0,14	0,97	-1,11	7,48E-01	5,64E-04	1,26E-04	1,10	1,96	0,46
11	SCO1919	SCLAV_1116		DUF59 domain-containing protein	0,10	0,75	0,60	8,66E-01	2,02E-02	5,39E-02	1,08	1,68	1,52
11	SCO1920*	SCLAV_1117		SUF system FeS assembly protein	0,09	0,49	0,70	7,99E-01	2,01E-02	1,06E-03	1,07	1,40	1,63
11	SCO1996	SCLAV_1183		Dephospho-CoA kinase	1,89	2,46	0,85	1,74E-05	< 1E-06	2,75E-02	3,71	5,50	1,80

11	SCO1997* ^C	SCLAV_1184		ATP-grasp superfamily enzyme	3,00	3,59	1,34	< 1E-06	< 1E-06	6,86E-04	8,00	12,04	2,53
11	SCO2161* ^C	SCLAV_1377		Iron-sulfur cluster assembly accessory protein	1,11	1,46	0,45	1,53E-05	< 1E-06	3,08E-02	2,16	2,75	1,37
11	SCO2162*	SCLAV_1378		Quinolinate synthetase A	-1,19	-1,31	-0,51	3,36E-03	8,82E-04	1,68E-01	0,44	0,40	0,70
11	SCO2194*	SCLAV_1411	<i>lipA</i>	Lipoyl synthase	0,34	1,44	0,82	3,63E-01	2,35E-05	4,43E-03	1,27	2,71	1,77
11	SCO3403*	SCLAV_2412		GTP cyclohydrolase I	1,03	1,70	1,93	1,29E-03	2,99E-06	< 1E-06	2,04	3,25	3,81
11	SCO4418	SCLAV_3455	<i>pdxH</i>	Putative pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	-0,02	-0,70	0,25	9,93E-01	2,10E-01	6,89E-01	0,99	0,61	1,19
11	SCO5178*	SCLAV_4041		UBA/THIF-type NAD/FAD binding protein	1,08	0,90	1,60	5,46E-05	3,06E-04	< 1E-06	2,11	1,87	3,03
11	SCO6423*	SCLAV_5043		Putative lipoate-protein ligase	-0,04	0,53	0,84	9,60E-01	1,37E-01	1,33E-02	0,97	1,45	1,79
12	SCO1085*	SCLAV_0294		Putative acyltransferase	-0,45	-0,11	-0,24	3,12E-02	6,54E-01	2,19E-01	0,73	0,92	0,85
12	SCO3091*	SCLAV_2209		Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	0,13	0,00	0,21	7,61E-01	9,99E-01	4,48E-01	1,10	1,00	1,16
12	SCO6759*	SCLAV_5233	<i>hopE</i>	Phytoene synthase (SMC17)	1,17	0,36	1,18	4,39E-03	3,95E-01	1,87E-03	2,25	1,28	2,27
12	SCO6760	SCLAV_5234	<i>hopD</i>	Putative squalene/phytoene synthase (SMC17)	0,36	0,47	1,28	3,01E-01	9,65E-02	5,18E-05	1,28	1,39	2,43
12	SCO6762	SCLAV_5235	<i>hopC</i>	Squalene/phytoene dehydrogenase (SMC17)	0,21	0,49	0,02	5,85E-01	6,76E-02	9,47E-01	1,16	1,40	1,02
12	SCO6763	SCLAV_5236	<i>hopB</i>	Polyprenyl diphosphate synthase (SMC17)	0,11	-0,17	0,23	8,12E-01	6,16E-01	3,97E-01	1,08	0,89	1,18
12	SCO6764	SCLAV_5237	<i>hopA</i>	Squalene-hopene cyclase (SMC17)	0,17	0,30	-0,04	8,11E-01	5,41E-01	9,46E-01	1,13	1,23	0,97
12	SCO6766	SCLAV_5239		Radical SAM domain protein (SMC17)	0,78	0,73	1,05	7,35E-03	7,26E-03	2,66E-04	1,72	1,66	2,07
12	SCO6769	SCLAV_5240		Aminotransferase (SMC17)	0,18	0,15	0,05	7,37E-01	7,77E-01	9,06E-01	1,14	1,11	1,04

12	SCO6770	SCLAV_5241		Putative transcriptional regulator (SMC17)	-2,18	-1,10	-0,77	1,40E-05	8,97E-03	5,85E-02	0,22	0,47	0,59
13	SCO3162*	SCLAV_2296		Putative esterase (SMC7)	0,38	0,68	0,97	2,09E-01	7,56E-03	2,93E-04	1,30	1,60	1,96
13	SCO4561*	SCLAV_3563		NLP/P60-family protein	-0,36	-0,51	0,80	7,89E-01	6,04E-01	3,11E-01	0,78	0,70	1,74
14	SCO1426*	SCLAV_0664		Hypothetical protein	0,05	0,19	0,05	9,39E-01	5,71E-01	8,77E-01	1,03	1,14	1,04
14	SCO2642*	SCLAV_1813		DUF1203 domain-containing protein	0,44	-0,22	0,14	6,59E-01	8,21E-01	8,66E-01	1,35	0,86	1,10
14	SCO3187* ^c	SCLAV_2324		Regulatory protein, FmdB-family	-0,14	-0,25	0,61	6,83E-01	2,85E-01	4,29E-03	0,91	0,84	1,53
14	SCO3509*	SCLAV_2514		Transporter	0,51	0,38	0,17	2,91E-01	3,78E-01	7,04E-01	1,42	1,31	1,13
14	SCO4039*	SCLAV_3037		Hypothetical protein	-0,14	0,26	0,56	8,33E-01	5,35E-01	1,01E-01	0,91	1,20	1,47
14	SCO4203*	SCLAV_3212		Hypothetical protein	0,39	0,06	0,32	3,02E-01	9,10E-01	3,05E-01	1,31	1,04	1,25
14	SCO4966*	SCLAV_3863		Hypothetical protein	0,30	0,48	0,50	5,36E-01	1,91E-01	1,52E-01	1,23	1,40	1,41
14	SCO5163*	SCLAV_4021		Hypothetical protein	2,16	1,96	1,62	2,45E-06	7,86E-06	6,93E-05	4,47	3,89	3,07
14	SCO5284*	SCLAV_4135		Spermidine synthase-like protein	1,10	1,10	0,99	1,49E-02	8,90E-03	1,45E-02	2,14	2,14	1,99
14	SCO5545*	SCLAV_4496		Hypothetical protein	0,04	-0,29	1,15	9,27E-01	1,63E-01	3,34E-06	1,03	0,82	2,22
14	SCO5865	SCLAV_4785		Hypothetical protein	0,71	0,78	-0,46	1,49E-03	3,98E-04	2,06E-02	1,64	1,72	0,73
14	SCO5864*	SCLAV_4786		Hypothetical protein	0,59	0,93	-0,19	7,04E-02	2,15E-03	5,69E-01	1,51	1,91	0,88
14	SCO6776*	SCLAV_5248		Zn-dependent hydrolase (SMC17)	1,44	1,56	1,08	2,63E-04	8,20E-05	2,30E-03	2,71	2,95	2,11

Tabla 7.5. Genes con funciones diversas sobreexpresados o subexpresados en *S. clavuligerus* Δ clavR::aac en relación a *S. clavuligerus* ATCC 27064. Ver la leyenda de la tabla 7.2.

SCLAV ⁽²⁾	Producto ⁽³⁾	M _c			p BH			Cambio de expresión ⁽⁴⁾		
		22,5 h	46,5 h	60 h	22,5 h	46,5 h	60 h	22,5 h	46,5 h	60 h
Sobreexpresados										
SCLAV_0156	Hypothetical protein (in SMC4)	1,60	2,87	2,71	4,52E-02	2,64E-04	3,90E-04	3,03	7,32	6,56
SCLAV_0254	Putative acetyltransferase	4,07	1,51	2,19	8,61E-06	4,56E-02	3,56E-03	16,80	2,86	4,55
SCLAV_0526	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	1,63	4,46	3,03	2,50E-02	4,55E-07	5,64E-05	3,10	21,99	8,15
SCLAV_1182	Hypothetical protein	1,70	2,04	1,61	1,03E-05	8,09E-07	1,63E-05	3,24	4,11	3,05
SCLAV_1184	ATP-grasp superfamily enzyme	3,00	3,59	1,34	4,50E-08	5,72E-09	6,86E-04	7,98	12,02	2,54
SCLAV_1186	Putative dephospho-CoA kinase	1,17	2,13	1,17	1,01E-02	1,58E-05	4,88E-03	2,25	4,37	2,24
SCLAV_1187	Hypothetical protein	1,57	1,74	1,43	5,77E-04	5,80E-05	3,92E-04	2,97	3,35	2,70
SCLAV_1453	Alkaline d-peptidase	1,71	1,60	1,56	7,69E-03	1,21E-02	6,99E-03	3,27	3,04	2,95
SCLAV_1808	DsbA oxidoreductase	2,17	2,38	1,49	3,04E-08	1,28E-08	5,70E-06	4,51	5,21	2,80
SCLAV_1991	N-acetyl-glucosamine catabolism protein	1,01	1,22	1,45	2,60E-03	2,69E-04	3,83E-05	2,02	2,33	2,74
SCLAV_2412	GTP cyclohydrolase I	1,03	1,70	1,93	1,29E-03	2,99E-06	6,33E-07	2,04	3,24	3,82
SCLAV_2900	GCN5-related N-acetyltransferase	1,38	1,75	1,27	2,36E-05	9,45E-07	4,66E-05	2,60	3,35	2,42
SCLAV_2956	Hypothetical protein	1,51	1,80	1,36	6,38E-03	8,38E-04	6,51E-03	2,85	3,48	2,57
SCLAV_3213	Glycosyltransferase	2,79	2,72	1,11	3,28E-10	3,95E-10	3,98E-05	6,89	6,57	2,15
SCLAV_3214	DUF2596 domain-containing protein	1,53	1,40	1,42	3,75E-05	8,39E-05	6,56E-05	2,89	2,64	2,68
SCLAV_3281	Putative permease of the major facilitator superfamily	2,73	2,81	1,50	1,33E-07	9,58E-08	2,05E-04	6,65	7,04	2,83
SCLAV_3946	Fumarate hydratase	2,36	3,62	2,05	8,54E-08	3,85E-10	7,56E-07	5,13	12,29	4,13
SCLAV_4021	Hypothetical protein	2,16	1,96	1,62	2,45E-06	7,86E-06	6,93E-05	4,46	3,88	3,07
SCLAV_4151	Hypothetical protein	1,30	3,09	1,31	7,78E-04	1,31E-08	3,80E-04	2,45	8,50	2,48
SCLAV_4287	NAD-dependent epimerase/dehydratase	1,07	1,46	1,31	3,56E-02	2,30E-03	4,35E-03	2,10	2,76	2,49
SCLAV_4768	3'-hydroxymethylcephem-O-carbamoyltransferase	1,12	2,51	1,35	3,81E-02	1,49E-05	5,53E-03	2,17	5,69	2,54
SCLAV_4869	Oxidoreductase	1,13	2,57	1,14	6,63E-05	1,24E-09	4,42E-05	2,19	5,96	2,20
SCLAV_4922	Ribosome-associated GTPase	1,20	2,53	1,28	5,71E-04	4,08E-08	1,71E-04	2,30	5,77	2,43

SCLAV_5145	Potassium-transporting ATPase subunit B (in SMC16)	1,94	2,21	1,98	1,30E-09	2,94E-10	1,62E-09	3,85	4,64	3,94
SCLAV_5146	Potassium-transporting ATPase C chain (in SMC16)	2,99	2,69	2,58	3,93E-09	2,02E-08	4,27E-08	7,93	6,43	5,99
SCLAV_5150	TrkA-C domain-containing protein	1,18	1,08	1,40	2,89E-05	6,59E-05	3,11E-06	2,27	2,11	2,63
SCLAV_5161	Hypothetical protein	1,86	1,17	1,03	1,49E-05	1,72E-03	3,79E-03	3,62	2,25	2,04
SCLAV_5162	NocE-like protein	1,37	1,26	2,33	1,98E-02	1,91E-02	9,08E-05	2,58	2,40	5,03
SCLAV_5163	Hypothetical protein	1,18	1,78	1,20	8,26E-05	3,62E-07	4,86E-05	2,27	3,43	2,30
SCLAV_5198	Copper oxidase	1,36	2,91	3,81	1,28E-04	6,08E-09	2,59E-10	2,56	7,52	14,00
SCLAV_5199	Putative hydroxylase	1,15	2,87	3,77	6,01E-04	5,43E-09	2,29E-10	2,22	7,30	13,66
SCLAV_5222	Hypothetical protein	1,80	2,14	1,16	8,85E-05	8,10E-06	3,47E-03	3,47	4,42	2,24
SCLAV_5248	Zn-dependent hydrolase (in SMC17)	1,44	1,56	1,08	2,63E-04	8,20E-05	2,30E-03	2,72	2,94	2,11
SCLAV_5256	Putative ABC transporter permease protein	1,33	1,43	1,05	5,92E-03	1,91E-03	1,54E-02	2,52	2,70	2,07
SCLAV_5350	Acyltransferase 3	1,03	1,80	1,27	1,34E-05	8,77E-09	9,06E-07	2,05	3,49	2,41
SCLAV_5511	Hypothetical protein	1,23	1,62	1,38	2,69E-02	2,12E-03	6,19E-03	2,35	3,08	2,60
SCLAV_5534	Selenocysteine lyase	1,26	1,22	2,62	3,76E-02	2,70E-02	1,39E-05	2,40	2,34	6,16
SCLAV_5547	YD repeat protein	1,02	1,66	1,19	1,01E-02	5,78E-05	1,31E-03	2,03	3,17	2,29
SCLAV_5583	Putative oxidoreductase	1,45	1,98	1,20	1,95E-02	9,78E-04	2,95E-02	2,73	3,93	2,29
SCLAV_5617	Putative dehydrogenase (in SMC21)	1,13	1,40	1,28	1,28E-02	1,26E-03	2,54E-03	2,18	2,65	2,43
SCLAV_5688	Hypothetical protein	1,59	1,43	1,14	4,15E-05	1,10E-04	8,55E-04	3,01	2,69	2,21
SCLAV_5714	Cysteine desulfurase	1,41	1,51	1,22	2,01E-02	7,02E-03	2,25E-02	2,65	2,85	2,34
SCLAV_p0020	Hypothetical protein	1,37	1,33	1,25	1,89E-02	1,31E-02	1,60E-02	2,59	2,52	2,38
SCLAV_p0560	Multimeric flavodoxin WrbA	3,41	2,97	1,37	3,87E-08	2,84E-07	1,61E-03	10,63	7,85	2,59
SCLAV_p0693	Bacterial luciferase domain-containing protein (in SMCp8)	1,86	1,64	1,61	9,22E-04	1,95E-03	1,76E-03	3,62	3,11	3,06
SCLAV_p0703	Carbonic anhydrase (in SMCp8)	1,28	1,17	1,78	2,86E-02	2,89E-02	1,18E-03	2,44	2,26	3,43
SCLAV_p0842	NADPH-dependent FMN reductase	3,16	3,15	1,19	3,78E-07	3,91E-07	9,18E-03	8,91	8,85	2,28
SCLAV_p1123	Putative methyltransferase (in SMCp14)	4,57	6,13	6,07	7,30E-07	1,60E-08	2,40E-08	23,83	70,03	66,95
Subexpresados										
SCLAV_3892	DUF946 domain-containing protein	-2,09	-4,38	-2,63	1,23E-03	1,10E-07	6,82E-05	0,23	0,05	0,16
SCLAV_4359	Neutral zinc metalloprotease	-1,72	-1,36	-1,48	3,53E-03	1,25E-02	5,65E-03	0,30	0,39	0,36
SCLAV_4875	Hypothetical protein	-1,10	-1,36	-1,33	2,82E-03	2,38E-04	2,49E-04	0,47	0,39	0,40

SCLAV_4953	AmfT protein	-5,99	-6,68	-4,86	1,63E-08	7,31E-09	5,32E-07	0,02	0,01	0,03
SCLAV_4954	Membrane translocator, AmfB	-1,98	-2,57	-1,69	2,10E-03	9,78E-05	4,03E-03	0,25	0,17	0,31
SCLAV_4955	Membrane translocator, AmfA	-2,45	-2,85	-1,15	3,01E-05	3,68E-06	1,74E-02	0,18	0,14	0,45
SCLAV_4957	Hypothetical protein	-3,73	-4,69	-4,31	3,93E-08	2,62E-09	2,59E-08	0,08	0,04	0,05
SCLAV_4964	Probable short-chain dehydrogenase	-1,15	-1,70	-1,65	5,41E-05	2,80E-07	5,34E-07	0,45	0,31	0,32
SCLAV_4968	CbbY/CbbZ/GpH/YieH-family hydrolase	-5,41	-6,39	-5,60	1,83E-11	2,59E-12	2,44E-11	0,02	0,01	0,02
SCLAV_4971	ATPase associated with various cellular activities	-6,25	-6,27	-5,55	7,49E-12	6,19E-12	4,20E-11	0,01	0,01	0,02
SCLAV_4973	Hypothetical protein	-3,15	-3,14	-2,12	4,13E-12	2,59E-12	1,92E-10	0,11	0,11	0,23
SCLAV_5117	3-Oxoacyl synthase	-1,32	-1,33	-1,27	1,37E-02	7,53E-03	8,71E-03	0,40	0,40	0,42
SCLAV_5138	Hypothetical protein	-1,38	-2,00	-1,60	7,33E-04	7,32E-06	9,23E-05	0,39	0,25	0,33
SCLAV_p0152	Competence protein ComEC	-1,60	-1,87	-1,62	2,15E-03	2,47E-04	8,09E-04	0,33	0,27	0,33
SCLAV_p1192	Peptidoglycan-binding LysM (in SMCp15)	-2,01	-3,68	-2,97	4,11E-03	3,56E-06	4,60E-05	0,25	0,08	0,13
SCLAV_p1196	Secreted protein	-2,46	-4,70	-3,52	9,78E-04	2,79E-07	1,21E-05	0,18	0,04	0,09
SCLAV_p1197	Phage tail protein	-2,43	-3,93	-3,22	4,78E-03	2,06E-05	1,74E-04	0,19	0,07	0,11
SCLAV_p1198	Tail sheath protein	-2,78	-5,20	-3,76	2,12E-03	1,03E-06	5,69E-05	0,15	0,03	0,07
SCLAV_p1200	Hydrolytic protein	-2,85	-5,19	-3,72	1,07E-03	6,12E-07	3,98E-05	0,14	0,03	0,08
SCLAV_p1328	SAM-dependent O-methyltransferase	-2,81	-2,63	-3,42	1,11E-08	3,79E-08	1,62E-09	0,14	0,16	0,09
SCLAV_p1329	Peptidase S1 and S6, chymotrypsin/Hap	-5,41	-6,13	-6,48	7,86E-11	1,45E-11	2,18E-11	0,02	0,01	0,01
SCLAV_p1330	Oxidoreductase ucpA	-4,86	-5,25	-5,29	1,02E-09	4,13E-10	5,86E-10	0,03	0,03	0,03
SCLAV_p1342	Hypothetical protein	-3,90	-4,47	-3,91	6,44E-08	1,40E-08	9,92E-08	0,07	0,05	0,07
SCLAV_p1350	Enediynes Polyketide synthase (in SMCp21)	-1,01	-1,19	-1,08	1,31E-03	1,61E-04	3,63E-04	0,50	0,44	0,47
SCLAV_p1352	Flavin reductase domain protein (in SMCp21)	-2,51	-2,40	-2,99	3,64E-09	6,20E-09	5,05E-10	0,18	0,19	0,13
SCLAV_p1355	Hypothetical protein (in SMCp21)	-6,24	-5,71	-5,27	3,20E-09	1,34E-08	4,59E-08	0,01	0,02	0,03
SCLAV_p1364	Subtilisin-like serine protease (in SMCp21)	-1,14	-1,05	-1,10	1,50E-02	1,44E-02	8,66E-03	0,45	0,48	0,46
SCLAV_p1365	Glycosyl transferase (in SMCp21)	-1,21	-1,09	-1,70	3,41E-03	5,95E-03	6,29E-05	0,43	0,47	0,31
SCLAV_p1366	Sugar 4-aminotransferase (in SMCp21)	-1,47	-1,29	-1,40	3,92E-03	6,37E-03	2,74E-03	0,36	0,41	0,38
SCLAV_p1370	Acyl-CoA dehydrogenase (in SMCp21)	-5,00	-4,98	-3,80	1,18E-06	1,19E-06	3,47E-05	0,03	0,03	0,07
SCLAV_p1378	Dyp-type peroxidase family protein	-3,42	-3,36	-2,10	4,49E-08	6,65E-08	2,93E-05	0,09	0,10	0,23
SCLAV_p1379	Plastocyanin	-6,15	-6,33	-4,73	7,49E-12	4,40E-12	1,92E-10	0,01	0,01	0,04
SCLAV_p1381	Cna B domain-containing protein	-7,44	-7,82	-7,59	4,13E-12	2,59E-12	9,60E-12	0,01	0,00	0,01
SCLAV_p1382	Putative peptidase inhibitor	-3,03	-3,95	-3,84	3,80E-07	1,72E-08	2,37E-08	0,12	0,06	0,07
SCLAV_p1383	YVTN-family beta-propeller repeat protein	-4,90	-5,07	-3,49	7,70E-08	5,69E-08	7,61E-06	0,03	0,03	0,09

SCLAV_p1385	Hypothetical protein	-1,96	-1,86	-1,14	1,79E-03	1,80E-03	4,04E-02	0,26	0,28	0,45
SCLAV_p1388	Putative secreted metalloprotease	-5,43	-5,93	-6,17	3,24E-09	1,24E-09	9,87E-10	0,02	0,02	0,01
SCLAV_p1389	Putative secreted protein	-5,89	-6,60	-7,20	5,17E-11	8,84E-12	9,60E-12	0,02	0,01	0,01
SCLAV_p1402	Actinohivin	-2,33	-2,91	-3,45	2,95E-03	2,11E-04	3,02E-05	0,20	0,13	0,09
SCLAV_p1403	DNA-binding protein	-5,49	-5,26	-4,43	4,26E-11	4,29E-11	5,05E-10	0,02	0,03	0,05
SCLAV_p1404	Multicopper oxidase, type 2	-2,57	-2,83	-2,55	2,22E-07	7,06E-08	3,31E-07	0,17	0,14	0,17
SCLAV_p1417	Hypothetical protein	-3,94	-4,31	-5,75	5,46E-07	1,66E-07	5,09E-09	0,07	0,05	0,02
SCLAV_p1420	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR	-3,41	-3,35	-3,59	4,47E-07	5,65E-07	2,93E-07	0,09	0,10	0,08
SCLAV_p1421	Hypothetical protein	-3,29	-3,68	-4,52	3,51E-09	1,02E-09	1,60E-10	0,10	0,08	0,04
SCLAV_p1424	Hypothetical protein	-2,04	-2,36	-2,24	5,62E-04	8,00E-05	1,29E-04	0,24	0,19	0,21
SCLAV_p1425	Hypothetical protein	-6,06	-6,16	-5,92	9,66E-09	1,11E-08	2,30E-08	0,02	0,01	0,02
SCLAV_p1428	Prenyltransferase/squalene oxidase (in SMCp23)	-4,08	-4,17	-3,35	1,75E-07	1,40E-07	2,85E-06	0,06	0,06	0,10
SCLAV_p1431	Putative surface layer protein (in SMCp23)	-6,92	-8,24	-7,19	1,09E-09	1,60E-10	9,87E-10	0,01	0,00	0,01
SCLAV_p1434	Hypothetical protein	-5,19	-5,28	-4,84	9,51E-09	1,10E-08	3,97E-08	0,03	0,03	0,03
SCLAV_p1442	Hypothetical protein	-2,95	-4,28	-4,42	5,55E-05	3,75E-07	3,21E-07	0,13	0,05	0,05
SCLAV_p1443	Integrin_alpha2 domain-containing protein	-5,90	-6,30	-4,18	2,09E-10	7,39E-11	1,82E-08	0,02	0,01	0,06
SCLAV_p1445	Calcium binding protein	-4,73	-5,44	-3,07	1,40E-08	3,13E-09	5,30E-06	0,04	0,02	0,12
SCLAV_p1448	Methyltransferase family protein	-5,26	-4,41	-2,11	7,79E-11	3,33E-10	4,97E-06	0,03	0,05	0,23
SCLAV_p1449	Hypothetical protein	-5,86	-6,38	-5,82	1,73E-11	4,40E-12	2,63E-11	0,02	0,01	0,02
SCLAV_p1451	Cytochrome P450	-4,12	-4,91	-5,36	1,79E-09	2,38E-10	1,60E-10	0,06	0,03	0,02
SCLAV_p1453	Trypsin	-4,07	-5,49	-4,77	1,43E-05	2,46E-07	1,78E-06	0,06	0,02	0,04
SCLAV_p1455	Hypothetical protein	-3,66	-3,41	-3,50	1,12E-07	3,11E-07	2,92E-07	0,08	0,09	0,09
SCLAV_p1459	Mg2+ transporter-C	-3,51	-3,61	-6,29	2,70E-04	1,04E-04	1,25E-07	0,09	0,08	0,01
SCLAV_p1469	Lipoprotein	-6,35	-5,35	-3,97	6,21E-10	6,20E-09	3,69E-07	0,01	0,02	0,06
SCLAV_p1484	Oxidoreductase	-2,54	-3,01	-2,26	5,14E-05	5,02E-06	1,36E-04	0,17	0,12	0,21
SCLAV_p1485	ATP-dependent RNA helicase	-4,07	-4,13	-4,31	2,17E-10	1,60E-10	1,60E-10	0,06	0,06	0,05
SCLAV_p1491	Hypothetical protein	-2,34	-2,22	-2,82	1,38E-05	2,15E-05	1,19E-06	0,20	0,21	0,14
SCLAV_p1493	Hypothetical protein	-1,74	-1,65	-1,96	1,09E-03	1,17E-03	1,89E-04	0,30	0,32	0,26
SCLAV_p1497	Inhibitor_I36 domain-containing protein	-3,28	-3,28	-3,01	3,08E-09	3,98E-09	1,59E-08	0,10	0,10	0,12
SCLAV_p1504	Putative membrane protein	-1,04	-1,37	-1,30	1,79E-02	1,14E-03	1,41E-03	0,49	0,39	0,41
SCLAV_p1505	Hypothetical protein	-1,17	-1,10	-1,30	4,83E-03	4,69E-03	9,20E-04	0,45	0,47	0,41
SCLAV_p1506	WD40 domain-containing protein	-3,50	-4,20	-3,23	3,08E-07	3,02E-08	1,08E-06	0,09	0,05	0,11

SCLAV_p1511	Putative integron gene cassette protein	-4,39	-4,91	-5,32	1,71E-09	4,61E-10	2,59E-10	0,05	0,03	0,03
SCLAV_p1515	NAD-dependent epimerase/dehydratase	-5,51	-5,46	-5,24	3,43E-09	5,10E-09	1,06E-08	0,02	0,02	0,03
SCLAV_p1520	Zinc finger CDGSH-type domain protein	-1,33	-1,16	-1,39	1,85E-03	3,71E-03	6,26E-04	0,40	0,45	0,38
SCLAV_p1521	Hypothetical protein	-1,63	-1,62	-1,48	6,58E-03	4,06E-03	6,30E-03	0,32	0,33	0,36
SCLAV_p1526	Hypothetical protein	-4,56	-4,06	-3,68	3,80E-10	1,48E-09	7,33E-09	0,04	0,06	0,08
SCLAV_p1527	Secreted protein	-3,51	-3,20	-3,34	2,95E-08	1,17E-07	9,52E-08	0,09	0,11	0,10
SCLAV_p1528	DUF574 domain-containing protein	-3,87	-4,07	-4,74	5,37E-08	3,44E-08	6,00E-09	0,07	0,06	0,04
SCLAV_p1539	Folypolyglutamate synthetase	-2,24	-4,20	-4,56	1,17E-03	4,69E-07	2,09E-07	0,21	0,05	0,04
SCLAV_p1556	Adenosylcobinamide amidohydrolase, putative	-5,29	-4,93	-3,04	1,76E-08	5,69E-08	2,80E-05	0,03	0,03	0,12
SCLAV_p1558	Beta-xylosidase	-2,97	-3,97	-4,40	5,36E-04	1,42E-05	4,10E-06	0,13	0,06	0,05
SCLAV_p1563	Hypothetical protein	-1,47	-1,68	-1,53	2,20E-02	5,17E-03	8,09E-03	0,36	0,31	0,35
SCLAV_p1565	Hypothetical protein	-1,72	-1,89	-1,92	7,44E-04	1,90E-04	1,45E-04	0,30	0,27	0,26
SCLAV_p1566	Phenolic acid decarboxylase	-4,82	-4,69	-4,41	6,00E-08	9,78E-08	3,00E-07	0,04	0,04	0,05
SCLAV_p1580	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR	-3,28	-2,92	-2,19	4,44E-06	1,70E-05	3,57E-04	0,10	0,13	0,22
SCLAV_p1582	Putative DNA-binding protein	-2,40	-2,22	-2,47	1,18E-06	3,21E-06	9,19E-07	0,19	0,21	0,18
SCLAV_p1585	Hypothetical protein	-2,11	-2,29	-2,06	4,78E-04	1,10E-04	2,81E-04	0,23	0,20	0,24
SCLAV_p1586	Oxidoreductase	-3,25	-3,51	-4,07	2,77E-08	1,34E-08	2,49E-09	0,11	0,09	0,06
SCLAV_p1588	Reductase	-2,79	-3,00	-2,82	1,24E-05	4,30E-06	9,27E-06	0,14	0,13	0,14
SCLAV_pnr026	nocoRNAC: SIDD_value 0.4, Term_Confidence 86	-4,67	-3,66	-3,43	6,25E-06	9,90E-05	1,75E-04	0,04	0,08	0,09
SCLAV_pnr029	nocoRNAC: SIDD_value 2.3, Term_Confidence 75	-2,74	-2,55	-2,54	9,73E-06	2,03E-05	2,02E-05	0,15	0,17	0,17

Tabla 7.6. Datos de expresión obtenidos a las 46,5 horas de cultivo en medio SA para cada gen analizado en los experimentos de micromatrices (M_c) y de RT-qPCR ($\log_2 2^{-\Delta\Delta Ct}$) en la comparación de *S. clavuligerus* $\Delta claR::aac$ respecto a *S. clavuligerus* ATCC 27064. En la columna de producto codificado se indica la agrupación de metabolitos secundarios a la que pertenece el gen.

Gen	Producto	M_c	$\log_2 2^{-\Delta\Delta Ct}$
SCLAV_3946	Fumarate hydratase	3,62	4,09
SCLAV_4183	OppA2, oligopeptide permease (in SMC10)	-6,37	-8,08
SCLAV_4199	PcbC, isopenicillin N synthetase (in SMC11)	-0,04	0,11
SCLAV_4764	Oxidoreductase	2,03	1,83
SCLAV_4956	AmfR, transcriptional regulator	-5,93	-18,68
SCLAV_5146	Potassium-transporting ATPase, C chain (in SMC16)	2,69	3,93
SCLAV_5267	HlmA, acetyltransferase (in SMC18)	5,68	5,96
SCLAV_5275	HlmI, thioredoxin disulfide reductase (in SMC18)	9,16	9,77
SCLAV_5384	GntR-family transcriptional regulator	1,11	1,34
SCLAV_5409	ArsR-family transcriptional regulator	1,48	1,47
SCLAV_5692	LysR-family transcriptional regulator	1,33	0,74
SCLAV_p0566	3-Oxoacyl-ACP synthase (in SMCp6)	1,75	4,21
SCLAV_p1006	Putative thioredoxin (in SMCp11)	-3,47	-5,77
SCLAV_p1122	StaR, staurosporine transcriptional activator (in SMC14)	2,95	6,08
SCLAV_p1581	BadM/Rrf2-family transcriptional regulator	-4,26	-13,40

Tabla 7.7. Agrupaciones génicas de metabolitos secundarios cuya expresión se ve modificada en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ en relación a *S. clavuligerus* ATCC 27064. Se muestran los valores de expresión génica relativa, M_c ; de probabilidad corregida por Benjamini-Hochberg, p BH; y el de cambio de expresión, en los tres tiempos de cultivo analizados. Un gen estadísticamente significativo ha de cumplir valores de $M_c \leq -1$ o $M_c \geq 1$ y de p BH $\leq 0,05$. (1) Nombre de los genes de la agrupación génica. (2) Código SCLAV del gen según la base de datos StrepDB. (3) Proteína codificada. (4) El cambio de expresión se indica en veces respecto a la cepa control, tomando esta última como valor 1,0.

Gen ⁽¹⁾	SCLAV ⁽²⁾	Producto ⁽³⁾	M_c			p BH			Cambio de expresión ⁽⁴⁾		
			22,5 h	46,5 h	60 h	22,5 h	46,5 h	60 h	22,5 h	46,5 h	60 h
Agrupación SMC1											
	SCLAV_0001	Hypothetical protein	-3,71	-3,46	-3,26	1,08E-05	8,28E-06	1,05E-05	0,08	0,09	0,10
	SCLAV_0002	Secreted protein	-2,27	-1,18	-0,60	1,18E-06	2,70E-04	4,27E-02	0,21	0,44	0,66
	SCLAV_0003	Hypothetical protein	-3,35	-1,98	-3,47	6,29E-05	7,35E-03	2,01E-05	0,10	0,25	0,09
	SCLAV_0004	Hypothetical protein	-3,77	-3,14	-1,08	1,12E-04	5,92E-04	2,20E-01	0,07	0,11	0,47
	SCLAV_0005	Hypothetical protein	-0,26	0,43	0,04	6,01E-01	2,74E-01	9,34E-01	0,84	1,35	1,03
	SCLAV_0006	O-methyltransferase, putative	-1,70	-1,83	-2,04	2,60E-05	7,27E-06	1,18E-06	0,31	0,28	0,24
	SCLAV_0007	Methoxymalonate biosynthesis protein	-1,54	-1,41	-0,51	1,04E-02	1,47E-02	4,09E-01	0,34	0,38	0,70
	SCLAV_0008	Methoxymalonate biosynthesis acyl-CoA dehydrogenase	-1,95	-2,06	-1,75	1,43E-03	6,31E-04	2,28E-03	0,26	0,24	0,30
	SCLAV_0009	Methoxymalonate biosynthesis D-alanyl carrier protein	-1,11	-1,23	-0,68	5,90E-03	1,99E-03	7,05E-02	0,46	0,43	0,62
	SCLAV_0010	Methoxymalonate biosynthesis 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	-2,35	-2,19	-1,78	1,02E-04	1,65E-04	1,03E-03	0,20	0,22	0,29
	SCLAV_0011	Modular polyketide synthase	-2,00	-2,33	-1,50	1,04E-04	1,32E-05	1,16E-03	0,25	0,20	0,35
	SCLAV_0012	Modular polyketide synthase	3,47	3,45	3,93	1,41E-06	1,18E-06	1,57E-08	11,09	10,90	15,22
	SCLAV_0013	Modular polyketide synthase	5,14	5,08	5,90	6,75E-12	8,57E-12	1,42E-13	35,15	33,87	59,56
	SCLAV_0014	Modular polyketide synthase	5,47	5,58	5,89	4,29E-14	2,67E-14	7,42E-15	44,17	47,73	59,31

	SCLAV_0015	Modular polyketide synthase	4,35	3,64	3,57	3,51E-11	3,06E-09	4,18E-10	20,45	12,51	11,89
	SCLAV_0016	Arylcarboxylate reductase component	-0,22	-1,00	-1,83	7,02E-01	1,68E-02	4,99E-05	0,86	0,50	0,28
	SCLAV_0017	Putative malonyl transferase	-0,58	-0,68	-0,13	4,31E-01	2,79E-01	8,74E-01	0,67	0,62	0,91
	SCLAV_0018	Cytochrome P450	-1,38	-2,13	-3,70	6,27E-03	6,58E-05	3,68E-08	0,38	0,23	0,08
	SCLAV_0019	Putative membrane protein	0,07	0,24	0,67	9,11E-01	5,50E-01	5,83E-02	1,05	1,18	1,59
	SCLAV_0020	Predicted membrane protein	-0,15	0,00	0,03	8,14E-01	9,96E-01	9,58E-01	0,90	1,00	1,02
	SCLAV_0021	Hypothetical protein	-0,07	0,07	0,80	9,36E-01	9,06E-01	1,03E-01	0,95	1,05	1,75
	SCLAV_0022	Putative acetyltransferase	-0,49	-0,54	0,73	3,43E-01	2,39E-01	9,32E-02	0,71	0,69	1,66
	SCLAV_0023	Hypothetical protein	-0,88	-1,08	-1,15	1,50E-02	2,31E-03	9,83E-04	0,54	0,47	0,45
	SCLAV_0024	Rieske 2Fe-2S domain-containing protein	0,40	0,53	-0,15	5,74E-01	3,75E-01	8,37E-01	1,32	1,44	0,90
	SCLAV_0025	Putative transmembrane anti-sigma factor	0,30	0,66	-0,75	7,73E-01	3,74E-01	2,99E-01	1,23	1,58	0,60
	SCLAV_0026	Secreted protein	-0,06	-0,12	-0,45	8,92E-01	6,88E-01	8,09E-02	0,96	0,92	0,73
Agrupación SMC2											
	SCLAV_0082	Putative TetR-family transcriptional regulator	0,94	0,90	1,25	7,87E-04	9,03E-04	1,66E-05	1,92	1,87	2,38
	SCLAV_0083	Methyltransferase	-0,46	-0,78	-0,94	2,60E-01	2,99E-02	7,51E-03	0,73	0,58	0,52
	SCLAV_0084	Hypothetical protein	0,07	-0,42	0,36	8,85E-01	1,59E-01	2,21E-01	1,05	0,75	1,29
	SCLAV_0085	HTH domain DNA-binding protein	1,02	0,71	0,76	3,42E-03	3,16E-02	1,84E-02	2,03	1,63	1,69
	SCLAV_0086	Putative acetyltransferase	0,75	0,89	0,94	1,19E-03	1,44E-04	5,49E-05	1,68	1,85	1,92
	SCLAV_0087	Aminoglycoside phosphotransferase family protein	0,62	1,35	0,80	1,94E-01	2,14E-03	5,50E-02	1,53	2,56	1,74
	SCLAV_0088	Predicted nucleoside-diphosphate sugar epimerase	0,84	1,07	0,15	6,29E-02	1,25E-02	7,83E-01	1,79	2,10	1,11
	SCLAV_0089	1,4-Dihydroxy-2-naphtoate octaprenyl transferase	-1,87	-2,51	-1,60	8,02E-04	2,23E-05	1,97E-03	0,27	0,18	0,33
	SCLAV_0090	Carbonic anhydrase carbonate dehydratase	1,89	1,68	0,92	4,82E-04	1,12E-03	5,82E-02	3,70	3,21	1,89

	SCLAV_0091	Cytochrome P450	-1,87	-2,12	-3,40	8,19E-05	1,40E-05	1,61E-08	0,27	0,23	0,09
	SCLAV_0092	Hypothetical protein	-0,44	-0,77	-1,14	4,08E-01	8,17E-02	8,32E-03	0,74	0,59	0,45
	SCLAV_0093	Secreted serine protease	-2,52	-0,59	-1,15	1,68E-03	4,76E-01	1,22E-01	0,17	0,67	0,45
	SCLAV_0094	Putative oxidoreductase	-0,85	-0,77	-0,67	1,11E-02	1,68E-02	3,12E-02	0,55	0,59	0,63
	SCLAV_0095	Hypothetical protein	-0,62	0,43	1,03	2,08E-01	3,64E-01	1,72E-02	0,65	1,35	2,04
	SCLAV_0096	Palmitoyl-CoA hydrolase	1,00	1,31	0,82	2,31E-02	2,50E-03	4,60E-02	2,00	2,48	1,77
	SCLAV_0097	Putative dehydrogenase	0,45	0,58	0,80	1,95E-01	6,65E-02	9,58E-03	1,37	1,49	1,74
	SCLAV_0098	Cytosine/adenosine deaminase	0,24	0,17	-0,12	4,62E-01	5,80E-01	7,14E-01	1,18	1,12	0,92
	SCLAV_0099	NADPH-dependent FMN reductase	-0,01	0,00	0,40	9,69E-01	9,96E-01	5,51E-02	0,99	1,00	1,32
	SCLAV_0100	Hypothetical protein	1,98	2,42	1,31	8,65E-05	6,65E-06	3,02E-03	3,94	5,36	2,48
	SCLAV_0101	Putative phosphoesterase	0,59	-0,02	-0,37	3,16E-02	9,54E-01	1,62E-01	1,50	0,99	0,78
	SCLAV_0102	Phosphopantetheinyl transferase	-0,26	-0,85	-0,87	5,19E-01	7,29E-03	4,76E-03	0,84	0,55	0,55
	SCLAV_0103	Hypothetical protein	-0,10	0,44	-0,24	9,36E-01	6,01E-01	8,08E-01	0,93	1,36	0,85
	SCLAV_0104	Putative acetyltransferase	0,57	1,46	0,63	3,10E-01	3,23E-03	2,01E-01	1,48	2,75	1,55
	SCLAV_0105	Dual specificity protein phosphatase	-0,22	0,32	-0,72	7,48E-01	5,38E-01	1,17E-01	0,86	1,25	0,61
Agrupación SMC3											
	SCLAV_0148	Acetyltransferase	1,30	0,75	1,56	5,33E-04	2,91E-02	3,74E-05	2,47	1,69	2,95
	SCLAV_0149	Glyoxalase/bleomycin resistance protein/dioxygenase	-1,04	-0,99	-0,13	4,84E-03	5,36E-03	7,69E-01	0,49	0,50	0,91
	SCLAV_0150	Siderophore-interacting protein	-0,57	-1,28	0,81	5,42E-01	7,86E-02	2,85E-01	0,67	0,41	1,75
	SCLAV_0151	Antibiotic binding protein, penicillin acylase	-0,36	-0,80	0,13	5,32E-01	8,21E-02	8,32E-01	0,78	0,58	1,09
	SCLAV_0152	Acetyltransferase, penicillin amidase	-0,83	-1,72	-0,06	3,46E-01	2,26E-02	9,55E-01	0,56	0,30	0,96
Agrupación SMC4											
	SCLAV_0153	Putative magnesium or manganese-dependent protein phosphatase	-0,74	-1,33	-1,80	1,38E-01	4,45E-03	1,92E-04	0,60	0,40	0,29
	SCLAV_0154	Regulatory protein	1,98	2,26	1,38	4,31E-03	1,02E-03	3,10E-02	3,96	4,78	2,61

	SCLAV_0155	Putative phosphotransferase	2,10	1,97	0,89	1,66E-03	2,18E-03	1,54E-01	4,29	3,93	1,86
	SCLAV_0156	Hypothetical protein	0,65	0,69	-0,04	4,36E-01	3,39E-01	9,70E-01	1,57	1,62	0,97
	SCLAV_0157	Hypothetical protein	2,03	2,03	1,24	3,26E-04	2,41E-04	1,39E-02	4,10	4,09	2,36
	SCLAV_0158	Putative amidase	-0,81	-1,09	-1,66	2,32E-02	1,90E-03	2,34E-05	0,57	0,47	0,32
	SCLAV_0159	Germacradienol/germacrene D synthase	0,02	-1,61	-0,34	9,84E-01	4,57E-03	6,01E-01	1,01	0,33	0,79
	SCLAV_0160	Hypothetical protein	1,14	1,04	1,60	9,03E-03	1,27E-02	2,23E-04	2,20	2,06	3,04
	SCLAV_0161	Acetyl-CoA acetyltransferase	0,17	0,25	-0,28	8,24E-01	6,60E-01	6,36E-01	1,13	1,19	0,82
	SCLAV_0162	Lipid-transfer protein	-0,42	-0,54	-0,71	1,94E-01	5,94E-02	1,14E-02	0,75	0,69	0,61
	SCLAV_0163	DUF35 domain-containing protein	-0,34	-0,60	-0,55	6,65E-01	3,11E-01	3,62E-01	0,79	0,66	0,68
	SCLAV_0164	Enoyl-CoA hydratase	-0,75	-0,76	-1,54	4,28E-03	2,75E-03	7,66E-07	0,60	0,59	0,34
	SCLAV_0165	FadD-like protein	-0,35	-0,24	-1,74	2,12E-01	3,75E-01	1,94E-07	0,78	0,85	0,30
	SCLAV_0166	Alpha/beta hydrolase	-1,25	-1,63	-1,11	4,32E-03	2,57E-04	6,44E-03	0,42	0,32	0,46
	SCLAV_0167	Ionic transporter	0,01	0,70	0,33	9,91E-01	1,48E-01	5,54E-01	1,01	1,63	1,25
	SCLAV_0168	Putative acyl-CoA synthetase, long-chain fatty acid:CoA ligase	-0,13	-0,07	-1,25	8,17E-01	8,75E-01	7,72E-04	0,91	0,95	0,42
	SCLAV_0169	Dioxygenase	-0,40	-1,18	-1,79	1,32E-01	2,12E-05	6,48E-08	0,76	0,44	0,29
	SCLAV_0170	Beta-lactamase	0,06	-0,29	-0,86	9,12E-01	4,27E-01	8,00E-03	1,04	0,82	0,55
	SCLAV_0171	Endoribonuclease L-PSP	0,67	0,84	1,26	1,09E-01	3,07E-02	1,25E-03	1,59	1,78	2,39
	SCLAV_0172	Serine/threonine protein kinase	0,44	0,18	-0,03	1,76E-01	5,89E-01	9,41E-01	1,35	1,13	0,98
	Agrupación SMCS										
	SCLAV_0446	Hypothetical protein	4,18	3,72	-0,88	8,21E-04	1,82E-03	5,00E-01	18,11	13,21	0,54
	SCLAV_0447	FkbH like protein	2,44	2,43	-1,09	2,86E-03	2,18E-03	1,58E-01	5,41	5,39	0,47
	SCLAV_0448	Hypothetical protein	1,30	0,65	-2,37	9,06E-02	4,03E-01	1,10E-03	2,46	1,57	0,19
	SCLAV_0449	AMP-binding domain-containing protein	3,37	3,14	-0,89	5,43E-03	6,94E-03	4,91E-01	10,34	8,83	0,54
	SCLAV_0450	Acyl-CoA dehydrogenase domain protein	2,79	2,62	-1,21	6,14E-03	7,22E-03	2,21E-01	6,90	6,17	0,43

SCLAV_0451	Acyl-CoA dehydrogenase	3,36	3,31	-0,88	3,34E-03	2,81E-03	4,63E-01	10,30	9,95	0,54
SCLAV_0452	Peptide carrier protein	3,64	3,12	-0,84	4,96E-03	1,14E-02	5,51E-01	12,44	8,72	0,56
SCLAV_0453	Polyketide synthase	3,08	2,43	-1,65	5,98E-03	2,26E-02	1,20E-01	8,48	5,39	0,32
SCLAV_0454	3-Oxoacyl- acyl-carrier-protein synthase III	3,16	3,21	-1,87	5,24E-03	3,41E-03	7,55E-02	8,93	9,27	0,27
SCLAV_0455	Acyl carrier protein	-0,13	-0,30	-2,48	8,85E-01	6,32E-01	3,36E-05	0,92	0,81	0,18
SCLAV_0456	Hydrolase superfamily dihydrolipoamide acyltransferase-like protein	-0,20	-0,32	-2,49	8,17E-01	6,17E-01	4,25E-05	0,87	0,80	0,18
SCLAV_0457	4'-Phosphopantetheinyl transferase	-0,02	-0,12	-2,33	9,85E-01	8,70E-01	1,68E-04	0,99	0,92	0,20
SCLAV_0458	Hypothetical protein	0,54	0,25	1,13	4,34E-01	7,06E-01	4,06E-02	1,46	1,19	2,19
SCLAV_0459	Alpha/beta hydrolase	3,40	2,78	-1,62	8,49E-03	2,38E-02	1,93E-01	10,55	6,88	0,32
SCLAV_0460	Putative hydrolase	3,06	2,67	-1,26	3,82E-03	8,15E-03	2,16E-01	8,34	6,37	0,42
SCLAV_0461	Hypothetical protein	1,96	1,54	0,20	1,02E-02	2,12E-02	8,16E-01	3,90	2,91	1,15
SCLAV_0462	Putative regulatory protein AfsR-like protein	2,03	1,78	-0,31	4,28E-03	8,75E-03	7,08E-01	4,08	3,43	0,81
SCLAV_0463	Putative gamma-butyrolactone biosynthesis protein	2,88	2,82	-0,14	1,12E-03	1,01E-03	8,99E-01	7,35	7,08	0,91
SCLAV_0464	Ferredoxin	1,04	1,01	-0,33	1,47E-01	1,30E-01	6,89E-01	2,05	2,01	0,80
SCLAV_0466	Oxidoreductase	0,07	-0,16	0,22	9,09E-01	7,15E-01	6,40E-01	1,05	0,89	1,16
SCLAV_0467	SMP-30/gluconolactonase/LRE domain-containing protein	5,80	4,12	0,64	2,03E-04	4,00E-03	7,16E-01	55,59	17,34	1,55
SCLAV_0468	Putative membrane protein	3,67	3,47	-0,16	1,15E-03	1,50E-03	9,14E-01	12,76	11,05	0,90
SCLAV_0469	HAD-superfamily hydrolase, subfamily IA, variant 3	3,62	3,32	-0,74	3,34E-03	5,04E-03	5,90E-01	12,32	9,97	0,60
SCLAV_0470	Monooxygenase	2,55	2,35	-0,93	8,78E-03	1,20E-02	3,48E-01	5,86	5,09	0,53
SCLAV_0471	Gamma-butyrolactone biosynthesis protein	2,77	2,99	-1,34	1,47E-02	6,50E-03	2,28E-01	6,81	7,92	0,40
SCLAV_0472	LuxR response regulator receiver	0,46	-0,30	-1,56	3,57E-01	5,57E-01	3,54E-04	1,38	0,81	0,34

	SCLAV_0473	Putative two-component sensory kinase	0,61	-0,04	-0,60	3,30E-02	9,17E-01	2,47E-02	1,53	0,98	0,66
	SCLAV_0474	Goadsporin biosynthetic protein	4,57	2,70	0,58	7,53E-06	7,44E-04	4,98E-01	23,75	6,48	1,50
	SCLAV_0475	Goadsporin biosynthetic protein	4,41	2,39	-0,06	7,50E-06	1,62E-03	9,54E-01	21,27	5,24	0,96
	SCLAV_0476	Hypothetical protein	4,96	2,71	-0,28	6,73E-06	1,31E-03	7,91E-01	31,02	6,55	0,83
	SCLAV_0477	SARP-family pathway specific regulatory protein	4,81	3,77	0,59	1,12E-05	5,96E-05	5,47E-01	28,05	13,65	1,50
	SCLAV_0478	Thioesterase domain protein	4,02	3,29	-0,31	6,08E-04	2,92E-03	8,30E-01	16,27	9,81	0,81
	SCLAV_0479	Integral membrane protein	2,21	2,07	-0,11	1,74E-02	1,99E-02	9,29E-01	4,62	4,20	0,93
	SCLAV_0480	Major facilitator superfamily permease	5,29	4,07	-0,54	3,03E-04	2,78E-03	7,48E-01	39,03	16,85	0,69
	SCLAV_0481	Putative 3-oxoacyl-ACP synthase III	5,59	4,69	-0,41	3,39E-04	1,44E-03	8,24E-01	48,04	25,88	0,75
	SCLAV_0482	AMP-dependent synthetase and ligase	5,44	4,90	-0,35	1,05E-03	2,08E-03	8,66E-01	43,36	29,83	0,78
	SCLAV_0483	Decarboxylase	5,42	4,68	-0,31	4,22E-04	1,36E-03	8,71E-01	42,91	25,56	0,81
	SCLAV_0484	Putative 3-oxoacyl-ACP synthase III	3,91	2,81	-0,98	2,62E-03	2,17E-02	4,70E-01	15,00	6,99	0,51
	SCLAV_0485	Putative membrane protein	4,98	3,65	0,02	3,60E-05	7,25E-04	9,87E-01	31,63	12,58	1,02
	SCLAV_0486	Cytochrome P450-like enzyme	4,16	3,22	-0,04	3,03E-04	2,67E-03	9,80E-01	17,86	9,34	0,97
	SCLAV_0487	Monooxygenase	2,48	1,99	-1,01	5,01E-03	1,76E-02	2,42E-01	5,58	3,98	0,50
	SCLAV_0488	Cyclase/dehydrase	0,88	0,61	-0,81	4,48E-02	1,48E-01	4,75E-02	1,84	1,53	0,57
	SCLAV_0489	MMPL domain protein	5,75	4,01	0,05	1,17E-04	3,14E-03	9,78E-01	53,92	16,11	1,04
	SCLAV_0490	Glycosyl hydrolase family 109 protein	0,33	-0,15	-0,66	3,33E-01	6,65E-01	2,10E-02	1,26	0,90	0,63
	SCLAV_0491	Putative ABC transporter ATPase and permease component	0,82	0,80	2,25	3,74E-02	3,21E-02	1,08E-06	1,76	1,74	4,77
	SCLAV_0492	ABC transporter	0,72	0,73	1,79	5,17E-02	3,74E-02	9,34E-06	1,65	1,66	3,45
	SCLAV_0493	Hypothetical protein	0,24	0,30	1,29	8,00E-01	6,76E-01	3,30E-02	1,18	1,23	2,45
	SCLAV_0494	Integral membrane protein	0,71	0,90	1,43	1,33E-02	1,48E-03	6,64E-06	1,63	1,87	2,69
	SCLAV_0495	ATP-dependent helicase	0,52	0,71	1,46	1,24E-01	2,38E-02	2,52E-05	1,44	1,63	2,76

	SCLAV_0496	Acyl-CoA thioesterase	0,09	0,27	0,17	8,65E-01	4,59E-01	6,75E-01	1,06	1,21	1,13
	SCLAV_0497	Glutathione peroxidase	-0,73	-0,58	-0,63	2,32E-03	1,01E-02	4,40E-03	0,60	0,67	0,65
Agrupación SMC6											
	SCLAV_1942	TetR-family transcriptional regulator	0,30	0,19	-1,82	4,27E-01	5,73E-01	1,36E-06	1,23	1,14	0,28
	SCLAV_1943	Acetyl/propionyl CoA carboxylase	1,85	1,15	-3,88	1,06E-03	2,92E-02	6,84E-08	3,61	2,21	0,07
	SCLAV_1944	Acetyl/propionyl CoA carboxylase alpha subunit	1,18	0,87	-3,69	5,35E-03	3,06E-02	2,86E-09	2,27	1,83	0,08
	SCLAV_1945	Putative hydroxymethylglutaryl-CoA lyase	1,25	0,55	-4,45	3,20E-03	1,82E-01	2,45E-10	2,37	1,46	0,05
	SCLAV_1946	Acyl-CoA dehydrogenase	1,27	0,65	-4,28	7,85E-03	1,61E-01	1,94E-09	2,42	1,57	0,05
	SCLAV_1947	Siderophore-interacting protein	-0,71	-3,34	-1,99	6,84E-01	8,02E-03	1,07E-01	0,61	0,10	0,25
	SCLAV_1948	Pyridoxal-dependent decarboxylase	-2,72	-6,07	-1,85	1,76E-01	1,43E-03	3,39E-01	0,15	0,01	0,28
	SCLAV_1949	Cadaverine N-monooxygenase	-2,75	-6,01	-1,65	1,28E-01	6,25E-04	3,53E-01	0,15	0,02	0,32
	SCLAV_1950	Acetyltransferase	-2,51	-5,71	-1,83	1,62E-01	9,04E-04	2,84E-01	0,18	0,02	0,28
	SCLAV_1951	Nocardamine synthetase	-2,25	-5,48	-1,65	2,03E-01	9,79E-04	3,24E-01	0,21	0,02	0,32
	SCLAV_1952	Hypothetical protein	-1,08	-2,89	-1,25	1,15E-01	4,90E-05	4,42E-02	0,47	0,13	0,42
	SCLAV_1953	Hypothetical protein	-0,22	-0,76	-0,33	6,21E-01	2,31E-02	3,64E-01	0,86	0,59	0,80
	SCLAV_1954	Hypothetical protein	0,18	0,10	0,24	8,40E-01	8,87E-01	7,30E-01	1,13	1,07	1,18
	SCLAV_1955	L-glutamine-D-fructose-6-phosphate amidotransferase	-0,08	-0,48	0,52	8,23E-01	3,70E-02	2,02E-02	0,95	0,72	1,43
Agrupación SMC7											
	SCLAV_2274	Integral membrane protein	-0,16	0,35	1,00	6,16E-01	1,40E-01	7,38E-05	0,90	1,28	2,00
	SCLAV_2275	Putative pyridoxamine 5'''-phosphate oxidase- related protein	0,45	0,58	0,65	5,47E-01	3,53E-01	2,92E-01	1,37	1,50	1,56
	SCLAV_2276	Penicillin-binding protein	-1,85	-1,04	-1,88	2,36E-03	7,03E-02	1,12E-03	0,28	0,49	0,27
	SCLAV_2277	YbaK/prolyl-tRNA synthetase associated region	-1,14	-0,44	0,46	3,72E-03	2,55E-01	2,24E-01	0,45	0,74	1,38
	SCLAV_2278	Hypothetical protein	1,40	2,07	2,73	2,31E-02	7,71E-04	2,60E-05	2,63	4,20	6,64

	SCLAV_2279	Hypothetical protein	1,10	1,83	2,87	7,62E-02	2,21E-03	1,29E-05	2,14	3,56	7,32
	SCLAV_2280	Probable FAD-dependent monooxygenase	0,73	0,75	-0,04	3,26E-01	2,61E-01	9,66E-01	1,66	1,68	0,97
	SCLAV_2281	Non-ribosomal peptide synthetase	0,79	1,18	-0,34	3,17E-01	8,38E-02	6,84E-01	1,73	2,27	0,79
	SCLAV_2282	Putative peptidoglycan binding domain protein	-1,06	-0,32	-1,48	5,93E-02	5,90E-01	4,80E-03	0,48	0,80	0,36
	SCLAV_2283	Putative integral membrane protein	-1,16	-0,46	-1,31	9,45E-03	3,07E-01	2,06E-03	0,45	0,73	0,40
	SCLAV_2284	Hypothetical protein	-0,71	-0,09	-1,40	2,67E-01	9,03E-01	1,10E-02	0,61	0,94	0,38
	SCLAV_2285	Hypothetical protein	-0,01	-0,07	0,64	9,90E-01	8,92E-01	1,41E-01	0,99	0,95	1,56
	SCLAV_2286	RimK domain protein ATP-grasp	-0,45	-0,58	-0,37	3,58E-01	1,66E-01	4,13E-01	0,73	0,67	0,78
	SCLAV_2287	Histidyl-tRNA synthetase	0,40	0,72	-0,40	5,92E-01	2,24E-01	5,43E-01	1,32	1,65	0,76
	SCLAV_2288	Hypothetical protein	-1,40	-1,77	-3,78	4,39E-03	3,59E-04	1,70E-08	0,38	0,29	0,07
	SCLAV_2289	Hypothetical protein	3,92	4,42	3,80	3,05E-04	5,57E-05	2,28E-04	15,11	21,48	13,90
	SCLAV_2290	Hypothetical protein	3,61	3,90	2,99	1,24E-04	3,58E-05	5,00E-04	12,19	14,94	7,95
	SCLAV_2291	DNA-binding protein	-0,14	-0,56	-0,93	8,01E-01	1,32E-01	8,99E-03	0,91	0,68	0,52
	SCLAV_2292	Putative regulatory protein	-0,25	-0,73	-1,03	3,66E-01	1,99E-03	3,74E-05	0,84	0,60	0,49
	SCLAV_2293	Putative regulatory protein	-0,22	-0,68	-1,06	4,33E-01	3,93E-03	3,34E-05	0,86	0,62	0,48
	SCLAV_2294	Putative hydrolase	0,28	0,70	0,12	6,98E-01	1,78E-01	8,56E-01	1,21	1,62	1,09
	SCLAV_2295	Oxidoreductase	-0,16	0,51	0,67	5,64E-01	1,83E-02	1,81E-03	0,89	1,42	1,60
	SCLAV_2296	Putative esterase	0,38	0,83	0,86	3,96E-01	2,51E-02	1,72E-02	1,30	1,77	1,81
	SCLAV_2297	Putative ABC transporter ATP-binding protein	-0,58	-1,44	-2,37	8,34E-02	4,39E-05	4,92E-08	0,67	0,37	0,19
	SCLAV_2298	Integral membrane transport protein	-0,65	-1,53	-3,12	2,54E-01	2,99E-03	7,68E-07	0,64	0,35	0,12
	SCLAV_2299	ABC-type cobalt transporter	-0,83	-1,59	-3,02	6,46E-02	4,18E-04	1,09E-07	0,56	0,33	0,12
	SCLAV_2300	Cell division protein	-0,80	-0,87	-1,23	4,50E-02	2,17E-02	1,26E-03	0,57	0,55	0,43
	SCLAV_2301	Putative transmembrane transport protein	0,85	1,54	2,20	3,72E-02	2,40E-04	2,49E-06	1,80	2,90	4,60

	SCLAV_2302	TetR-family transcriptional regulator	0,90	1,60	2,63	4,60E-02	3,95E-04	8,32E-07	1,86	3,04	6,17
Agrupación SMC8											
	SCLAV_2456	Hypothetical protein	0,17	0,41	0,60	7,47E-01	2,65E-01	8,63E-02	1,12	1,33	1,52
	SCLAV_2457	Putative kinase	-0,06	-1,01	0,93	9,37E-01	3,49E-02	4,68E-02	0,96	0,50	1,90
	SCLAV_2458	Hypothetical protein	0,03	-0,88	0,53	9,64E-01	5,37E-02	2,64E-01	1,02	0,54	1,44
	SCLAV_2459	Hypothetical protein	-0,16	-1,04	0,98	8,27E-01	2,49E-02	2,87E-02	0,90	0,49	1,98
	SCLAV_2460	Hypothetical protein	0,54	-0,26	-0,36	4,93E-01	7,17E-01	6,30E-01	1,45	0,83	0,78
	SCLAV_2461	DUF574 domain-containing protein	-0,02	-1,33	0,34	9,78E-01	2,33E-03	4,79E-01	0,99	0,40	1,26
	SCLAV_2462	Hypothetical protein	-0,82	-2,05	1,01	1,91E-01	6,48E-04	7,18E-02	0,57	0,24	2,01
	SCLAV_2463	NUDIX hydrolase	-0,92	-1,89	0,91	1,45E-01	1,64E-03	1,12E-01	0,53	0,27	1,88
	SCLAV_2464	Protein-L-isoaspartate D-aspartate O- methyltransferase	-1,00	-1,65	0,45	9,34E-02	3,72E-03	4,64E-01	0,50	0,32	1,37
	SCLAV_2465	Hypothetical protein	0,10	-0,99	-0,74	8,37E-01	1,47E-03	1,10E-02	1,07	0,50	0,60
	SCLAV_2466	Lantibiotic dehydratase-like protein	-0,23	-1,16	0,00	4,71E-01	6,67E-05	9,95E-01	0,85	0,45	1,00
	SCLAV_2467	Lanthionine synthetase C family protein	0,11	-0,49	-0,44	8,76E-01	3,16E-01	3,77E-01	1,08	0,71	0,74
	SCLAV_2468	Putative O-methyltransferase	-0,44	-1,40	-0,02	5,32E-01	1,27E-02	9,78E-01	0,73	0,38	0,98
	SCLAV_2469	Hypothetical protein	-0,53	-1,45	0,11	1,28E-01	5,00E-05	7,83E-01	0,69	0,36	1,08
Agrupación de clavamas (SMC9)											
<i>cvm9</i>	SCLAV_2921	DNA-binding protein	-1,06	-1,11	-0,63	3,36E-04	1,52E-04	1,72E-02	0,48	0,46	0,65
<i>cvm6</i>	SCLAV_2922	Putative pyridoxal phosphate-dependent aminotransferase	-1,23	0,57	0,24	3,64E-02	3,43E-01	7,38E-01	0,43	1,48	1,18
<i>cvm5</i>	SCLAV_2923	Flavin-dependent oxidoreductase	-0,09	0,50	-0,10	9,30E-01	4,59E-01	9,00E-01	0,94	1,41	0,93
<i>cvm4</i>	SCLAV_2924	Alpha/beta hydrolase	-0,41	0,50	-0,16	2,50E-01	1,21E-01	6,71E-01	0,75	1,41	0,89
<i>cas1</i>	SCLAV_2925	Clavamate synthase 1	-0,11	0,48	-0,27	9,31E-01	5,86E-01	7,88E-01	0,93	1,39	0,83
<i>cvm1</i>	SCLAV_2926	Aldo/keto reductase	-0,56	-0,76	-0,95	4,52E-02	4,96E-03	5,35E-04	0,68	0,59	0,52
<i>cvm2</i>	SCLAV_2927	Hypothetical protein	-1,46	-1,72	-1,91	8,05E-03	1,59E-03	4,24E-04	0,36	0,30	0,27

<i>cvm3</i>	SCLAV_2928	Flavin reductase-like protein	-0,48	-0,45	-0,16	5,58E-01	5,29E-01	8,49E-01	0,72	0,73	0,89
<i>cvm7</i>	SCLAV_2929	Dnrl/RedD/AfsR-family transcriptional regulator	1,16	1,55	1,16	1,71E-03	6,02E-05	9,99E-04	2,24	2,93	2,23
<i>cvm11</i>	SCLAV_2930	Putative translocator	0,40	0,56	1,19	1,65E-01	3,35E-02	4,06E-05	1,32	1,48	2,27
<i>cvm12</i>	SCLAV_2931	Putative transcriptional regulatory protein	1,18	1,15	0,08	2,75E-04	2,58E-04	8,42E-01	2,26	2,22	1,06
<i>cvm13</i>	SCLAV_2932	Beta-aspartyl-peptidase	-0,54	-1,03	-1,61	1,96E-01	6,92E-03	7,53E-05	0,69	0,49	0,33
<i>cvmH</i>	SCLAV_2933	LanU-like protein	1,17	0,81	0,33	1,04E-02	6,16E-02	5,06E-01	2,25	1,76	1,25
<i>cvmP</i>	SCLAV_2934	Putative protein-arginine deiminase	0,60	0,72	1,95	1,39E-01	5,18E-02	6,10E-06	1,51	1,65	3,87
<i>cvmG</i>	SCLAV_2935	Hypothetical protein	0,28	0,40	0,20	4,87E-01	2,33E-01	6,04E-01	1,21	1,32	1,15
Agrupación de ácido clavulánico (SMC10)											
<i>pbp2</i>	SCLAV_4179	Penicillin-binding protein	-0,28	-0,30	-0,24	6,33E-02	3,24E-02	8,91E-02	0,83	0,81	0,85
<i>pbpA</i>	SCLAV_4180	Penicillin-binding protein PBP	0,14	0,22	0,76	6,72E-01	4,22E-01	2,05E-03	1,11	1,16	1,70
<i>gcaS</i>	SCLAV_4181	Biotin carboxylase	-0,97	-1,72	-1,94	1,38E-01	4,83E-03	1,28E-03	0,51	0,30	0,26
<i>orf16</i>	SCLAV_4182	DUF482 domain-containing protein	-0,85	-1,59	-2,17	2,31E-01	1,22E-02	7,34E-04	0,56	0,33	0,22
<i>oppA2</i>	SCLAV_4183	ABC-type dipeptide transport system	-0,98	-1,67	-1,71	5,71E-01	2,30E-01	2,11E-01	0,51	0,31	0,31
<i>orf14</i>	SCLAV_4185	Acetyltransferase GNAT-family protein	-0,89	-1,83	-1,69	8,31E-02	3,45E-04	5,93E-04	0,54	0,28	0,31
<i>orf13</i>	SCLAV_4186	Integral membrane protein	-0,76	-1,52	-1,22	2,09E-01	5,68E-03	2,11E-02	0,59	0,35	0,43
<i>orf12</i>	SCLAV_4187	Beta-lactamase	-0,96	-1,31	-1,54	9,58E-02	1,52E-02	3,71E-03	0,51	0,40	0,34
<i>fd</i>	SCLAV_4188	Ferredoxin	-0,81	-1,16	-1,49	9,79E-02	1,19E-02	1,23E-03	0,57	0,45	0,36
<i>cyp</i>	SCLAV_4189	Cytochrome P450-SU2	-0,92	-1,48	-1,80	9,53E-02	4,78E-03	6,58E-04	0,53	0,36	0,29
<i>car</i>	SCLAV_4190	Clavaldhyde reductase	-1,11	-1,66	-1,93	9,64E-02	8,38E-03	4,14E-03	0,46	0,32	0,26
<i>claR</i>	SCLAV_4191	Transcriptional activator	-0,21	-0,77	-1,31	8,25E-01	2,22E-01	2,80E-02	0,86	0,58	0,40
<i>oppA1</i>	SCLAV_4192	ABC-type dipeptide transport system	-1,17	-1,35	-1,67	3,53E-02	1,13E-02	1,75E-03	0,44	0,39	0,32
<i>oat2</i>	SCLAV_4193	Glutamate N-acetyltransferase 2	-0,88	-1,11	0,74	3,61E-02	6,00E-03	5,89E-02	0,54	0,46	1,67
<i>cas2</i>	SCLAV_4194	Clavamate synthase 2	0,17	-0,38	-1,19	8,28E-01	4,54E-01	9,40E-03	1,13	0,77	0,44

<i>pah2</i>	SCLAV_4195	Proclavaminate amidinohydrolase 2	0,03	-0,60	-0,80	9,77E-01	3,05E-01	1,45E-01	1,02	0,66	0,57
<i>bls2</i>	SCLAV_4196	Carboxyethylarginine beta-lactam-synthetase 2	0,07	-0,33	-0,54	9,28E-01	5,00E-01	2,37E-01	1,05	0,80	0,69
<i>ceaS2</i>	SCLAV_4197	Carboxyethylarginine synthase 2	0,06	-0,08	-0,45	9,33E-01	8,80E-01	3,28E-01	1,04	0,95	0,73
Agrupación de cefamicina C (SMC11)											
<i>pcbR</i>	SCLAV_4198	Beta-lactam antibiotic resistance	-0,56	-0,74	-0,25	6,52E-03	3,95E-04	2,14E-01	0,68	0,60	0,84
<i>pcbC</i>	SCLAV_4199	Isopenicillin N synthetase	-0,73	-1,84	-3,78	2,59E-01	1,82E-03	3,02E-07	0,60	0,28	0,07
<i>pcbAB</i>	SCLAV_4200	ACV synthetase	-1,17	-2,34	-3,43	1,04E-01	8,64E-04	8,27E-06	0,44	0,20	0,09
<i>lat</i>	SCLAV_4201	L-lysine-epsilon aminotransferase	-1,35	-2,59	-3,58	1,23E-01	1,93E-03	4,63E-05	0,39	0,17	0,08
<i>blp</i>	SCLAV_4202	Beta-Lactamase Inhibitory Protein-Like Protein	-0,46	-0,59	0,13	6,23E-01	4,41E-01	8,91E-01	0,73	0,66	1,10
<i>orf10</i>	SCLAV_4203	Secreted protein	-0,72	-0,64	0,04	7,32E-02	8,90E-02	9,45E-01	0,61	0,64	1,03
<i>ccaR</i>	SCLAV_4204	Transcriptional regulator	-0,32	-0,51	-1,24	3,63E-01	9,37E-02	1,15E-04	0,80	0,70	0,42
<i>cmcH</i>	SCLAV_4205	3'-Hydroxymethylcephem-O-carbamoyltransferase	-1,19	-1,70	-2,65	7,99E-02	8,51E-03	9,94E-05	0,44	0,31	0,16
<i>cefF</i>	SCLAV_4206	Deacetoxycephalosporin C hydroxylase	-1,79	-2,36	-3,45	5,36E-02	7,72E-03	1,80E-04	0,29	0,20	0,09
<i>cmcJ</i>	SCLAV_4207	Methyltransferase	-1,86	-2,57	-3,69	4,46E-02	4,04E-03	8,43E-05	0,28	0,17	0,08
<i>cmcl</i>	SCLAV_4208	Cephalosporin hydroxylase	-1,40	-1,73	-3,02	1,03E-01	2,93E-02	2,70E-04	0,38	0,30	0,12
<i>cefD</i>	SCLAV_4210	Isopenicillin N epimerase	-1,47	-1,88	-3,24	1,35E-01	3,77E-02	4,97E-04	0,36	0,27	0,11
<i>cefE</i>	SCLAV_4211	Deacetoxycephalosporin C synthase	-1,54	-1,77	-2,47	7,20E-02	2,74E-02	2,14E-03	0,34	0,29	0,18
<i>pcd</i>	SCLAV_4212	Piperideine carboxylate dehydrogenase	-1,17	-1,38	-1,92	6,48E-03	1,13E-03	2,30E-05	0,45	0,38	0,26
<i>cmcT</i>	SCLAV_4213	CmcT protein	-1,28	-1,34	-1,08	2,66E-03	1,30E-03	6,25E-03	0,41	0,39	0,47
<i>pbp74</i>	SCLAV_4214	Penicillin-binding protein	-0,23	-0,08	0,80	4,30E-01	7,80E-01	8,02E-04	0,86	0,95	1,74
<i>bla</i>	SCLAV_4215	Type I β -lactamase	-1,30	-1,71	-3,15	1,41E-01	3,56E-02	2,20E-04	0,40	0,31	0,11
Agrupación de tunicamicina											
	SCLAV_4276	Phosphatidylglycerophosphatase B	2,18	2,57	2,62	5,87E-05	6,61E-06	3,10E-06	4,54	5,95	6,15
	SCLAV_4277	Polyketide synthase	2,10	2,65	2,78	5,41E-04	2,84E-05	1,14E-05	4,28	6,28	6,86

	SCLAV_4278	ABC-2 type transporter	2,41	2,94	2,45	4,24E-04	3,17E-05	1,87E-04	5,30	7,70	5,46
	SCLAV_4279	ABC transporter related protein	2,34	2,90	3,29	3,06E-04	1,90E-05	2,89E-06	5,05	7,48	9,75
	SCLAV_4280	Type I phosphodiesterase/nucleotide pyrophosphatase	2,72	3,22	3,30	1,56E-04	1,59E-05	8,33E-06	6,58	9,34	9,82
	SCLAV_4281	Phosphoglycerate mutase	3,05	4,09	4,07	1,20E-04	4,19E-06	1,91E-06	8,27	17,09	16,79
	SCLAV_4282	UDP-glucose 4-epimerase	3,38	4,26	4,12	6,37E-05	4,37E-06	2,93E-06	10,42	19,15	17,37
	SCLAV_4283	LmbE-family protein	3,24	4,08	3,37	2,00E-04	1,05E-05	6,48E-05	9,42	16,97	10,32
	SCLAV_4284	Glycosyl transferase group 1	3,18	4,20	3,60	1,49E-04	5,32E-06	1,76E-05	9,06	18,33	12,16
	SCLAV_4285	GCN5-related N-acetyltransferase	3,25	4,24	4,13	3,35E-04	1,24E-05	1,11E-05	9,53	18,86	17,52
	SCLAV_4286	Radical SAM domain protein	3,49	4,68	4,37	5,34E-04	1,44E-05	2,19E-05	11,21	25,55	20,61
	SCLAV_4287	NAD-dependent epimerase/dehydratase	3,10	4,66	4,56	1,69E-03	1,47E-05	1,28E-05	8,54	25,29	23,56
Agrupación SMC12											
	SCLAV_4387	Magnesium or manganese-dependent protein phosphatase prpM4	-1,83	-1,13	-0,45	3,54E-02	1,82E-01	6,50E-01	0,28	0,46	0,73
	SCLAV_4388	Putative O-methyltransferase	-2,08	-1,38	-0,03	3,31E-03	3,76E-02	9,78E-01	0,24	0,38	0,98
	SCLAV_4389	Putative lantibiotic precursor	-2,25	-2,68	-2,87	5,48E-02	1,60E-02	8,31E-03	0,21	0,16	0,14
	SCLAV_4390	Lantibiotic dehydratase domain-containing protein	-0,91	-0,98	-0,25	2,54E-02	1,27E-02	5,81E-01	0,53	0,51	0,84
	SCLAV_4391	Putative lanthionine synthetase C-like protein	-0,94	-0,96	-0,51	1,38E-02	9,05E-03	1,62E-01	0,52	0,51	0,70
	SCLAV_4392	Putative O-methyltransferase	-1,02	-1,00	-0,38	1,67E-02	1,43E-02	3,85E-01	0,49	0,50	0,77
Agrupación SMC13											
	SCLAV_4460	Putative aminoglycoside 2-N-acetyltransferase	-0,37	0,20	0,79	3,88E-01	6,26E-01	2,57E-02	0,77	1,15	1,72
	SCLAV_4461	Hypothetical protein	-1,40	-1,78	0,68	6,10E-02	1,23E-02	3,72E-01	0,38	0,29	1,60
	SCLAV_4462	3-Isopropylmalate dehydrogenase	-1,06	-1,04	3,64	1,97E-02	1,64E-02	1,04E-08	0,48	0,49	12,45

SCLAV_4463	Branched-chain-amino-acid aminotransferase	0,11	-0,07	-0,07	6,87E-01	7,46E-01	7,75E-01	1,08	0,95	0,95
SCLAV_4464	LuxR-family transcriptional regulator	-1,41	-2,35	-2,65	1,51E-02	6,12E-04	1,95E-05	0,38	0,20	0,16
SCLAV_4465	Cytochrome P450	-0,64	-1,19	-1,20	3,85E-01	5,31E-02	4,57E-02	0,64	0,44	0,43
SCLAV_4466	Hybrid NRPS / PKS	-1,23	-1,77	-0,97	5,28E-02	3,99E-03	1,04E-01	0,43	0,29	0,51
SCLAV_4467	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR	-1,71	-2,19	-1,29	2,84E-02	1,94E-03	5,28E-02	0,30	0,22	0,41
SCLAV_4468	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR	-1,59	-2,36	-1,91	2,10E-02	6,60E-04	3,35E-03	0,33	0,20	0,27
SCLAV_4469	Monooxygenase	-1,67	-2,49	-1,67	4,16E-02	2,02E-03	2,86E-02	0,31	0,18	0,32
SCLAV_4470	Putative secreted lipase	-1,67	-2,35	-1,14	4,28E-02	1,54E-03	1,08E-01	0,31	0,20	0,45
SCLAV_4471	Putative membrane protein	-1,61	-2,29	-0,99	3,28E-02	1,99E-03	1,70E-01	0,33	0,21	0,50
SCLAV_4472	Amidase	-1,75	-2,17	-2,08	4,38E-02	8,92E-03	9,83E-03	0,30	0,22	0,24
SCLAV_4473	Urease subunit gamma/beta	0,29	-0,22	-0,38	4,60E-01	5,43E-01	2,44E-01	1,22	0,86	0,77
SCLAV_4474	Urease subunit alpha 2	-0,20	-0,23	-0,30	2,98E-01	1,78E-01	6,22E-02	0,87	0,86	0,81
SCLAV_4475	Putative peptidylarginine deiminase	0,07	0,26	-0,18	8,33E-01	2,13E-01	4,26E-01	1,05	1,20	0,88
SCLAV_4476	TetR-family transcriptional regulator	-0,26	-0,34	0,25	2,61E-01	1,04E-01	2,46E-01	0,83	0,79	1,19
SCLAV_4477	Transporter	-0,47	-1,31	-1,72	4,12E-01	6,43E-03	4,39E-04	0,72	0,40	0,30
SCLAV_4478	Putative 2-isopropylmalate synthase	0,73	0,51	2,86	2,02E-01	3,52E-01	3,00E-06	1,65	1,42	7,24
SCLAV_4479	YceI-family protein	-3,17	-4,04	-6,24	2,85E-04	1,34E-05	2,63E-08	0,11	0,06	0,01
SCLAV_4480	Pyridoxal-5'-phosphate-dependent protein beta subunit	0,66	0,49	0,25	4,39E-03	2,73E-02	2,64E-01	1,58	1,40	1,19
SCLAV_4481	YheO domain protein	0,48	0,59	-0,19	3,36E-01	1,75E-01	7,25E-01	1,40	1,51	0,88
SCLAV_4482	Calcium-binding EF-hand-containing protein	0,52	0,65	0,49	1,34E-01	4,31E-02	1,28E-01	1,44	1,57	1,40
SCLAV_4483	Putative secreted lyase	-1,24	-2,17	-3,04	9,23E-04	2,83E-06	5,72E-09	0,42	0,22	0,12

	SCLAV_4484	Methylmalonyl-CoA decarboxylase alpha subunit	2,69	2,69	1,21	2,92E-04	2,18E-04	6,61E-02	6,46	6,44	2,32
	SCLAV_4485	Hypothetical protein	2,32	1,89	0,26	5,40E-05	3,46E-04	6,61E-01	4,98	3,71	1,20
	SCLAV_4486	Roadblock/LC7-family protein	0,29	0,56	1,08	5,06E-01	1,12E-01	1,89E-03	1,22	1,47	2,12
Agrupación SMC14											
	SCLAV_4740	Regulatory protein	0,37	1,00	0,70	2,85E-01	1,41E-03	1,83E-02	1,29	2,00	1,62
	SCLAV_4741	Hypothetical protein	0,59	0,17	0,66	2,68E-01	7,58E-01	1,57E-01	1,50	1,13	1,58
	SCLAV_4742	Non-ribosomal peptide synthase	-0,15	-0,24	0,58	8,47E-01	6,81E-01	2,71E-01	0,90	0,85	1,49
	SCLAV_4743	Thioesterase	-0,32	0,26	0,24	2,12E-01	2,85E-01	3,07E-01	0,80	1,20	1,18
	SCLAV_4744	Lipoprotein	-0,45	-0,53	-0,17	8,42E-02	2,96E-02	5,32E-01	0,73	0,69	0,89
	SCLAV_4745	Integral membrane protein	-0,55	-0,86	-0,07	1,00E-01	6,32E-03	8,76E-01	0,68	0,55	0,96
	SCLAV_4746	Hypothetical protein	-0,15	-0,05	-0,49	7,52E-01	9,01E-01	1,28E-01	0,90	0,97	0,71
	SCLAV_4747	Transcriptional regulator	-0,07	-0,25	-0,78	9,09E-01	5,31E-01	2,69E-02	0,95	0,84	0,58
	SCLAV_4748	Putative multidrug resistance protein	-0,42	0,03	-0,22	3,32E-01	9,52E-01	6,20E-01	0,74	1,02	0,86
	SCLAV_4749	Non-ribosomal peptide synthetase	-0,68	-0,47	-0,13	2,03E-02	9,04E-02	7,00E-01	0,63	0,72	0,91
	SCLAV_4750	Non-ribosomal peptide synthetase	-0,66	0,33	0,55	2,92E-02	2,76E-01	5,14E-02	0,63	1,26	1,46
	SCLAV_4751	MbtH domain protein	-1,80	-0,07	0,50	1,86E-04	8,96E-01	2,61E-01	0,29	0,95	1,42
	SCLAV_4752	SyrP-like protein	-1,51	0,05	0,30	7,10E-04	9,26E-01	5,15E-01	0,35	1,03	1,23
	SCLAV_4753	Taurine catabolism dioxygenase TauD/TfdA	-1,59	-0,14	0,12	3,32E-05	7,10E-01	7,82E-01	0,33	0,91	1,08
	SCLAV_4754	Transcriptional regulator	-0,77	-0,26	0,08	4,04E-01	7,74E-01	9,37E-01	0,59	0,83	1,06
	SCLAV_4755	Hypothetical protein	-0,78	-2,93	-2,07	3,89E-01	2,86E-04	5,32E-03	0,58	0,13	0,24
	SCLAV_4756	Polyprenyl synthetase	-0,81	-2,87	-1,75	3,46E-01	2,66E-04	1,46E-02	0,57	0,14	0,30
	SCLAV_4757	Hypothetical protein	-0,94	-3,26	-1,28	2,72E-01	8,29E-05	8,28E-02	0,52	0,10	0,41
	SCLAV_4758	Non-ribosomal peptide synthetase	0,50	-0,11	0,36	5,59E-01	8,93E-01	6,52E-01	1,41	0,93	1,28
Agrupación SMC15											
	SCLAV_4911	Integral membrane sensor protein	-0,39	-0,59	-0,70	4,80E-02	1,67E-03	2,16E-04	0,77	0,67	0,62

	SCLAV_4912	Polyketide hydroxylase	-0,25	-0,21	-0,79	7,41E-01	7,30E-01	1,23E-01	0,84	0,86	0,58
	SCLAV_4913	Putative WhiE I protein	0,33	0,01	-0,71	4,23E-01	9,84E-01	2,83E-02	1,25	1,01	0,61
	SCLAV_4914	Putative WhiE II protein	-0,56	0,07	-0,61	9,66E-02	8,57E-01	4,36E-02	0,68	1,05	0,65
	SCLAV_4915	Putative polyketide beta-ketoacyl synthase 1	0,08	-0,70	-0,52	9,04E-01	8,43E-02	2,11E-01	1,06	0,62	0,70
	SCLAV_4916	Chain length factor	0,20	0,02	-0,80	8,74E-01	9,84E-01	3,56E-01	1,15	1,01	0,57
	SCLAV_4917	Acyl carrier protein	-0,26	-0,53	-0,88	3,80E-01	3,10E-02	4,72E-04	0,84	0,69	0,54
	SCLAV_4918	Polyketide cyclase	-0,13	-0,28	-1,31	9,10E-01	7,41E-01	1,11E-01	0,91	0,83	0,40
	SCLAV_4919	Cyclase II	-0,19	-0,45	-1,22	6,16E-01	1,05E-01	5,28E-05	0,88	0,73	0,43
	SCLAV_4920	O-methyltransferase	0,40	0,53	0,37	2,08E-01	6,20E-02	2,05E-01	1,32	1,45	1,29
	SCLAV_4921	Secreted protein	0,58	0,77	0,34	8,21E-02	1,35E-02	3,01E-01	1,49	1,71	1,26
Agrupación SMC16											
	SCLAV_5142	Putative amino acid transporter	0,37	0,55	0,04	1,78E-01	2,66E-02	9,04E-01	1,29	1,47	1,03
	SCLAV_5143	Hypothetical protein	0,59	0,90	0,75	4,81E-01	1,93E-01	2,84E-01	1,50	1,86	1,68
	SCLAV_5144	Potassium-transporting ATPase A chain	0,46	0,53	0,32	8,03E-03	1,82E-03	4,86E-02	1,37	1,44	1,24
	SCLAV_5145	Potassium-transporting ATPase subunit B	-0,30	-0,28	0,05	1,56E-01	1,45E-01	8,49E-01	0,81	0,82	1,03
	SCLAV_5146	Potassium-transporting ATPase C chain	0,44	0,29	0,44	2,99E-01	4,64E-01	2,41E-01	1,36	1,23	1,36
	SCLAV_5147	MCP methyltransferase, CheR-type	0,25	0,46	0,14	6,65E-01	3,04E-01	7,98E-01	1,19	1,37	1,10
	SCLAV_5148a	Non-ribosomal peptide synthetase	0,59	0,55	0,07	2,76E-01	2,69E-01	9,16E-01	1,51	1,46	1,05
	SCLAV_5148b	Non-ribosomal peptide synthetase	0,28	0,45	0,10	6,89E-01	4,17E-01	8,91E-01	1,22	1,36	1,07
Agrupación SMC17											
	SCLAV_5227	Putative integral membrane transferase	-0,07	-0,29	0,87	7,99E-01	1,05E-01	1,39E-05	0,95	0,82	1,83
	SCLAV_5228	Nucleotide sugar-1-phosphate transferase	-0,11	-0,22	0,89	6,85E-01	2,76E-01	2,71E-05	0,93	0,86	1,86
	SCLAV_5229	Putative glycerol 1-phosphate dehydrogenase	-0,15	-0,40	1,44	7,28E-01	1,75E-01	1,28E-05	0,90	0,76	2,71

SCLAV_5230	Transferase	0,01	-0,29	1,86	9,84E-01	4,88E-01	1,44E-05	1,01	0,82	3,63
SCLAV_5231	ABC transporter integral membrane protein	-0,18	-0,34	0,62	3,12E-01	2,49E-02	1,20E-04	0,88	0,79	1,53
SCLAV_5232	ABC transporter ATP-binding protein	0,10	0,00	0,65	7,17E-01	9,96E-01	5,27E-04	1,07	1,00	1,57
SCLAV_5233	Phytoene synthase	0,50	0,28	1,31	3,26E-01	5,61E-01	2,43E-03	1,41	1,22	2,48
SCLAV_5234	Putative squalene/phytoene synthase	0,69	0,86	1,44	6,28E-02	1,43E-02	1,03E-04	1,61	1,81	2,71
SCLAV_5235	Squalene/phytoene dehydrogenase	-1,39	-2,25	-2,88	1,51E-03	6,14E-06	1,39E-07	0,38	0,21	0,14
SCLAV_5236	Polyprenyl diphosphate synthase	-0,65	-1,63	-1,54	7,26E-02	2,79E-05	3,72E-05	0,64	0,32	0,34
SCLAV_5237	Squalene-hopene cyclase	0,50	0,43	-0,01	3,32E-01	3,79E-01	9,82E-01	1,42	1,35	0,99
SCLAV_5238	Lipoprotein	0,12	-0,62	-0,29	5,53E-01	2,43E-04	5,68E-02	1,09	0,65	0,82
SCLAV_5239	Radical SAM domain protein	-0,21	-0,72	-0,17	5,47E-01	8,24E-03	6,05E-01	0,86	0,61	0,89
SCLAV_5240	Aminotransferase	0,17	0,26	-0,27	7,00E-01	4,89E-01	4,20E-01	1,13	1,20	0,83
SCLAV_5241	Putative transcriptional regulator	-2,35	-1,62	-1,07	7,82E-05	2,46E-03	3,57E-02	0,20	0,32	0,48
SCLAV_5242	Protein tyrosine phosphatase	1,10	1,30	0,47	9,02E-04	1,16E-04	1,21E-01	2,15	2,46	1,39
SCLAV_5243	Alpha-galactosidase	-0,49	-0,39	-0,25	3,78E-02	8,83E-02	2,93E-01	0,71	0,77	0,84
SCLAV_5244a	Secreted peptidase	0,43	0,43	0,86	6,65E-01	6,05E-01	2,51E-01	1,35	1,34	1,81
SCLAV_5244b	Secreted peptidase	1,04	1,18	1,44	1,67E-03	3,48E-04	2,71E-05	2,06	2,27	2,71
SCLAV_5245	Lipolytic enzyme	1,65	1,86	1,22	2,58E-03	6,34E-04	1,53E-02	3,14	3,62	2,33
SCLAV_5246	TetR-family transcriptional regulator	0,54	0,32	1,15	9,13E-02	3,01E-01	2,22E-04	1,45	1,25	2,22
SCLAV_5247	Putative NADP-specific glutamate dehydrogenase	-0,02	0,06	0,52	9,61E-01	8,71E-01	5,95E-02	0,98	1,04	1,43
SCLAV_5248	Zn-dependent hydrolase	0,94	0,60	-0,22	2,08E-02	1,29E-01	6,45E-01	1,92	1,51	0,86
SCLAV_5249	Membrane protein	1,11	-0,03	-0,21	1,20E-02	9,53E-01	6,89E-01	2,16	0,98	0,86
SCLAV_5250	LC7-family protein	0,92	-0,18	-0,59	7,07E-02	7,51E-01	2,31E-01	1,89	0,88	0,67
SCLAV_5251	DUF742 domain-containing protein	0,85	-0,32	0,03	6,66E-02	5,08E-01	9,65E-01	1,80	0,80	1,02
SCLAV_5252	ATP/GTP-binding protein	0,01	-0,64	-0,21	9,82E-01	9,37E-02	6,49E-01	1,01	0,64	0,87

	SCLAV_5253	GAF domain-containing protein	0,72	-0,30	-0,03	3,57E-02	4,01E-01	9,49E-01	1,65	0,81	0,98
	SCLAV_5254	Probable acyl-CoA dehydrogenase	0,07	-0,07	0,06	8,73E-01	8,53E-01	8,77E-01	1,05	0,96	1,04
	SCLAV_5255	L-alanine-DL-glutamate epimerase-like protein	0,29	0,55	0,02	6,62E-01	2,86E-01	9,73E-01	1,23	1,46	1,02
Agrupación de holomicina (SMC18)											
<i>hlmA</i>	SCLAV_5267	Acetyltransferase	3,60	4,01	2,78	1,27E-02	4,34E-03	3,95E-02	12,13	16,12	6,84
<i>hlmB</i>	SCLAV_5268	Acyl-CoA dehydrogenase	2,44	3,01	0,99	6,47E-02	1,62E-02	4,75E-01	5,42	8,03	1,99
<i>hlmC</i>	SCLAV_5269	Thioesterase	3,72	4,49	2,23	4,72E-03	6,43E-04	6,86E-02	13,19	22,44	4,69
<i>hlmD</i>	SCLAV_5270	Glucose-methanol-choline oxidoreductase	3,52	4,08	2,30	6,29E-03	1,34E-03	5,47E-02	11,45	16,92	4,92
<i>hlmE</i>	SCLAV_5271	Non-ribosomal peptide synthetase	4,06	4,80	2,99	3,38E-03	5,13E-04	1,89E-02	16,62	27,79	7,94
<i>hlmF</i>	SCLAV_5272	Cysteine decarboxylase like-protein	4,33	5,17	3,24	1,06E-02	1,96E-03	4,05E-02	20,15	36,11	9,42
<i>hlmG</i>	SCLAV_5273	Globin	4,23	4,87	3,09	2,63E-03	5,09E-04	1,67E-02	18,77	29,15	8,53
<i>hlmH</i>	SCLAV_5274	MFS transporter	3,37	5,10	3,87	1,51E-02	3,10E-04	3,21E-03	10,31	34,35	14,64
<i>hlmI</i>	SCLAV_5275	Thioredoxin disulfide reductase	3,57	5,46	3,84	8,91E-03	1,22E-04	3,01E-03	11,84	44,08	14,28
<i>hlmK</i>	SCLAV_5276	Thioesterase-domain-containing protein	2,05	2,57	1,16	1,49E-01	4,82E-02	4,11E-01	4,14	5,93	2,24
<i>hlmL</i>	SCLAV_5277	Condensation-domain-containing protein	0,82	1,18	1,26	6,94E-02	6,63E-03	3,00E-03	1,77	2,26	2,40
<i>hlmM</i>	SCLAV_5278	LuxR-type regulator	0,88	1,75	1,25	7,32E-02	3,78E-04	5,98E-03	1,84	3,36	2,38
Agrupación SMC19											
	SCLAV_5325	Amidinotransferase	-0,03	-0,76	-1,29	9,72E-01	9,33E-02	3,76E-03	0,98	0,59	0,41
	SCLAV_5326	SecC motif-containing protein	0,17	-0,53	-0,44	7,80E-01	2,18E-01	3,08E-01	1,13	0,69	0,74
	SCLAV_5327	DNA topoisomerase II	-0,31	-1,07	-1,00	3,10E-01	1,86E-04	2,73E-04	0,81	0,48	0,50
	SCLAV_5328	Putative rubrerythrin	0,47	0,47	-0,69	6,88E-01	6,19E-01	4,57E-01	1,38	1,39	0,62
	SCLAV_5329	Putative methyltransferase	-0,13	-1,24	-1,05	8,34E-01	2,70E-03	7,83E-03	0,91	0,42	0,48
	SCLAV_5330	Sulfotransferase domain-containing protein	-0,34	-1,44	-1,46	5,81E-01	2,76E-03	1,90E-03	0,79	0,37	0,36
	SCLAV_5331	Putative Fe-S oxidoreductase	-0,57	-1,70	-1,58	2,68E-01	4,44E-04	6,74E-04	0,67	0,31	0,33

	SCLAV_5332	Putative arylsulphatase	0,05	-0,87	-1,00	9,45E-01	3,80E-02	1,58E-02	1,03	0,55	0,50
	SCLAV_5333	Putative permease of the major facilitator superfamily	0,10	-0,45	-0,51	8,63E-01	2,22E-01	1,60E-01	1,07	0,73	0,70
	SCLAV_5334	Putative StrR-family transcriptional regulator	-0,67	-1,98	-2,01	3,32E-01	1,32E-03	8,72E-04	0,63	0,25	0,25
	SCLAV_5335	Non-ribosomal peptide synthetase	-0,17	-0,85	0,00	7,21E-01	1,15E-02	9,99E-01	0,89	0,55	1,00
	SCLAV_5336	Putative monooxygenase	-0,22	-1,08	-0,83	7,14E-01	1,08E-02	4,42E-02	0,86	0,47	0,56
	SCLAV_5337	Non-ribosomal peptide synthetase	-0,09	-0,64	-0,21	8,46E-01	2,21E-02	5,03E-01	0,94	0,64	0,86
	SCLAV_5338	Putative O-methyltransferase	0,14	-1,15	-0,35	8,33E-01	6,47E-03	4,47E-01	1,10	0,45	0,78
	SCLAV_5339	Putative cytochrome P450	0,08	-0,94	-0,72	9,12E-01	4,10E-02	1,13E-01	1,06	0,52	0,61
	SCLAV_5340	Trm112p domain-containing protein	0,19	-0,27	-0,63	6,84E-01	4,44E-01	5,07E-02	1,14	0,83	0,65
	SCLAV_5341	Hypothetical protein	0,05	0,04	-0,58	9,63E-01	9,59E-01	4,20E-01	1,04	1,03	0,67
	SCLAV_5342	Putative methyltransferase	0,18	-0,78	-1,57	6,95E-01	1,44E-02	1,38E-05	1,13	0,58	0,34
	SCLAV_5343	Condensation domain protein	-0,17	-1,08	-1,80	6,14E-01	1,37E-04	1,70E-07	0,89	0,47	0,29
	SCLAV_5344	Putative membrane protein	0,11	-0,85	-1,50	8,63E-01	3,05E-02	2,45E-04	1,08	0,56	0,35
	SCLAV_5345	SAM-dependent methyltransferase	0,18	-0,91	-1,14	8,31E-01	8,89E-02	2,69E-02	1,13	0,53	0,45
	SCLAV_5346	Glycosyl transferase	0,26	0,25	-1,06	7,14E-01	6,58E-01	2,65E-02	1,19	1,19	0,48
	SCLAV_5347	Hypothetical protein	-0,23	-0,69	-1,24	5,72E-01	2,70E-02	1,67E-04	0,85	0,62	0,42
Agrupación SMC20											
<i>tal</i>	SCLAV_5457	Pal/Tal ammonia lyase	-1,86	-2,23	-2,11	1,75E-05	2,80E-06	1,26E-06	0,28	0,21	0,23
	SCLAV_5463	PKS domain-like acyltransferase	0,44	0,07	-0,13	5,13E-01	9,10E-01	8,54E-01	1,35	1,05	0,91
	SCLAV_5464	Putative ABC transporter, ATP-binding protein	0,41	0,58	0,29	2,23E-01	5,69E-02	3,77E-01	1,33	1,49	1,22
	SCLAV_5465	Hypothetical protein	1,01	0,92	0,42	1,40E-02	2,04E-02	3,16E-01	2,02	1,89	1,33
	SCLAV_5466	Hypothetical protein	1,07	1,29	0,67	7,64E-02	2,33E-02	2,52E-01	2,10	2,44	1,59
	SCLAV_5467	Hypothetical protein	0,89	1,41	1,14	8,85E-02	4,40E-03	1,61E-02	1,85	2,66	2,21
	SCLAV_5468	Hypothetical protein	1,04	0,58	-0,01	3,11E-02	2,24E-01	9,90E-01	2,06	1,50	0,99

	SCLAV_5469	Stress-inducible protein	0,71	0,77	-0,26	7,32E-02	3,75E-02	5,38E-01	1,64	1,71	0,83
	SCLAV_5470	Hypothetical protein	0,50	0,57	0,94	1,84E-01	9,39E-02	5,31E-03	1,41	1,49	1,92
	SCLAV_5471	Hypothetical protein	-0,09	0,13	0,43	9,11E-01	8,23E-01	4,03E-01	0,94	1,09	1,35
	SCLAV_5472	Glycosyl transferase	0,18	-0,25	0,68	7,50E-01	5,65E-01	7,64E-02	1,13	0,84	1,60
	SCLAV_5473	Hypothetical protein	-0,31	-0,45	0,52	5,24E-01	2,64E-01	1,88E-01	0,80	0,73	1,43
	SCLAV_5474	Hypothetical protein	0,68	0,87	1,03	8,61E-02	1,90E-02	4,96E-03	1,60	1,83	2,04
	SCLAV_5475	Hypothetical protein	0,48	0,63	1,02	7,18E-01	5,38E-01	2,88E-01	1,39	1,55	2,03
	SCLAV_5476	SARP-family protein transcriptional regulator	-0,19	-0,40	-0,31	5,56E-01	1,20E-01	2,42E-01	0,87	0,76	0,81
	SCLAV_5477	Hypothetical protein	0,70	0,30	1,07	5,83E-02	4,36E-01	2,18E-03	1,62	1,23	2,09
	SCLAV_5478	Hypothetical protein	1,00	0,66	1,97	6,01E-03	5,43E-02	2,31E-06	2,00	1,59	3,91
	SCLAV_5479	Fis-family transcriptional regulator	1,35	1,25	1,91	1,70E-02	2,07E-02	5,64E-04	2,54	2,38	3,75
	SCLAV_5480	Hypothetical protein	1,75	1,54	2,35	1,18E-03	2,88E-03	2,45E-05	3,37	2,90	5,11
	SCLAV_5481	Protein kinase	1,19	0,78	2,01	1,18E-03	2,16E-02	1,47E-06	2,27	1,72	4,03
	SCLAV_5482	Putative type II restriction-modification system DNA adenine-specific methylase	-0,14	-0,32	-0,50	7,92E-01	4,08E-01	1,57E-01	0,91	0,80	0,70
	SCLAV_5483	2-Hydroxyacid-family dehydrogenase	0,10	-0,27	0,01	8,85E-01	5,90E-01	9,86E-01	1,07	0,83	1,01
	SCLAV_5484	Non-ribosomal peptide synthetase	-0,03	-0,54	-0,96	9,58E-01	8,97E-02	2,30E-03	0,98	0,69	0,51
	SCLAV_5485	Non-ribosomal peptide synthetase	-0,19	-0,47	-0,91	8,12E-01	4,04E-01	7,40E-02	0,88	0,72	0,53
	SCLAV_5486	Cupin family protein	-0,84	-1,20	-1,67	1,10E-01	1,44E-02	7,34E-04	0,56	0,44	0,31
	SCLAV_5487	Thioesterase	-1,48	-2,04	-1,62	2,79E-02	1,99E-03	9,78E-03	0,36	0,24	0,33
	SCLAV_5488	3-Hydroxyisobutyrate dehydrogenase	-0,13	-0,48	-0,87	8,60E-01	3,34E-01	1,12E-01	0,91	0,72	0,55
	SCLAV_5489	Hypothetical protein	-2,99	-3,46	-2,83	2,25E-02	6,35E-03	2,06E-02	0,13	0,09	0,14
	SCLAV_5490	Putative transketolase	-2,14	-2,88	-2,12	2,29E-04	6,13E-06	1,31E-04	0,23	0,14	0,23
ncyP	SCLAV_5491	Cytochrome P450	-2,78	-3,18	-2,37	1,49E-04	2,34E-05	4,52E-04	0,15	0,11	0,19
ncs	SCLAV_5492	Chalcone synthase	-1,55	-2,29	-2,44	1,39E-03	1,42E-05	4,34E-06	0,34	0,20	0,18

	SCLAV_5493	Secreted protein	-0,13	-0,55	-0,55	8,39E-01	2,06E-01	2,02E-01	0,91	0,68	0,68
	SCLAV_5494	Metallo cofactor biosynthesis protein	-1,90	-2,44	-3,43	2,72E-03	1,62E-04	2,03E-06	0,27	0,18	0,09
	SCLAV_5495	Hypothetical protein	-1,74	-1,67	-1,84	1,90E-03	2,04E-03	6,26E-04	0,30	0,31	0,28
	SCLAV_5496	Daunorubicin resistance ABC transporter ATPase subunit	-1,59	-2,37	-2,63	4,68E-04	4,70E-06	6,09E-07	0,33	0,19	0,16
	SCLAV_5497	ABC-2 type transporter	-1,43	-1,56	-1,77	9,18E-04	2,90E-04	4,73E-05	0,37	0,34	0,29
Agrupación SMC21											
	SCLAV_5608	O-demethylpuromycin-O-methyltransferase	-3,06	-3,10	-2,11	1,16E-05	4,58E-06	1,98E-04	0,12	0,12	0,23
	SCLAV_5609	Putative dihydroxyacetone kinase subunit 2	0,18	0,48	-0,29	8,77E-01	5,49E-01	7,56E-01	1,13	1,40	0,82
	SCLAV_5610	Putative dihydroxyacetone kinase subunit 1	-0,83	-1,52	-2,40	1,17E-01	2,55E-03	1,42E-05	0,56	0,35	0,19
	SCLAV_5611	Putative oxidoreductase	0,38	0,48	-0,51	2,18E-01	8,34E-02	5,79E-02	1,30	1,39	0,70
	SCLAV_5612	Putative FAD-dependent oxidoreductase	-0,63	-0,50	-1,12	1,72E-02	4,87E-02	4,74E-05	0,65	0,71	0,46
	SCLAV_5613	Putative FAD-dependent oxidoreductase	-0,16	-0,89	-0,46	8,20E-01	4,39E-02	3,15E-01	0,90	0,54	0,72
	SCLAV_5614	Hybrid NRPS / PKS	-0,05	-0,23	-0,16	9,40E-01	6,39E-01	7,68E-01	0,96	0,85	0,89
	SCLAV_5615	TRAP dicarboxylate transporter	0,23	-0,21	0,36	8,56E-01	8,35E-01	7,29E-01	1,18	0,87	1,28
	SCLAV_5616	ATP/GTP-binding protein	-0,67	0,09	-0,11	4,99E-01	9,25E-01	9,16E-01	0,63	1,07	0,92
	SCLAV_5617	Putative dehydrogenase	-1,01	-0,98	-1,37	1,09E-02	9,69E-03	5,46E-04	0,50	0,51	0,39
	SCLAV_5618	Putative secreted protein	-0,46	0,41	-0,18	5,54E-01	5,49E-01	8,17E-01	0,73	1,32	0,88
	SCLAV_5619	Hypothetical protein	-2,18	-1,79	-1,55	1,57E-04	9,02E-04	2,55E-03	0,22	0,29	0,34
	SCLAV_5620	Serine/threonine protein kinase	-1,68	-1,35	-1,73	2,13E-04	1,44E-03	7,86E-05	0,31	0,39	0,30
	SCLAV_5621	Integral membrane sensor protein	-0,19	-0,26	-0,34	7,10E-01	5,18E-01	3,74E-01	0,88	0,84	0,79
	SCLAV_5622	Chaperone	-1,11	-1,17	-1,96	3,67E-04	1,48E-04	1,74E-07	0,46	0,44	0,26
	SCLAV_5623	SARP-family transcriptional regulator	-2,00	-2,19	-2,26	3,18E-04	8,58E-05	4,20E-05	0,25	0,22	0,21

	SCLAV_5624	Phosphoribosyltransferase	-0,32	0,51	-0,67	7,27E-01	4,63E-01	3,16E-01	0,80	1,43	0,63
	SCLAV_5625	MarR-family Transcriptional regulator	-3,97	-3,61	-1,81	2,52E-04	5,12E-04	5,93E-02	0,06	0,08	0,29
	SCLAV_5626	Hypothetical protein	-3,13	-3,44	-2,45	6,58E-05	1,57E-05	4,94E-04	0,11	0,09	0,18
	SCLAV_5627	Putative calcium binding protein	-5,81	-5,56	-4,05	1,71E-05	1,47E-05	3,81E-04	0,02	0,02	0,06
	SCLAV_5628	DUF574 domain-containing protein	-5,94	-6,14	-5,17	2,67E-05	1,16E-05	5,56E-05	0,02	0,01	0,03
	SCLAV_5629	Putative phosphotransferase	-2,91	-2,82	-2,22	1,61E-05	1,16E-05	1,27E-04	0,13	0,14	0,22
	SCLAV_5630	Hypothetical protein	-5,66	-6,10	-6,42	1,71E-05	4,72E-06	1,21E-06	0,02	0,01	0,01
	SCLAV_5631	Putative tetR-family transcriptional regulator	-3,64	-3,00	-2,47	1,23E-05	4,10E-05	2,70E-04	0,08	0,12	0,18
	SCLAV_5632	Putative acetyltransferase	-1,60	-0,66	-2,05	3,73E-02	4,07E-01	4,58E-03	0,33	0,63	0,24
	SCLAV_5633	Antibiotic biosynthesis monooxygenase	-0,10	-0,51	-0,55	9,20E-01	4,63E-01	4,21E-01	0,93	0,70	0,68
	SCLAV_5634	Putative FAD-dependent oxidoreductase	-1,84	-2,36	-1,62	1,32E-03	6,49E-05	2,35E-03	0,28	0,19	0,33
	SCLAV_5635	Putative dehydrogenase	-2,51	-2,86	-2,95	8,33E-05	1,34E-05	6,46E-06	0,18	0,14	0,13
	SCLAV_5636	Putative cytochrome P450	-2,58	-3,51	-2,43	5,88E-04	1,34E-05	5,88E-04	0,17	0,09	0,19
	SCLAV_5637	LmbU and cloE-like protein	-2,95	-3,38	-2,65	5,41E-05	4,16E-06	3,13E-05	0,13	0,10	0,16
	SCLAV_5638	Putative non-ribosomal peptide synthetase	-0,68	-0,51	-0,77	1,67E-01	2,87E-01	8,26E-02	0,62	0,70	0,59
Agrupación SMC22											
	SCLAV_5670	Pentalenene C13 hydroxylase cytochrome P450	-1,71	-2,52	-1,47	1,65E-04	2,93E-06	4,65E-04	0,31	0,17	0,36
	SCLAV_5671	Terpene synthase metal-binding protein	-1,11	-1,55	-0,36	3,12E-02	2,11E-03	5,15E-01	0,46	0,34	0,78
	SCLAV_5672	Prenyltransferase and squalene oxidase repeat protein	-1,17	-2,10	-1,22	7,18E-03	1,43E-05	3,08E-03	0,44	0,23	0,43
	SCLAV_5673	Hypothetical protein	-1,39	-1,89	-1,06	3,41E-04	8,35E-06	2,54E-03	0,38	0,27	0,48
	SCLAV_5674	Geranylgeranyl diphosphate synthase	-2,35	-3,41	-2,94	2,60E-05	1,12E-06	6,52E-07	0,20	0,09	0,13

Agrupación SMC23											
	SCLAV_5702	Putative siderophore synthetase component	-2,55	-3,61	-1,68	8,63E-03	2,78E-04	6,37E-02	0,17	0,08	0,31
	SCLAV_5703	Putative siderophore synthetase component	-1,92	-2,97	-0,82	3,56E-04	3,56E-06	8,98E-02	0,26	0,13	0,57
	SCLAV_5704	Putative siderophore synthetase component	-2,24	-3,59	-1,65	9,78E-04	4,72E-06	7,63E-03	0,21	0,08	0,32
	SCLAV_5705	Putative diaminopimelate decarboxylase	-2,22	-3,67	-1,94	2,47E-03	8,37E-06	4,30E-03	0,22	0,08	0,26
	SCLAV_5706	Hypothetical protein	-0,75	-1,47	-1,44	1,66E-01	3,54E-03	3,23E-03	0,60	0,36	0,37
	SCLAV_5707	Hypothetical protein	-2,90	-1,87	-3,29	2,41E-05	1,66E-03	2,03E-06	0,13	0,27	0,10
	SCLAV_5708	Hypothetical protein	-5,98	-5,68	-6,52	1,42E-05	1,16E-05	1,39E-06	0,02	0,02	0,01
	SCLAV_5709	RimK domain protein ATP-grasp	-1,94	-1,12	-1,91	2,09E-05	3,55E-03	9,21E-06	0,26	0,46	0,27
	SCLAV_5710	Putative secreted protein	-5,47	-4,61	-3,14	1,03E-05	2,19E-05	1,04E-03	0,02	0,04	0,11

Tabla 7.8. Genes reguladores sobreexpresados y subexpresados en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ en relación a *S. clavuligerus* ATCC 27064. Los genes no reguladores se indican con un asterisco (*). Ver la leyenda de la tabla 7.2.

SCLAV ⁽²⁾	Producto ⁽³⁾	M _c			p BH			Cambio de expresión ⁽⁴⁾		
		22,5 h	46,5 h	60 h	22,5 h	46,5 h	60 h	22,5 h	46,5 h	60 h
SCLAV_0064	AraC-family transcriptional regulator	1,22	1,67	2,22	1,69E-02	1,05E-03	3,31E-05	2,32	3,17	4,65
SCLAV_0412	Putative AfsR-like transcriptional regulator	1,62	1,11	1,18	1,08E-03	1,63E-02	8,66E-03	3,07	2,16	2,27
SCLAV_0871	Two-component system response regulator	1,12	1,20	1,31	2,37E-02	1,14E-02	4,87E-03	2,17	2,30	2,49
SCLAV_0918	TetR-family transcriptional regulator	1,78	1,89	1,33	5,35E-04	2,04E-04	4,34E-03	3,43	3,71	2,51
SCLAV_0942	Two-component system response regulator	1,44	2,08	1,38	1,19E-03	1,50E-05	9,36E-04	2,70	4,23	2,61
SCLAV_2377	ECF-subfamily RNA polymerase sigma factor	2,42	1,91	1,76	1,80E-05	1,43E-04	2,61E-04	5,36	3,77	3,39

SCLAV_2378	Lipoprotein CseA	1,30	0,83	1,23	1,55E-05	1,08E-03	8,98E-06	2,46	1,77	2,35
SCLAV_2379	Transcriptional regulatory protein CseB	1,34	1,08	1,71	1,35E-03	6,52E-03	5,56E-05	2,54	2,11	3,26
SCLAV_2380*	Sensor protein	1,60	1,22	2,19	6,07E-04	5,17E-03	9,20E-06	3,04	2,33	4,56
SCLAV_2989	Transcriptional regulator	1,44	1,81	1,38	6,96E-05	4,70E-06	5,75E-05	2,71	3,50	2,60
SCLAV_3934*	Alkyl hydroperoxide reductase AhpD	0,61	1,24	3,66	3,34E-01	2,15E-02	2,27E-07	1,53	2,37	12,63
SCLAV_3935*	Alkyl hydroperoxide reductase	0,57	1,27	3,90	3,35E-01	1,29E-02	3,82E-08	1,49	2,41	14,89
SCLAV_3936	Putative LysR-family transcriptional regulator	1,11	1,48	2,06	1,47E-02	1,09E-03	2,09E-05	2,16	2,79	4,17
SCLAV_4082	RNA polymerase sigma factor RpoE	1,23	1,64	0,66	2,61E-03	1,06E-04	8,26E-02	2,35	3,11	1,58
SCLAV_4083	Putative anti-sigma factor	1,06	1,30	0,29	4,63E-03	5,29E-04	4,56E-01	2,08	2,46	1,22
SCLAV_4432	LuxR-family transcriptional regulator	1,10	1,01	2,40	5,05E-03	7,17E-03	4,63E-07	2,15	2,02	5,28
SCLAV_4650	AraC-family transcriptional regulator	2,43	2,73	2,26	2,44E-04	4,53E-05	2,88E-04	5,38	6,66	4,77
SCLAV_4932	GntR-family transcriptional regulator	1,75	1,44	1,52	3,38E-04	1,71E-03	7,54E-04	3,36	2,72	2,88
SCLAV_5063	Putative transcriptional repressor ButR	1,37	1,45	1,55	3,37E-03	1,56E-03	6,03E-04	2,59	2,73	2,93
SCLAV_5322	Putative transcriptional regulator	1,36	1,64	1,25	1,88E-02	9,28E-04	7,15E-03	2,57	3,11	2,38
SCLAV_5400	AraC-family transcriptional regulator	1,31	1,67	1,94	3,62E-03	2,53E-04	3,10E-05	2,47	3,18	3,85
Subexpresados										
SCLAV_0180	LacI-family transcriptional regulator	-1,09	-1,19	-1,30	1,67E-04	4,40E-05	1,14E-05	0,47	0,44	0,41
SCLAV_0691	RNA polymerase sigma factor	-1,35	-1,62	-1,21	2,66E-03	3,19E-04	3,78E-03	0,39	0,32	0,43
SCLAV_1314	TetR-family transcriptional regulator	-1,34	-1,58	-1,64	8,78E-04	1,09E-04	4,71E-05	0,40	0,34	0,32
SCLAV_1910	Sigma-70	-1,05	-1,23	-1,19	5,84E-03	1,17E-03	1,15E-03	0,48	0,43	0,44
SCLAV_2257	Two-component system response regulator	-1,40	-1,45	-1,59	4,74E-03	5,55E-03	8,80E-04	0,38	0,37	0,33
SCLAV_2453	Regulatory protein	-1,22	-1,54	-2,23	2,04E-04	1,05E-05	4,85E-08	0,43	0,34	0,21
SCLAV_2573	WhiB-family transcriptional regulator	-2,74	-3,47	-4,47	6,05E-04	3,12E-05	9,92E-07	0,15	0,09	0,05
SCLAV_2634	XRE-family transcriptional regulator	-1,14	-1,20	-1,69	7,83E-03	4,00E-03	1,05E-04	0,45	0,44	0,31
SCLAV_2721	GntR-family transcriptional regulator	-1,06	-1,26	-1,19	2,71E-03	3,78E-04	5,06E-04	0,48	0,42	0,44
SCLAV_2833	Putative serine/threonine kinase anti-sigma factor	-1,16	-1,70	-2,54	4,77E-02	2,92E-03	3,22E-05	0,45	0,31	0,17
SCLAV_3047	Predicted transcriptional regulator	-1,43	-2,74	-2,45	2,53E-02	5,41E-05	1,40E-04	0,37	0,15	0,18
SCLAV_3146	TetR-family transcriptional regulator	-1,04	-1,20	-1,55	5,19E-03	1,16E-03	5,07E-05	0,49	0,44	0,34
SCLAV_3220	Phosphate transport system regulator	-1,53	-1,62	-2,36	6,44E-04	2,59E-04	2,24E-06	0,35	0,32	0,19
SCLAV_3243	XRE-family transcriptional regulator	-1,28	-1,42	-1,33	1,67E-03	4,45E-04	6,31E-04	0,41	0,37	0,40
SCLAV_3410	TetR-family transcriptional regulator	-1,65	-2,36	-2,03	8,41E-03	2,39E-04	7,91E-04	0,32	0,20	0,24

SCLAV_3422	Transcriptional regulator	-1,80	-2,65	-3,79	3,07E-02	1,37E-03	2,01E-05	0,29	0,16	0,07
SCLAV_3814	ECF-subfamily RNA polymerase sigma factor	-1,27	-1,08	-1,71	5,63E-03	1,38E-02	1,94E-04	0,41	0,47	0,31
SCLAV_3855	MarR-family transcriptional regulator	-1,04	-1,05	-1,48	3,07E-02	2,20E-02	1,38E-03	0,49	0,48	0,36
SCLAV_3919	Putative two-component system sensor kinase	-1,14	-1,60	-1,64	1,18E-02	4,77E-04	2,62E-04	0,45	0,33	0,32
SCLAV_3920	Putative two-component system response regulator	-1,35	-1,82	-1,83	5,85E-03	2,79E-04	1,89E-04	0,39	0,28	0,28
SCLAV_3950	WhiB-family transcriptional regulator	-1,67	-2,45	-2,73	1,70E-02	5,46E-04	1,24E-04	0,31	0,18	0,15
SCLAV_4074b	TetR-family transcriptional regulator	-1,45	-1,98	-3,21	1,43E-03	3,53E-05	4,74E-08	0,37	0,25	0,11
SCLAV_4510	AsnC-family transcriptional regulator	-1,08	-1,33	-2,55	3,26E-04	2,25E-05	2,15E-09	0,47	0,40	0,17
SCLAV_4720	Putative regulatory protein	-1,00	-1,60	-1,58	3,06E-02	6,13E-04	5,02E-04	0,50	0,33	0,33
SCLAV_4929	Regulatory protein	-1,71	-1,98	-3,90	7,07E-03	1,64E-03	1,49E-06	0,30	0,25	0,07
SCLAV_5308	Transcription factor jumonji jmjC domain protein	-2,62	-2,89	-2,86	8,21E-06	2,34E-06	4,44E-07	0,16	0,13	0,14
SCLAV_5521	Predicted transcriptional regulator	-4,18	-4,66	-4,54	7,78E-05	1,58E-05	1,43E-05	0,06	0,04	0,04
SCLAV_5537	LysR-family transcriptional regulator	-2,57	-2,29	-2,12	2,21E-04	5,55E-04	8,85E-04	0,17	0,20	0,23
SCLAV_5572	TetR-family transcriptional regulator	-1,16	-1,36	-1,37	8,56E-03	1,85E-03	1,26E-03	0,45	0,39	0,39
SCLAV_5602	Putative transcriptional activator srcap-like protein	-3,88	-4,12	-1,54	1,23E-05	3,97E-06	2,35E-02	0,07	0,06	0,34
SCLAV_5669	AsnC-family transcriptional regulator	-2,29	-2,05	-1,57	1,01E-05	1,12E-05	1,67E-04	0,20	0,24	0,34
SCLAV_5681	Putative transcriptional regulator	-1,05	-1,60	-1,74	4,18E-02	1,60E-03	5,47E-04	0,48	0,33	0,30
SCLAV_5692	LysR-family transcriptional regulator	-2,10	-2,40	-1,41	7,79E-04	1,30E-04	1,21E-02	0,23	0,19	0,38
SCLAV_5693	Putative regulator	-1,50	-2,09	-1,41	8,87E-04	1,64E-05	8,75E-04	0,35	0,23	0,38

Tabla 7.9. Ortólogos del regulón SigR de *S. coelicolor* cuya expresión se ve modificada en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ en relación a *S. clavuligerus* ATCC 27064. (1) Clasificación según Kim y col. (2012) de las 14 categorías (Cat.) en las que se agrupan los genes del regulón SigR: 1) homeostasis del tior; 2) metabolismo del azufre; 3) modulación de ribosomas y/o traducción; 4) metabolismo del nucleótido guanina; 5) degradación de proteínas; 6) reguladores transcripcionales o proteínas de unión a ADN; 7) transportadores o proteínas integrales de membrana; 8) oxidorreductasas; 9) metabolismo energético; 10) reparación el daño a ADN y recombinación; 11) metabolismo de cofactores; 12) metabolismo de lípidos; 13) otros; 14) funciones no predichas. (2) y (3) código de los ortólogos de *S. coelicolor* y *S. clavuligerus* según la base de datos StrepDB, respectivamente. Los genes de *S. coelicolor* cuyo promotor presenta sitio de unión para SigR se marcan con un asterisco (*) y los altamente conservados en actinomicetos con (C). (4) Proteína codificada). Cuando corresponde, se indica entre paréntesis la agrupación de metabolitos secundarios a la que pertenece el gen. (5) El cambio de expresión se indica en veces respecto a la cepa control, tomando esta última como valor 1,0.

Cat. ⁽¹⁾	SCO ⁽²⁾	SCLAV ⁽³⁾	Gen	Producto ⁽⁴⁾	M _c			p BH			Cambio de expresión ⁽⁵⁾		
					22,5 h	46,5 h	60 h	22,5 h	46,5 h	60 h	22,5 h	46,5 h	60 h
1	SCO3890* ^C	SCLAV_2898	<i>trxB</i>	Thioredoxin reductase	0,91	0,87	-0,02	6,93E-02	6,84E-02	9,74E-01	1,89	1,82	0,98
1	SCO3889	SCLAV_2899	<i>trxA</i>	Thioredoxin	0,90	1,03	-0,53	9,69E-02	3,97E-02	3,14E-01	1,86	2,05	0,69
1	SCO4204*	SCLAV_3213		Glycosyltransferase	0,51	0,74	-0,66	1,12E-01	1,31E-02	2,19E-02	1,42	1,67	0,63
1	SCO4205	SCLAV_3214		DUF2596 domain-containing protein	-0,30	-0,37	-0,05	3,01E-01	1,46E-01	8,89E-01	0,81	0,77	0,97
1	SCO4967*	SCLAV_3864		LmbE-family protein	0,24	0,64	0,31	4,81E-01	2,04E-02	2,72E-01	1,18	1,56	1,24
1	SCO4968	SCLAV_3865		Hypothetical protein	0,07	0,23	0,66	9,44E-01	7,53E-01	3,12E-01	1,05	1,17	1,58
1	SCO5187* ^C	SCLAV_4051		Putative glutaredoxin-like protein	0,89	1,18	0,76	6,23E-02	9,56E-03	8,80E-02	1,85	2,26	1,69
2	SCO2910	SCLAV_2020		Cysteine synthase	-0,74	-0,15	1,27	1,17E-02	6,50E-01	3,59E-05	0,60	0,90	2,42
2	SCO2911*	SCLAV_2021		ThiS domain-containing protein	-0,82	-0,07	1,59	1,42E-02	8,64E-01	1,18E-05	0,57	0,95	3,02
2	SCO4956* ^C	SCLAV_3848		Peptide methionine sulfoxide reductase	0,29	0,27	-0,87	5,02E-01	4,78E-01	1,00E-02	1,22	1,20	0,55
2	SCO6061*	SCLAV_4869		Oxidoreductase	0,63	0,86	-0,10	8,31E-03	3,60E-04	7,29E-01	1,55	1,82	0,93

3	SCO1513*	SCLAV_0744	<i>relA1</i>	Putative ppGpp synthetase	1,02	1,00	0,78	1,04E-02	8,99E-03	3,46E-02	2,02	2,00	1,72
3	SCO1598*	SCLAV_0823	<i>rplT</i>	50S ribosomal protein L20	0,04	-0,07	0,13	9,32E-01	8,51E-01	7,34E-01	1,03	0,95	1,09
3	SCO1599*	SCLAV_0824	<i>rplM</i>	50S ribosomal protein L35	-0,27	-0,28	-0,09	1,46E-01	1,04E-01	6,71E-01	0,83	0,82	0,94
3	SCO1600*	SCLAV_0825	<i>infC</i>	Translation initiation factor IF-3	-0,27	-0,51	-0,57	5,59E-01	1,70E-01	1,08E-01	0,83	0,70	0,67
3	SCO1758*	SCLAV_0971	<i>engA</i>	GTP-binding protein engA	0,14	0,17	0,65	5,82E-01	4,35E-01	1,30E-03	1,10	1,13	1,57
3	SCO2595*	SCLAV_1763	<i>obgE</i>	GTPase obg	0,30	0,36	0,53	5,33E-01	3,66E-01	1,58E-01	1,23	1,29	1,45
3	SCO5359* ^C	SCLAV_4257	<i>rpmE</i>	50S ribosomal protein L31	1,35	1,41	1,10	9,25E-05	3,97E-05	4,68E-04	2,55	2,66	2,14
3	SCO5360 ^C	SCLAV_4258		Peptide chain release factor 1	0,65	0,74	1,41	1,14E-01	5,42E-02	3,81E-04	1,57	1,67	2,65
3	SCO5361	SCLAV_4259		Methyltransferase	0,82	0,70	1,72	1,86E-01	2,26E-01	2,11E-03	1,76	1,63	3,29
3	SCO5705*	SCLAV_4600		DUF448 domain-containing protein	-0,13	-0,58	-1,38	6,56E-01	7,64E-03	4,22E-07	0,91	0,67	0,38
3	SCO5706	SCLAV_4602	<i>infB2</i>	Translation initiation factor IF-2	0,41	0,23	-0,34	5,41E-02	2,76E-01	7,98E-02	1,33	1,17	0,79
3	SCO5707	SCLAV_4603		DUF503 domain-containing protein	0,23	0,58	0,12	6,68E-01	1,41E-01	8,18E-01	1,17	1,49	1,08
3	SCO5708	SCLAV_4604	<i>rbfA</i>	Ribosome-binding factor A	0,18	0,42	0,54	6,16E-01	1,29E-01	4,03E-02	1,13	1,34	1,46
3	SCO5709	SCLAV_4605	<i>truB</i>	tRNA pseudouridine synthase B	0,44	1,04	0,95	3,08E-01	6,34E-03	9,60E-03	1,36	2,05	1,93
3	SCO5796* ^C	SCLAV_4676		ATP/GTP-binding protein	0,07	0,32	-0,58	8,39E-01	1,27E-01	4,85E-03	1,05	1,25	0,67
4	SCO4770*	SCLAV_3701	<i>guaB2</i>	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	0,64	0,77	0,89	3,87E-02	9,83E-03	2,53E-03	1,56	1,70	1,85
4	SCO4771	SCLAV_3702		Inositol-5-monophosphate dehydrogenase	0,21	0,32	0,54	6,53E-01	3,84E-01	1,14E-01	1,16	1,25	1,45
5	SCO1643	SCLAV_0860		20S proteasome alpha-subunit	-0,14	-0,22	-1,66	7,59E-01	5,39E-01	6,15E-06	0,91	0,86	0,32
5	SCO1644	SCLAV_0861	<i>prcB</i>	20S proteasome beta-subunit	-0,21	-0,49	-1,98	5,92E-01	1,08E-01	3,34E-07	0,86	0,71	0,25

5	SCO1645	SCLAV_0862		Putative endonuclease VII	-0,23	-0,47	-2,68	6,64E-01	2,42E-01	1,65E-07	0,85	0,72	0,16
5	SCO1646	SCLAV_0863		DUF797 domain-containing protein	-0,24	-0,31	-2,47	4,01E-01	2,13E-01	6,11E-10	0,84	0,81	0,18
5	SCO1647	SCLAV_0864		Proteasome component	-0,61	-1,01	-2,28	5,62E-02	1,30E-03	4,85E-08	0,66	0,50	0,21
5	SCO1648*	SCLAV_0865		ATPase	-0,70	-1,10	-2,32	8,12E-03	5,84E-05	1,92E-09	0,62	0,47	0,20
5	SCO2617	SCLAV_1784	<i>clpX</i>	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpX	-0,08	0,05	-0,48	8,73E-01	9,06E-01	1,27E-01	0,95	1,03	0,72
5	SCO2618	SCLAV_1785		ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	-0,30	-0,57	-0,54	4,45E-01	7,76E-02	8,92E-02	0,81	0,68	0,69
5	SCO2619*	SCLAV_1786		ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	0,10	-0,29	-0,36	8,41E-01	3,75E-01	2,49E-01	1,07	0,82	0,78
5	SCO2635*	SCLAV_1809		Aminopeptidase N	0,01	-0,14	0,36	9,88E-01	6,63E-01	2,14E-01	1,00	0,91	1,28
5	SCO2643*	SCLAV_1814a		Aminopeptidase N	-0,43	-0,04	0,96	1,25E-01	9,05E-01	3,70E-04	0,74	0,97	1,95
5	SCO3373* ^C	SCLAV_2385		Clp-family ATP-binding protease	-0,44	-0,70	-2,20	1,07E-01	5,93E-03	8,44E-09	0,74	0,61	0,22
5	SCO5285*	SCLAV_4136		ATP-dependent protease La	2,10	1,80	0,36	4,60E-05	1,78E-04	4,71E-01	4,30	3,49	1,28
6	SCO1425*	SCLAV_0663		AsnC-family transcriptional regulatory protein	-0,03	0,01	-0,17	9,52E-01	9,83E-01	6,49E-01	0,98	1,01	0,89
6	SCO1618*	SCLAV_0838		ABC-type Fe ³⁺ -hydroxamate transport system, extracellular component	0,10	-0,16	-1,42	9,19E-01	8,17E-01	1,18E-02	1,07	0,89	0,37
6	SCO1619*	SCLAV_0839		Regulatory protein	0,05	-0,47	-1,64	9,34E-01	1,69E-01	1,34E-05	1,03	0,72	0,32
6	SCO2539	SCLAV_1710	<i>era</i>	GTP-binding protein Era	0,36	0,42	1,12	2,68E-01	1,40E-01	1,61E-04	1,28	1,34	2,17
6	SCO2538	SCLAV_1714		Hypothetical protein	-0,29	-0,56	0,65	4,78E-01	8,68E-02	4,21E-02	0,82	0,68	1,57
6	SCO3207*	SCLAV_2340		TetR-family transcriptional regulator	0,62	0,77	0,54	1,19E-01	3,60E-02	1,46E-01	1,54	1,71	1,45

6	SCO5216* ^C	SCLAV_4082	<i>rpoE</i>	RNA polymerase sigma factor RpoE	1,23	1,64	0,66	2,61E-03	1,06E-04	8,26E-02	2,35	3,11	1,58
6	SCO5217* ^C	SCLAV_4083		Putative anti-sigma factor	1,06	1,30	0,29	4,63E-03	5,29E-04	4,56E-01	2,08	2,46	1,22
6	SCO5357*	SCLAV_4254	<i>rho</i>	Transcription termination factor Rho	0,11	-0,18	-1,34	7,52E-01	5,10E-01	3,06E-06	1,08	0,89	0,39
6	SCO5552*	SCLAV_4500		IcIR-family transcriptional regulator	-0,43	0,14	1,47	3,93E-01	7,78E-01	5,81E-04	0,74	1,10	2,77
6	SCO5820*	SCLAV_4698	<i>rpoD</i>	RNA polymerase sigma factor	-0,22	-0,87	-1,88	6,16E-01	7,95E-03	1,77E-06	0,86	0,55	0,27
6	SCO6775*	SCLAV_5246		TetR-family transcriptional regulator (SMC17)	0,54	0,32	1,15	9,13E-02	3,01E-01	2,22E-04	1,45	1,25	2,22
7	SCO2124*	SCLAV_1338		Hypothetical protein	0,17	-0,24	-0,97	6,37E-01	4,23E-01	5,83E-04	1,13	0,85	0,51
7	SCO2154*	SCLAV_1370		Integral membrane protein	0,10	0,18	1,85	9,00E-01	7,43E-01	1,91E-04	1,07	1,14	3,61
7	SCO2763*	SCLAV_1921		ABC transporter protein	0,67	0,71	-0,57	4,11E-02	2,20E-02	6,24E-02	1,59	1,64	0,68
7	SCO3083* ^C	SCLAV_2205		Putative integral membrane protein	0,92	0,66	-0,21	3,34E-02	1,12E-01	6,69E-01	1,89	1,58	0,86
7	SCO3206*	SCLAV_2339		Transmembrane efflux protein	0,65	1,27	0,90	9,03E-02	6,78E-04	9,74E-03	1,56	2,42	1,87
8	SCO1142*	SCLAV_0444		Putative oxidoreductase	0,43	0,72	0,05	2,72E-01	3,51E-02	9,20E-01	1,34	1,64	1,03
8	SCO2634* ^C	SCLAV_1808		DsbA oxidoreductase	0,62	0,81	0,09	6,69E-02	1,23E-02	8,22E-01	1,54	1,75	1,07
8	SCO2816* ^C	SCLAV_1975		LuxAB-like protein oxygenase	2,65	2,52	0,88	4,64E-04	5,67E-04	2,14E-01	6,28	5,74	1,84
8	SCO3296* ^C	SCLAV_2793		Putative luciferase-family oxidoreductase	-0,31	-0,40	0,39	5,41E-01	3,42E-01	3,57E-01	0,81	0,76	1,31
8	SCO3295 ^C	SCLAV_2794		Putative NAD P H-dependent FMN reductase	0,40	0,16	0,36	4,36E-01	7,46E-01	4,24E-01	1,32	1,12	1,29
8	SCO4833	SCLAV_3743		Transferase	-0,28	0,28	-3,38	8,44E-01	7,98E-01	3,85E-04	0,82	1,22	0,10
8	SCO4835*	SCLAV_3744		Alkylhydroperoxidase AhpD core	-1,13	-0,68	0,55	7,27E-03	9,18E-02	1,70E-01	0,46	0,62	1,47
8	SCO6551*	SCLAV_5103		Oxidoreductase	-0,41	-0,77	0,54	3,55E-01	3,72E-02	1,48E-01	0,76	0,59	1,45

8	SCO0882*	SCLAV_5455		Hypothetical protein	1,62	1,26	0,92	2,03E-02	5,90E-02	1,74E-01	3,08	2,40	1,89
9	SCO1936*	SCLAV_1134	<i>tal</i>	Transaldolase 2	0,21	0,16	0,92	4,66E-01	5,37E-01	1,39E-04	1,15	1,11	1,89
9	SCO1937	SCLAV_1135		Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	0,15	0,13	0,64	5,83E-01	5,82E-01	2,71E-03	1,11	1,10	1,56
9	SCO1938	SCLAV_1136	<i>opcA</i>	Oxppcycle protein	0,15	0,12	0,88	5,93E-01	6,17E-01	1,28E-04	1,11	1,09	1,84
9	SCO1939	SCLAV_1137	<i>pgl</i>	6-Phosphogluconolactonase	0,68	0,48	0,83	1,77E-01	3,27E-01	6,34E-02	1,60	1,39	1,78
9	SCO5042*	SCLAV_3946		Fumarate hydratase	0,78	1,36	0,31	5,41E-02	7,42E-04	4,67E-01	1,72	2,56	1,24
10	SCO1958*	SCLAV_1159		UvrABC system protein A	1,85	1,93	1,39	6,33E-05	2,83E-05	7,29E-04	3,61	3,80	2,62
10	SCO4797*	SCLAV_3721		Putative ATP-dependent DNA helicase	0,48	0,39	0,21	7,32E-02	1,33E-01	4,51E-01	1,40	1,31	1,16
10	SCO5188*	SCLAV_4052		ATP-dependent DNA helicase	-0,24	0,02	0,01	1,45E-01	9,37E-01	9,71E-01	0,84	1,01	1,01
10	SCO5754*	SCLAV_4643		Putative competence-damage inducible protein	0,19	0,21	0,58	6,18E-01	5,29E-01	4,37E-02	1,14	1,15	1,49
11	SCO4419*	SCLAV_0944		Pyridoxamine 5'-phosphate oxidase family protein	0,40	0,87	-0,61	2,00E-01	2,56E-03	2,53E-02	1,32	1,82	0,66
11	SCO1919	SCLAV_1116		DUF59 domain-containing protein	0,45	0,96	0,92	2,65E-01	7,50E-03	8,42E-03	1,37	1,95	1,89
11	SCO1920*	SCLAV_1117		SUF system FeS assembly protein	0,15	0,42	0,80	6,10E-01	5,26E-02	3,27E-04	1,11	1,33	1,74
11	SCO1996	SCLAV_1183		Dephospho-CoA kinase	0,66	0,74	-0,27	1,02E-01	5,13E-02	5,69E-01	1,58	1,66	0,83
11	SCO1997* ^C	SCLAV_1184		ATP-grasp superfamily enzyme	1,32	1,31	-0,36	9,17E-03	7,67E-03	5,19E-01	2,50	2,47	0,78
11	SCO2161* ^C	SCLAV_1377		Iron-sulfur cluster assembly accessory protein	0,16	-0,05	-0,56	4,64E-01	8,31E-01	1,91E-03	1,12	0,97	0,68
11	SCO2162*	SCLAV_1378		Quinolinate synthetase A	-0,17	-0,02	0,75	7,44E-01	9,63E-01	3,08E-02	0,89	0,99	1,68
11	SCO2194*	SCLAV_1411	<i>lipA</i>	Lipoyl synthase	0,27	1,08	1,09	5,72E-01	3,99E-03	2,87E-03	1,21	2,11	2,13
11	SCO3403*	SCLAV_2412		GTP cyclohydrolase I	0,44	0,73	1,29	2,03E-01	2,06E-02	1,14E-04	1,36	1,66	2,44
11	SCO4418	SCLAV_3455	<i>pdxH</i>	Putative pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	0,25	-0,52	0,64	7,12E-01	2,52E-01	1,37E-01	1,19	0,70	1,56

11	SCO5178*	SCLAV_4041		UBA/THIF-type NAD/FAD binding protein	-0,11	0,30	1,17	7,18E-01	1,74E-01	4,58E-06	0,93	1,23	2,25
11	SCO6423*	SCLAV_5043		Putative lipoate-protein ligase	0,83	0,93	1,50	1,36E-02	4,43E-03	2,38E-05	1,77	1,90	2,82
12	SCO1085*	SCLAV_0294		Putative acyltransferase	1,14	0,92	0,95	9,00E-04	4,46E-03	2,61E-03	2,20	1,89	1,93
12	SCO3091*	SCLAV_2209		Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	0,55	0,84	1,11	3,67E-02	1,28E-03	4,69E-05	1,46	1,79	2,15
12	SCO6759*	SCLAV_5233	<i>hopE</i>	Phytoene synthase (SMC17)	0,50	0,28	1,31	3,26E-01	5,61E-01	2,43E-03	1,41	1,22	2,48
12	SCO6760	SCLAV_5234	<i>hopD</i>	Putative squalene/phytoene synthase (SMC17)	0,69	0,86	1,44	6,28E-02	1,43E-02	1,03E-04	1,61	1,81	2,71
12	SCO6762	SCLAV_5235	<i>hopC</i>	Squalene/phytoene dehydrogenase (SMC17)	-1,39	-2,25	-2,88	1,51E-03	6,14E-06	1,39E-07	0,38	0,21	0,14
12	SCO6763	SCLAV_5236	<i>hopB</i>	Polyprenyl diphosphate synthase (SMC17)	-0,65	-1,63	-1,54	7,26E-02	2,79E-05	3,72E-05	0,64	0,32	0,34
12	SCO6764	SCLAV_5237	<i>hopA</i>	Squalene-hopene cyclase (SMC17)	0,50	0,43	-0,01	3,32E-01	3,79E-01	9,82E-01	1,42	1,35	0,99
12	SCO6766	SCLAV_5239		Radical SAM domain protein (SMC17)	-0,21	-0,72	-0,17	5,47E-01	8,24E-03	6,05E-01	0,86	0,61	0,89
12	SCO6769	SCLAV_5240		Aminotransferase (SMC17)	0,17	0,26	-0,27	7,00E-01	4,89E-01	4,20E-01	1,13	1,20	0,83
12	SCO6770	SCLAV_5241		Putative transcriptional regulator (SMC17)	-2,35	-1,62	-1,07	7,82E-05	2,46E-03	3,57E-02	0,20	0,32	0,48
13	SCO3162*	SCLAV_2296		Putative esterase (SMC7)	0,38	0,83	0,86	3,96E-01	2,51E-02	1,72E-02	1,30	1,77	1,81
13	SCO4561*	SCLAV_3563		NLP/P60 family protein	-0,27	0,17	1,00	7,69E-01	8,20E-01	1,08E-01	0,83	1,13	2,00
14	SCO1426*	SCLAV_0664		Hypothetical protein	-0,93	-1,22	-1,48	2,25E-02	2,31E-03	2,69E-04	0,52	0,43	0,36
14	SCO2642*	SCLAV_1813		DUF1203 domain-containing protein	0,18	0,00	0,59	8,37E-01	9,97E-01	3,12E-01	1,13	1,00	1,51
14	SCO3187* ^C	SCLAV_2324		Regulatory protein, FmdB-family	0,77	0,74	1,41	4,78E-03	4,91E-03	4,04E-06	1,71	1,67	2,65
14	SCO3509*	SCLAV_2514		Transporter	0,15	0,30	0,32	7,65E-01	4,22E-01	3,89E-01	1,11	1,23	1,25
14	SCO4039*	SCLAV_3037		Hypothetical protein	-0,92	-1,26	-1,17	2,04E-02	1,43E-03	2,17E-03	0,53	0,42	0,45

14	SCO4203*	SCLAV_3212		Hypothetical protein	0,39	0,54	0,93	1,74E-01	4,01E-02	5,71E-04	1,31	1,45	1,91
14	SCO4966*	SCLAV_3863		Hypothetical protein	0,30	0,42	0,91	5,07E-01	2,60E-01	9,14E-03	1,23	1,34	1,88
14	SCO5163*	SCLAV_4021		Hypothetical protein	1,22	0,97	0,93	6,49E-03	2,28E-02	2,49E-02	2,33	1,96	1,91
14	SCO5284*	SCLAV_4135		Spermidine synthase-like protein	0,07	0,62	0,97	9,12E-01	8,87E-02	6,43E-03	1,05	1,54	1,96
14	SCO5545*	SCLAV_4496		Hypothetical protein	0,85	1,01	2,80	4,26E-03	6,57E-04	8,60E-10	1,81	2,02	6,97
14	SCO5865	SCLAV_4785		Hypothetical protein	0,02	0,03	-1,06	9,75E-01	9,27E-01	5,97E-04	1,01	1,02	0,48
14	SCO5864*	SCLAV_4786		Hypothetical protein	0,34	0,37	-0,45	2,89E-01	1,98E-01	9,88E-02	1,26	1,29	0,73
14	SCO6776*	SCLAV_5248		Zn-dependent hydrolase (SMC17)	0,94	0,60	-0,22	2,08E-02	1,29E-01	6,45E-01	1,92	1,51	0,86

Tabla 7.10. Genes implicados en la diferenciación morfológica cuya expresión se ve modificada en *S. clavuligerus* pSCL4⁻ en relación a *S. clavuligerus* ATCC 27064. Ver la leyenda de la tabla 7.2.

SCLAV ⁽²⁾	Producto ⁽³⁾	M _c			ρ BH			Cambio de expresión ⁽⁴⁾		
		22,5 h	46,5 h	60 h	22,5 h	46,5 h	60 h	22,5 h	46,5 h	60 h
Formación de envoltas celulares										
Sobreexpresados										
SCLAV_0315	UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase	2,67	2,31	1,54	2,31E-05	6,90E-05	3,07E-03	6,35	4,97	2,91
SCLAV_0316	Putative N-acetyl-glucosamine transferase	2,04	2,11	2,51	5,47E-04	2,73E-04	2,68E-05	4,11	4,33	5,71
SCLAV_0874	Transferase	1,03	1,10	2,26	1,43E-02	6,49E-03	2,50E-06	2,04	2,15	4,80
SCLAV_1824	MscS mechanosensitive ion channel	1,48	1,77	2,49	5,45E-04	5,57E-05	6,12E-07	2,80	3,41	5,60
SCLAV_3942	Putative penicillin-binding protein	1,87	1,84	2,15	6,71E-04	5,79E-04	8,07E-05	3,67	3,59	4,42
SCLAV_4710	Peptidase	1,69	2,43	3,52	2,02E-03	3,11E-05	1,84E-07	3,22	5,38	11,50
SCLAV_5204	Putative SsgD protein	2,35	2,73	2,60	6,73E-06	1,22E-06	2,42E-07	5,10	6,66	6,04
Subexpresados										
SCLAV_0202	Putative non-hemolytic phospholipase C	-1,33	-1,82	-1,80	1,80E-04	4,70E-06	2,43E-06	0,40	0,28	0,29
SCLAV_2383	Putative penicillin-binding exported protein	-1,47	-2,08	-2,64	1,59E-04	3,80E-06	4,65E-08	0,36	0,24	0,16

SCLAV_3211	NLP/P60-family secreted protein	-1,01	-1,27	-2,01	6,25E-04	3,51E-05	6,71E-08	0,50	0,41	0,25
SCLAV_3779	Lipoprotein	-1,25	-2,00	-2,03	1,05E-03	4,97E-06	2,05E-06	0,42	0,25	0,24
SCLAV_3924	Putative secreted protein	-2,14	-2,99	-2,82	1,94E-03	3,97E-05	5,56E-05	0,23	0,13	0,14
SCLAV_4765	Amino-transferase	-2,76	-3,00	-3,46	2,91E-04	8,20E-05	1,12E-05	0,15	0,12	0,09
SCLAV_4953	AmfT protein	-1,13	-2,11	-0,44	1,30E-01	3,60E-03	5,88E-01	0,46	0,23	0,74
SCLAV_4954	Membrane translocator, AmfB	-0,34	-0,88	-0,25	6,33E-01	1,01E-01	7,01E-01	0,79	0,54	0,84
SCLAV_4955	Membrane translocator, AmfA	-0,66	-1,56	0,33	1,70E-01	7,37E-04	5,04E-01	0,63	0,34	1,26
SCLAV_4956	Transcriptional regulator, AmfR	-0,81	-1,28	-1,13	9,28E-02	4,92E-03	9,98E-03	0,57	0,41	0,46
SCLAV_5096	Putative SsgD protein	-1,36	-1,23	-1,13	1,93E-03	3,34E-03	5,42E-03	0,39	0,43	0,46
SCLAV_5177	Secreted protein	-3,40	-4,31	-6,18	1,40E-03	8,34E-05	7,24E-07	0,10	0,05	0,01
SCLAV_5178	Hypothetical protein	-2,97	-3,71	-5,62	3,26E-03	2,71E-04	1,46E-06	0,13	0,08	0,02
SCLAV_5179	Putative secreted protein	-2,59	-3,68	-4,77	1,26E-03	2,05E-05	5,48E-07	0,17	0,08	0,04
SCLAV_5180	Putative secreted protein	-2,31	-2,80	-2,98	5,33E-04	4,34E-05	1,48E-05	0,20	0,14	0,13
SCLAV_5181	Putative ABC transporter ATP-binding protein	-2,54	-2,57	-2,70	8,28E-05	5,17E-05	2,01E-05	0,17	0,17	0,15
SCLAV_5182	Putative YrbE-family protein	-2,12	-2,65	-1,54	1,13E-02	1,38E-03	4,84E-02	0,23	0,16	0,34
SCLAV_5183	ABC-transporter integral membrane protein	-2,25	-2,84	-2,59	6,82E-04	3,71E-05	7,47E-05	0,21	0,14	0,17
SCLAV_5184	Secreted protein	-2,44	-3,07	-2,14	3,79E-05	3,46E-06	7,95E-05	0,18	0,12	0,23
SCLAV_5185	Putative Mce-family protein	-2,64	-3,32	-3,47	6,18E-04	3,42E-05	1,43E-05	0,16	0,10	0,09
SCLAV_5186	Secreted protein	-2,12	-2,76	-2,35	3,32E-04	1,20E-05	5,20E-05	0,23	0,15	0,20
SCLAV_5187	Secreted protein	-2,60	-3,05	-3,04	5,48E-05	1,57E-05	3,96E-06	0,17	0,12	0,12
SCLAV_5188	Secreted protein	-2,36	-2,82	-2,70	5,22E-04	5,08E-05	6,08E-05	0,20	0,14	0,15
SCLAV_5189	Putative Mce-family protein	-2,36	-3,11	-2,95	2,32E-04	7,51E-06	8,87E-06	0,19	0,12	0,13
SCLAV_5190	Hypothetical protein	-0,90	-0,96	-1,20	1,10E-01	6,74E-02	1,81E-02	0,54	0,52	0,43
SCLAV_5191	Putative membrane protein	-0,56	-0,54	-0,81	3,70E-01	3,35E-01	1,21E-01	0,68	0,69	0,57
SCLAV_5192	Putative membrane protein	-2,75	-3,45	-3,55	1,51E-04	8,68E-06	3,75E-06	0,15	0,09	0,09
SCLAV_5193	Putative integral membrane protein	-2,51	-3,07	-3,42	1,86E-04	1,35E-05	2,43E-06	0,18	0,12	0,09
SCLAV_5498	ErfK/YbIS/YcfS/YnhG protein	-3,41	-2,86	-2,13	1,33E-05	4,17E-05	7,79E-04	0,09	0,14	0,23
SCLAV_5499	Transpeptidase	-2,89	-2,45	-1,97	5,30E-06	6,77E-06	5,27E-05	0,13	0,18	0,26
SCLAV_5548	Putative hydrolytic protein	-6,79	-7,97	-6,75	2,32E-05	3,87E-06	1,01E-05	0,01	0,00	0,01
SCLAV_5645	UDP-glucose/GDP-mannose family dehydrogenase, putative secreted protein	-1,28	-1,83	-1,26	3,74E-03	7,50E-05	2,45E-03	0,41	0,28	0,42
SCLAV_5682	Amidase	-4,21	-4,43	-3,83	2,63E-05	9,58E-06	3,40E-05	0,05	0,05	0,07

SCLAV_5683	Hypothetical protein	-2,49	-2,11	-1,75	7,59E-05	3,29E-04	1,57E-03	0,18	0,23	0,30
Ciclo celular, división celular y segregación de cromosomas										
Subexpresados										
SCLAV_4356	Cell division-related protein	-1,37	-1,84	-1,96	1,05E-04	5,03E-06	6,77E-07	0,39	0,28	0,26
SCLAV_5519	Putative sporulation-control protein	-6,81	-6,86	-6,59	2,53E-05	1,44E-05	1,56E-05	0,01	0,01	0,01

Tabla 7.11. Datos de expresión obtenidos a las 46,5 horas de cultivo en medio SA para cada gen analizado en los experimentos de micromatrices (M_c) y de RT-qPCR ($\log_2 2^{-\Delta\Delta Ct}$) en la comparación de *S. clavuligerus* pSCL4⁻ respecto a *S. clavuligerus* ATCC 27064. En la columna de producto codificado se indica la agrupación de metabolitos secundarios a la que pertenece el gen.

Gen	Producto	M_c	$\log_2 2^{-\Delta\Delta Ct}$
SCLAV_0014	Modular polyketide synthase (in SMC1)	5,58	7,48
SCLAV_0785	Methionine import ATP-binding protein metN	5,01	6,54
SCLAV_3410	TetR-family transcriptional regulator	-2,36	-1,23
SCLAV_4035	ABC transporter solute-binding protein	3,83	5,32
SCLAV_4183	OppA2, oligopeptide permease (in SMC10)	-1,67	-1,07
SCLAV_4199	PcbC, isopenicillin N synthetase (in SMC11)	-1,84	-0,99
SCLAV_4464	LuxR-family transcriptional regulator (in SMC13)	-2,35	-2,59
SCLAV_4484	Methylmalonyl-CoA decarboxylase alpha subunit (in SMC13)	2,69	2,86
SCLAV_4650	AraC-family transcriptional regulator	2,73	4,73
SCLAV_4764	Oxidoreductase	-2,96	-2,59
SCLAV_5267	HlmA, acetyltransferase (in SMC18)	4,01	5,91
SCLAV_5308	Transcription factor jumonji jmjC domain protein	-2,89	-2,00
SCLAV_5491	NcyP, cytochrome P450 (in SMC20)	-3,18	-8,60
SCLAV_5580	Chitosanase II	-4,16	-9,33

Tabla 7.12. Agrupaciones génicas de metabolitos secundarios cuya expresión se ve modificada en *S. clavuligerus::pimM* en relación a *S. clavuligerus::pIB139*. Se muestran los valores de expresión génica relativa, M_c ; de probabilidad corregida por Benjamini-Hochberg, p BH; y el de cambio de expresión, en los tres tiempos de cultivo analizados. Un gen estadísticamente significativo ha de cumplir valores de $M_c \leq -1$ o $M_c \geq 1$ y de p BH $\leq 0,1$. (1) Nombre de los genes de la agrupación génica. (2) Código SCLAV del gen según la base de datos StrepDB. (3) Proteína codificada. (4) El cambio de expresión se indica en veces respecto a la cepa control, tomando esta última como valor 1,0.

Gen ⁽¹⁾	SCLAV ⁽²⁾	Producto ⁽³⁾	M_c			p BH			Cambio de expresión ⁽⁴⁾		
			84 h	90 h	96 h	84 h	90 h	96 h	84 h	90 h	96 h
Agrupación del ácido clavulánico (SMC10)											
<i>ceaS2</i>	SCLAV_4197	Carboxyethylarginine synthase 2	2,14	2,13	1,71	3,13E-01	3,94E-01	6,08E-01	4,41	4,39	3,28
<i>bls2</i>	SCLAV_4196	Carboxyethylarginine beta-lactam-synthetase 2	1,99	2,14	1,85	3,14E-01	3,37E-01	4,61E-01	3,96	4,42	3,61
<i>pah2</i>	SCLAV_4195	Proclavamate amidinohydrolase 2	2,04	1,81	1,63	3,27E-01	4,99E-01	6,36E-01	4,11	3,50	3,09
<i>cas2</i>	SCLAV_4194	Clavamate synthase 2	2,16	1,91	1,74	3,72E-01	5,54E-01	6,82E-01	4,45	3,76	3,35
<i>oat2</i>	SCLAV_4193	Glutamate N-acetyltransferase 2	1,28	1,09	0,59	3,13E-01	5,08E-01	9,40E-01	2,42	2,12	1,50
<i>oppA1</i>	SCLAV_4192	ABC-type dipeptide transport system	2,64	2,87	2,69	4,10E-01	4,37E-01	5,35E-01	6,25	7,33	6,46
<i>claR</i>	SCLAV_4191	Transcriptional activator	1,61	1,69	1,64	2,76E-02	3,04E-02	4,23E-02	3,05	3,22	3,13
<i>car</i>	SCLAV_4190	Clavaldehyde reductase	0,86	0,88	0,67	6,42E-01	7,43E-01	9,58E-01	1,82	1,84	1,59
<i>cyp</i>	SCLAV_4189	Cytochrome P450-SU2	2,69	2,78	2,55	4,89E-01	6,30E-01	7,21E-01	6,45	6,87	5,84
<i>fd</i>	SCLAV_4188	Ferredoxin	2,60	2,60	2,33	3,51E-01	4,37E-01	5,63E-01	6,06	6,05	5,04
<i>orf12</i>	SCLAV_4187	Beta-lactamase	2,10	2,15	1,98	2,36E-01	2,71E-01	3,68E-01	4,30	4,43	3,94
<i>orf13</i>	SCLAV_4186	Integral membrane protein	1,91	1,88	1,68	4,22E-01	5,27E-01	6,77E-01	3,75	3,69	3,21
<i>orf14</i>	SCLAV_4185	Acetyltransferase GNAT-family protein	2,09	2,40	2,00	1,33E-01	1,06E-01	1,89E-01	4,27	5,29	4,01
<i>oppA2</i>	SCLAV_4183	ABC-type dipeptide transport system	2,88	2,64	2,39	1,13E-01	1,62E-01	2,30E-01	7,37	6,23	5,24
<i>orf16</i>	SCLAV_4182	DUF482 domain-containing protein	3,04	2,61	2,36	8,54E-02	1,60E-01	2,14E-01	8,22	6,11	5,15
<i>gcaS</i>	SCLAV_4181	Biotin carboxylase	2,35	2,28	2,21	1,03E-01	1,36E-01	1,49E-01	5,10	4,84	4,63
<i>pbpA</i>	SCLAV_4180	Penicillin-binding protein PBP	-0,09	-0,45	-0,50	1,00E+00	7,71E-01	8,27E-01	0,94	0,73	0,71
<i>pbp2</i>	SCLAV_4179	Penicillin-binding protein	-0,14	-0,13	-0,29	1,00E+00	1,00E+00	9,58E-01	0,91	0,92	0,82
Agrupación de clavamas (SMC9)											

<i>cvm9</i>	SCLAV_2921	DNA-binding protein	-0,20	-0,15	-0,14	6,49E-01	8,49E-01	1,00E+00	0,87	0,90	0,91
<i>cvm6</i>	SCLAV_2922	Putative pyridoxal phosphate-dependent aminotransferase	-0,05	-0,05	0,35	1,00E+00	1,00E+00	6,77E-01	0,96	0,96	1,27
<i>cvm5</i>	SCLAV_2923	Flavin-dependent oxidoreductase	-0,15	-0,88	-0,40	1,00E+00	9,24E-01	1,00E+00	0,90	0,54	0,76
<i>cvm4</i>	SCLAV_2924	Alpha/beta hydrolase	-0,11	0,06	0,34	9,06E-01	1,00E+00	4,00E-01	0,93	1,04	1,27
<i>cas1</i>	SCLAV_2925	Clavamate synthase 1	0,10	-0,18	0,03	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	1,07	0,89	1,02
<i>cvm1</i>	SCLAV_2926	Aldo/keto reductase	0,44	0,36	0,13	9,53E-01	1,00E+00	1,00E+00	1,36	1,28	1,10
<i>cvm2</i>	SCLAV_2927	Hypothetical protein	0,17	0,21	-0,11	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	1,13	1,16	0,93
<i>cvm3</i>	SCLAV_2928	Flavin reductase-like protein	0,14	0,32	0,32	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	1,10	1,25	1,25
<i>cvm7</i>	SCLAV_2929	Dnrl/RedD/AfsR-family transcriptional regulator	-0,68	-0,78	-0,61	7,07E-01	7,40E-01	9,52E-01	0,62	0,58	0,66
<i>cvm11</i>	SCLAV_2930	Putative translocator	-0,37	-0,49	-0,57	8,86E-01	8,32E-01	8,78E-01	0,77	0,71	0,67
<i>cvm12</i>	SCLAV_2931	Putative transcriptional regulatory protein	0,09	0,35	0,25	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	1,07	1,28	1,19
<i>cvm13</i>	SCLAV_2932	Beta-aspartyl-peptidase	0,39	0,62	0,68	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	1,31	1,54	1,60
<i>cvmH</i>	SCLAV_2933	LanU-like protein	-0,02	0,13	0,04	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	0,98	1,10	1,03
<i>cvmP</i>	SCLAV_2934	Putative protein-arginine deiminase	0,95	1,04	0,74	6,90E-01	7,43E-01	9,72E-01	1,94	2,06	1,67
<i>cvmG</i>	SCLAV_2935	Hypothetical protein	0,13	0,14	-0,06	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	1,10	1,10	0,96
Agrupación paróloga de clavamas (SMCp13)											
<i>orfD</i>	SCLAV_p1069	Dehydratase	0,12	0,13	0,34	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	1,09	1,10	1,27
<i>orfC</i>	SCLAV_p1070	Aminotransferase	0,18	0,17	0,10	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	1,13	1,13	1,07
<i>orfB</i>	SCLAV_p1071	YjgF-family regulator	1,13	1,13	1,37	5,40E-01	6,92E-01	5,86E-01	2,19	2,19	2,58
<i>orfA</i>	SCLAV_p1072	Serine hydroxymethyltransferase	-0,21	0,04	0,09	7,86E-01	1,00E+00	1,00E+00	0,86	1,03	1,07
<i>ceaS1</i>	SCLAV_p1074	Carboxyethylarginine synthase isoenzyme 1	1,06	0,85	0,70	6,95E-01	8,47E-01	1,00E+00	2,08	1,81	1,63
<i>bls1</i>	SCLAV_p1075	Beta-lactam synthetase isoenzyme 1	0,93	0,41	0,55	2,99E-01	8,21E-01	8,04E-01	1,90	1,33	1,46
<i>pah1</i>	SCLAV_p1076	Proclavamate amidinohydrolase 1	0,18	-0,21	0,18	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	1,14	0,87	1,13
<i>oat1</i>	SCLAV_p1077	Probable glutamate N-acetyltransferase 1	0,25	0,42	0,97	9,71E-01	8,31E-01	4,00E-01	1,19	1,34	1,96
<i>cvm6P</i>	SCLAV_p1078	Putative pyridoxal phosphate-dependent aminotransferase	0,58	0,06	0,31	4,41E-01	1,00E+00	9,59E-01	1,50	1,04	1,24
<i>cvm7P</i>	SCLAV_p1079	Putative transcriptional regulator	0,32	-0,20	-0,03	9,97E-01	1,00E+00	1,00E+00	1,25	0,87	0,98

<i>snk</i>	SCLAV_p1080	Two-component system sensor kinase	0,24	0,45	0,32	1,00E+00	9,53E-01	1,00E+00	1,18	1,37	1,25
<i>res1</i>	SCLAV_p1081	Response regulator receiver protein	-0,48	-0,03	-0,23	7,66E-01	1,00E+00	1,00E+00	0,72	0,98	0,85
<i>res2</i>	SCLAV_p1082	Probable response regulator, two-component system	-0,07	-0,62	-0,21	1,00E+00	9,28E-01	1,00E+00	0,95	0,65	0,87
Agrupación SMCp25											
	SCLAV_p1508	Putative carbamoyl transferase	-0,92	-1,50	-1,46	5,63E-01	3,54E-01	4,00E-01	0,53	0,35	0,36
	SCLAV_p1509	Clavamate synthase-like oxygenase	-1,14	-1,77	-1,66	5,25E-01	3,34E-01	4,00E-01	0,45	0,29	0,32
	SCLAV_p1510	Glycosyl transferase, group 1	-1,04	-1,39	-1,26	5,32E-01	4,41E-01	5,63E-01	0,49	0,38	0,42
Agrupación de cefamicina C (SMC11)											
<i>bla</i>	SCLAV_4215	Type I β -lactamase	2,73	2,36	2,23	1,29E-01	1,99E-01	2,68E-01	6,63	5,15	4,69
<i>pbp74</i>	SCLAV_4214	Penicillin-binding protein	0,73	0,96	0,68	8,51E-01	8,02E-01	1,00E+00	1,66	1,95	1,60
<i>cmcT</i>	SCLAV_4213	CmcT protein	0,79	0,96	0,91	1,89E-01	1,52E-01	1,83E-01	1,73	1,95	1,88
<i>pcd</i>	SCLAV_4212	Piperidine carboxylate dehydrogenase	-0,28	-0,06	-0,04	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	0,82	0,96	0,97
<i>cefE</i>	SCLAV_4211	Deacetoxycephalosporin C synthase	2,32	2,13	2,24	3,17E-01	4,52E-01	4,41E-01	4,98	4,36	4,73
<i>cefD</i>	SCLAV_4210	Isopenicillin N epimerase	1,91	1,70	1,58	2,46E-01	3,81E-01	4,54E-01	3,76	3,24	2,98
<i>cmcl</i>	SCLAV_4208	Cephalosporin hydroxylase	2,58	2,69	2,36	1,21E-01	1,26E-01	1,88E-01	5,96	6,46	5,12
<i>cmcJ</i>	SCLAV_4207	Methyltransferase	3,46	3,09	2,72	1,61E-01	2,62E-01	3,92E-01	10,98	8,52	6,58
<i>cefF</i>	SCLAV_4206	Deacetoxycephalosporin C hydroxylase	2,64	2,21	1,95	6,01E-02	1,06E-01	1,75E-01	6,23	4,64	3,87
<i>cmcH</i>	SCLAV_4205	3'-Hydroxymethylcephem-O-carbamoyltransferase	1,70	2,13	1,94	7,23E-02	4,18E-02	6,59E-02	3,25	4,37	3,82
<i>ccaR</i>	SCLAV_4204	Transcriptional regulator	1,27	1,19	1,27	2,86E-01	4,01E-01	3,92E-01	2,41	2,29	2,41
<i>orf10</i>	SCLAV_4203	Secreted protein	1,84	2,17	2,23	8,85E-01	8,63E-01	9,71E-01	3,57	4,51	4,69
<i>blp</i>	SCLAV_4202	Beta-Lactamase Inhibitory Protein-Like Protein	1,71	1,39	1,07	4,47E-01	6,99E-01	8,92E-01	3,27	2,61	2,10
<i>lat</i>	SCLAV_4201	L-lysine-epsilon aminotransferase	2,16	1,66	1,36	3,15E-01	6,27E-01	7,87E-01	4,46	3,15	2,57
<i>pcbAB</i>	SCLAV_4200	ACV synthetase	1,83	1,73	1,40	2,92E-01	4,04E-01	6,08E-01	3,56	3,33	2,64
<i>pcbC</i>	SCLAV_4199	Isopenicillin N synthetase	0,86	1,51	1,66	8,24E-01	6,92E-01	6,64E-01	1,82	2,84	3,15
<i>pcbR</i>	SCLAV_4198	Beta-lactam antibiotic resistance	-1,18	-1,30	-1,41	3,48E-01	3,59E-01	3,45E-01	0,44	0,41	0,38
Agrupación SMC6											
	SCLAV_1942	TetR-family transcriptional regulator	-0,96	-1,00	-0,85	7,26E-01	7,89E-01	9,59E-01	0,51	0,50	0,55

SCLAV_1943	Acetyl/propionyl CoA carboxylase	-1,02	-1,40	-1,46	9,86E-01	9,44E-01	1,00E+00	0,49	0,38	0,36	
SCLAV_1944	Acetyl/propionyl CoA carboxylase alpha subunit	-0,88	-0,92	-0,75	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	0,54	0,53	0,59	
SCLAV_1945	Putative hydroxymethylglutaryl-CoA lyase	-0,83	-1,66	-1,66	1,00E+00	8,52E-01	9,71E-01	0,56	0,32	0,32	
SCLAV_1946	Acyl-CoA dehydrogenase	-1,15	-1,71	-1,79	9,53E-01	8,47E-01	9,59E-01	0,45	0,31	0,29	
SCLAV_1947	Siderophore-interacting protein	0,14	0,31	0,44	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	1,10	1,24	1,35	
SCLAV_1948	Pyridoxal-dependent decarboxylase	1,36	1,66	1,25	2,53E-01	1,91E-01	4,00E-01	2,57	3,15	2,38	
SCLAV_1949	Cadaverine N-monooxygenase	1,13	1,54	1,34	1,41E-01	6,95E-02	1,23E-01	2,19	2,91	2,54	
SCLAV_1950	Acetyltransferase	1,20	1,59	1,14	5,13E-01	4,36E-01	7,45E-01	2,30	3,02	2,21	
SCLAV_1951	Nocardamine synthetase	1,21	1,78	1,51	1,56E-01	6,43E-02	1,22E-01	2,31	3,43	2,85	
SCLAV_1952	Hypothetical protein	0,10	0,29	0,12	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	1,07	1,22	1,09	
SCLAV_1953	Hypothetical protein	0,15	-0,05	-0,13	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	1,11	0,97	0,91	
SCLAV_1954	Hypothetical protein	0,22	0,36	0,16	9,71E-01	8,41E-01	1,00E+00	1,17	1,28	1,12	
SCLAV_1955	L-glutamine-D-fructose-6-phosphate amidotransferase	0,36	0,50	0,19	8,27E-01	7,54E-01	1,00E+00	1,29	1,42	1,14	
Agrupación SMC13											
SCLAV_4460	Putative aminoglycoside 2-N-acetyltransferase	-0,64	-0,37	-0,64	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	0,64	0,77	0,64	
SCLAV_4461	Hypothetical protein	1,04	1,23	0,63	9,97E-01	1,00E+00	1,00E+00	2,05	2,34	1,54	
SCLAV_4462	3-Isopropylmalate dehydrogenase	1,22	0,92	0,23	8,84E-01	1,00E+00	1,00E+00	2,33	1,89	1,17	
SCLAV_4463	Branched-chain-amino-acid aminotransferase	-0,39	-0,23	-0,32	6,15E-01	9,27E-01	9,03E-01	0,76	0,85	0,80	
SCLAV_4464	LuxR-family transcriptional regulator	1,46	1,96	1,98	1,36E-01	6,67E-02	7,70E-02	2,74	3,88	3,94	
SCLAV_4465	Cytochrome P450	1,17	1,73	1,44	4,04E-01	2,13E-01	3,89E-01	2,25	3,32	2,71	
SCLAV_4466	Hybrid NRPS / PKS	1,68	2,11	2,04	2,24E-01	1,62E-01	1,89E-01	3,21	4,31	4,10	
SCLAV_4467	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR	2,32	2,85	2,82	8,84E-02	5,49E-02	6,59E-02	5,01	7,23	7,08	
SCLAV_4468	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR	2,31	2,76	2,76	7,50E-02	4,93E-02	6,42E-02	4,97	6,75	6,79	
SCLAV_4469	Monooxygenase	2,45	2,41	2,51	6,01E-02	6,43E-02	6,80E-02	5,47	5,33	5,70	
SCLAV_4470	Putative secreted lipase	2,30	2,53	2,51	5,90E-02	4,80E-02	6,31E-02	4,91	5,78	5,70	

	SCLAV_4471	Putative membrane protein	2,67	2,67	2,65	5,90E-02	5,83E-02	6,75E-02	6,35	6,35	6,30
	SCLAV_4472	Amidase	1,54	2,23	1,96	3,14E-01	1,70E-01	2,62E-01	2,90	4,69	3,89
	SCLAV_4473	Urease subunit gamma/beta	-0,72	-1,08	-0,99	8,06E-01	7,31E-01	8,49E-01	0,61	0,47	0,50
	SCLAV_4474	Urease subunit alpha 2	-0,60	-0,79	-0,71	8,15E-01	7,64E-01	9,27E-01	0,66	0,58	0,61
	SCLAV_4475	Putative peptidylarginine deiminase	-0,36	-0,76	-0,39	8,83E-01	6,68E-01	1,00E+00	0,78	0,59	0,76
	SCLAV_4476	TetR-family transcriptional regulator	0,49	0,04	-0,22	8,54E-01	1,00E+00	1,00E+00	1,41	1,03	0,86
	SCLAV_4477	Transporter	-0,78	-1,39	-1,23	6,42E-01	3,94E-01	5,33E-01	0,58	0,38	0,43
	SCLAV_4478	Putative 2-isopropylmalate synthase	0,69	0,29	-0,12	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	1,61	1,22	0,92
	SCLAV_4479	YceI-family protein	0,07	0,10	0,11	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	1,05	1,07	1,08
	SCLAV_4480	Pyridoxal-5'-phosphate-dependent protein beta subunit	-0,70	-0,74	-0,65	7,07E-01	7,60E-01	9,33E-01	0,62	0,60	0,64
	SCLAV_4481	YheO domain protein	-0,38	-0,56	-0,37	8,85E-01	7,89E-01	1,00E+00	0,77	0,68	0,78
	SCLAV_4482	Calcium-binding EF-hand-containing protein	-0,20	0,27	0,68	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	0,87	1,21	1,60
	SCLAV_4483	Putative secreted lyase	-0,87	-0,78	-0,65	9,10E-01	9,97E-01	1,00E+00	0,55	0,58	0,64
	SCLAV_4484	Methylmalonyl-CoA decarboxylase alpha subunit	0,01	-0,17	-0,36	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	1,01	0,89	0,78
	SCLAV_4485	Hypothetical protein	-0,44	-0,22	-0,39	9,06E-01	1,00E+00	1,00E+00	0,74	0,86	0,76
	SCLAV_4486	Roadblock/LC7-family protein	-0,30	-0,79	-0,76	6,15E-01	1,60E-01	1,83E-01	0,81	0,58	0,59
Agrupación SMCp5											
	SCLAV_p0509	PAP2-family protein	1,65	1,47	1,34	6,76E-01	8,05E-01	9,58E-01	3,14	2,77	2,53
	SCLAV_p0510	Possible fatty acid hydroxylase	1,64	1,52	1,74	7,35E-01	8,40E-01	9,00E-01	3,13	2,86	3,34
	SCLAV_p0511	Type II PKS	1,95	1,64	1,86	7,25E-01	8,60E-01	9,40E-01	3,86	3,11	3,64
	SCLAV_p0512	Polyketide synthase	1,74	1,83	1,85	7,38E-01	7,99E-01	9,00E-01	3,34	3,56	3,62
	SCLAV_p0513	KR domain family protein	1,98	1,64	1,70	6,15E-01	7,93E-01	8,85E-01	3,95	3,13	3,26
	SCLAV_p0514	3-Oxoacyl-acyl synthase	1,98	2,06	2,06	7,64E-01	8,21E-01	9,39E-01	3,95	4,16	4,18
	SCLAV_p0515	Fatty acid desaturase family protein	1,52	1,58	1,81	8,00E-01	8,40E-01	9,07E-01	2,87	2,98	3,50
	SCLAV_p0516	Peptidyl-Asp metalloproteinase	1,16	1,01	0,88	5,41E-01	7,35E-01	8,78E-01	2,24	2,01	1,84
	SCLAV_p0517	Putative exported lectin-like protein	0,16	1,06	1,24	1,00E+00	7,64E-01	8,04E-01	1,12	2,09	2,37
	SCLAV_p0518	Hypothetical protein	0,14	0,99	1,10	1,00E+00	7,50E-01	8,04E-01	1,10	1,99	2,14
	SCLAV_p0519	Hypothetical protein	1,01	0,99	1,38	8,64E-01	9,27E-01	9,07E-01	2,01	1,99	2,61
	SCLAV_p0520	SGL domain-containing protein	2,07	1,86	1,86	6,03E-01	7,50E-01	8,53E-01	4,19	3,63	3,62

Agrupación SMC14											
	SCLAV_4740	Regulatory protein	0,78	0,92	0,73	5,82E-01	6,51E-01	8,26E-01	1,72	1,89	1,65
	SCLAV_4741	Hypothetical protein	0,02	0,28	0,48	1,00E+00	1,00E+00	9,59E-01	1,02	1,22	1,40
	SCLAV_4742	Non-ribosomal peptide synthase	0,27	0,27	-0,24	9,81E-01	1,00E+00	1,00E+00	1,21	1,20	0,85
	SCLAV_4743	Thioesterase	0,42	-0,05	0,09	8,50E-01	1,00E+00	1,00E+00	1,34	0,97	1,06
	SCLAV_4744	Lipoprotein	0,28	0,36	0,40	9,36E-01	8,96E-01	9,62E-01	1,22	1,28	1,32
	SCLAV_4745	Integral membrane protein	0,49	0,25	0,23	8,59E-01	1,00E+00	1,00E+00	1,41	1,19	1,17
	SCLAV_4746	Hypothetical protein	-0,28	-0,06	-0,17	9,71E-01	1,00E+00	1,00E+00	0,82	0,96	0,89
	SCLAV_4747	Transcriptional regulator	-0,31	-0,63	-0,67	9,97E-01	8,22E-01	9,02E-01	0,81	0,65	0,63
	SCLAV_4748	Putative multidrug resistance protein	0,27	0,10	0,10	9,52E-01	1,00E+00	1,00E+00	1,21	1,07	1,07
	SCLAV_4749	Non-ribosomal peptide synthetase	-0,24	-0,32	-0,41	9,12E-01	8,52E-01	8,72E-01	0,85	0,80	0,75
	SCLAV_4750	Non-ribosomal peptide synthetase	0,76	0,71	0,49	6,42E-01	7,61E-01	1,00E+00	1,69	1,64	1,40
	SCLAV_4751	MbtH domain protein	1,61	1,62	1,40	6,34E-01	7,41E-01	9,00E-01	3,06	3,08	2,64
	SCLAV_4752	SyrP-like protein	1,06	1,28	1,00	8,13E-01	8,03E-01	1,00E+00	2,09	2,43	2,00
	SCLAV_4753	Taurine catabolism dioxygenase TauD/TfdA	0,98	1,08	0,97	7,56E-01	7,89E-01	9,52E-01	1,97	2,12	1,96
	SCLAV_4754	Transcriptional regulator	0,44	-0,10	0,06	9,74E-01	1,00E+00	1,00E+00	1,36	0,93	1,04
	SCLAV_4755	Hypothetical protein	1,47	1,89	1,87	6,41E-01	6,68E-01	7,01E-01	2,77	3,69	3,65
	SCLAV_4756	Polyprenyl synthetase	2,05	1,81	1,87	4,76E-01	6,94E-01	7,30E-01	4,13	3,51	3,65
	SCLAV_4757	Hypothetical protein	1,97	1,77	1,64	5,52E-01	7,31E-01	8,49E-01	3,92	3,41	3,11
	SCLAV_4758	Non-ribosomal peptide synthetase	0,29	0,16	0,30	9,75E-01	1,00E+00	1,00E+00	1,22	1,12	1,24
Agrupación SMC22											
	SCLAV_5670	Pentalenene C13 hydroxylase cytochrome P450	-1,02	-1,15	-1,26	6,79E-01	7,31E-01	7,63E-01	0,49	0,45	0,42
	SCLAV_5671	Terpene synthase metal-binding protein	-0,80	-1,41	-1,46	4,10E-01	1,62E-01	1,58E-01	0,57	0,38	0,36
	SCLAV_5672	Prenyltransferase and squalene oxidase repeat protein	-0,82	-1,58	-1,73	6,15E-01	2,92E-01	2,64E-01	0,57	0,34	0,30
	SCLAV_5673	Hypothetical protein	-1,29	-1,57	-1,61	6,29E-01	6,79E-01	6,92E-01	0,41	0,34	0,33
	SCLAV_5674	Geranylgeranyl diphosphate synthase	-1,18	-1,36	-1,55	6,58E-01	7,27E-01	7,01E-01	0,44	0,39	0,34
Agrupación SMCp6											
	SCLAV_p0563	Two-component system sensor kinase	-1,84	-1,74	-1,87	5,56E-02	6,08E-02	6,42E-02	0,28	0,30	0,27

SCLAV_p0564	Non-ribosomal peptide synthase	-1,80	-3,07	-3,41	3,49E-01	1,38E-01	1,08E-01	0,29	0,12	0,09	
SCLAV_p0565	Probable acyl carrier protein	-1,77	-2,10	-2,50	3,63E-01	3,23E-01	2,43E-01	0,29	0,23	0,18	
SCLAV_p0566	3-Oxoacyl-acyl synthase	-1,29	-2,30	-2,56	4,60E-01	1,85E-01	1,61E-01	0,41	0,20	0,17	
SCLAV_p0567	8-Amino-7-oxononanoate synthase	-1,55	-2,23	-2,54	4,41E-01	2,75E-01	2,30E-01	0,34	0,21	0,17	
SCLAV_p0568	IcIR-family transcriptional regulator	-4,21	-4,64	-4,21	3,50E-02	3,04E-02	5,60E-02	0,05	0,04	0,05	
SCLAV_p0569	Conserved hypothetical protein	0,28	-0,23	-0,38	8,83E-01	9,90E-01	9,27E-01	1,21	0,85	0,77	
SCLAV_p0570	Epoxide hydrolase domain protein	-0,04	-0,40	-0,22	1,00E+00	6,79E-01	9,90E-01	0,97	0,76	0,86	
SCLAV_p0571	Terpene synthase family protein	0,16	-0,31	0,15	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	1,12	0,81	1,11	
SCLAV_p0572	Calcium binding protein	-0,20	-0,06	-0,03	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	0,87	0,96	0,98	
SCLAV_p0573	Cytochrome P450	0,69	0,70	0,58	9,67E-01	1,00E+00	1,00E+00	1,62	1,63	1,49	
SCLAV_p0574	Pentalenene synthase	1,12	0,96	0,97	7,44E-01	8,64E-01	9,79E-01	2,17	1,95	1,96	
SCLAV_p0575	Putative secreted protein	0,66	0,34	0,41	9,59E-01	1,00E+00	1,00E+00	1,58	1,27	1,32	
SCLAV_p0576	Pentalenene C13 hydroxylase	-0,10	0,18	0,63	1,00E+00	1,00E+00	8,91E-01	0,94	1,14	1,54	
SCLAV_p0577	Hypothetical protein	-0,23	-0,41	-0,04	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	0,85	0,75	0,97	
SCLAV_p0578	Putative acetyltransferase	0,44	0,42	0,55	7,30E-01	8,24E-01	8,26E-01	1,36	1,34	1,46	
SCLAV_p0579	Putative S41-family peptidase	1,35	0,97	0,74	1,85E-01	4,38E-01	7,03E-01	2,54	1,96	1,67	
SCLAV_p0580	Putative two-component system response regulator	-0,23	-0,13	-0,44	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	0,85	0,91	0,74	
SCLAV_p0581	Putative two-component system sensor kinase	-0,49	-0,33	-0,03	9,02E-01	1,00E+00	1,00E+00	0,71	0,80	0,98	
SCLAV_p0582	Hypothetical protein	-0,09	-0,12	0,14	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	0,94	0,92	1,10	
SCLAV_p0583	Calcium-binding EF-hand-containing protein	-0,45	0,11	0,26	8,29E-01	1,00E+00	1,00E+00	0,73	1,08	1,20	
SCLAV_p0584	4-Hydroxybenzoate 3-monooxygenase	-0,13	-0,26	-0,31	1,00E+00	8,96E-01	9,47E-01	0,92	0,84	0,81	
SCLAV_p0587	SAM-dependent methyltransferase	-0,52	-0,37	-0,37	7,14E-01	9,24E-01	1,00E+00	0,70	0,77	0,77	
SCLAV_p0588	Hypothetical protein	0,02	-0,15	-0,19	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	1,02	0,90	0,88	
Agrupación de tunicamicina											
SCLAV_4276	Phosphatidylglycerophosphatase B	0,00	0,02	0,16	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	1,00	1,01	1,12	
SCLAV_4277	Polyketide synthase	-0,06	-0,08	-0,06	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	0,96	0,94	0,96	
SCLAV_4278	ABC-2 type transporter	0,10	-0,02	-0,63	1,00E+00	1,00E+00	2,14E-01	1,07	0,99	0,65	
SCLAV_4279	ABC transporter related protein	0,11	-0,03	-0,16	8,00E-01	1,00E+00	8,01E-01	1,08	0,98	0,90	

SCLAV_4280	Type I phosphodiesterase/nucleotide pyrophosphatase	0,02	-0,02	0,01	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	1,01	0,99	1,01
SCLAV_4281	Phosphoglycerate mutase	-0,08	-0,17	-0,19	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	0,95	0,89	0,88
SCLAV_4282	UDP-glucose 4-epimerase	-0,33	-0,37	-0,35	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	0,79	0,77	0,78
SCLAV_4283	LmbE family protein	-0,40	-0,50	-0,45	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	0,76	0,71	0,73
SCLAV_4284	Glycosyl transferase group 1	-0,44	-0,41	-0,39	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	0,74	0,76	0,76
SCLAV_4285	GCN5-related N-acetyltransferase	-0,31	-0,38	-0,47	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	0,81	0,77	0,72
SCLAV_4286	Radical SAM domain protein	-0,52	-0,62	-0,57	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	0,70	0,65	0,67
SCLAV_4287	NAD-dependent epimerase/dehydratase	-0,93	-0,74	-0,51	9,44E-01	1,00E+00	1,00E+00	0,53	0,60	0,70
SCLAV_4276	Phosphatidylglycerophosphatase B	0,00	0,02	0,16	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	1,00	1,01	1,12

Tabla 7.13. Genes reguladores sobreexpresados o subexpresados en *S. clavuligerus*::*pimM* en relación a *S. clavuligerus*::*pIB139*. Ver la leyenda de la tabla 7.2.

SCLAV ⁽²⁾	Producto ⁽³⁾	Mc			<i>p</i> BH			Cambio de expresión ⁽⁴⁾		
		84 h	90 h	96 h	84 h	90 h	96 h	84 h	90 h	96 h
Sobreexpresados										
SCLAV_4191	Transcriptional activator, ClaR (SMC10)	1,61	1,69	1,64	2,76E-02	3,04E-02	4,23E-02	3,05	3,22	3,13
SCLAV_4204	Positive regulator, CcaR (in SMC11)	1,27	1,19	1,27	2,86E-01	4,01E-01	3,92E-01	2,41	2,29	2,41
SCLAV_4464	LuxR-family transcriptional regulator (in SMC13)	1,46	1,96	1,98	1,36E-01	6,67E-02	7,70E-02	2,74	3,88	3,94
Subexpresados										
SCLAV_0835	Transcriptional regulator	-1,97	-2,43	-2,28	7,50E-02	4,80E-02	6,59E-02	0,26	0,19	0,21
SCLAV_1688	Regulatory protein	-1,93	-1,00	-0,87	5,40E-02	2,82E-01	4,02E-01	0,26	0,50	0,55
SCLAV_2069	Putative membrane protein	-1,33	-1,11	-0,34	3,02E-01	4,99E-01	1,00E+00	0,40	0,46	0,79
SCLAV_2070	RNA polymerase sigma factor	-3,23	-2,69	-2,35	4,91E-02	7,15E-02	1,31E-01	0,11	0,15	0,20
SCLAV_4711	Putative GntR-family transcriptional regulator	-2,08	-1,77	-1,58	9,97E-02	1,70E-01	2,58E-01	0,24	0,29	0,34
SCLAV_5308	Transcription factor jumonji jmjC domain protein	-2,84	-2,41	-2,19	1,24E-03	1,12E-03	1,97E-03	0,14	0,19	0,22
SCLAV_p0563	Two-component system sensor kinase (in SMCp6)	-1,84	-1,74	-1,87	5,56E-02	6,08E-02	6,42E-02	0,28	0,30	0,27
SCLAV_p0568	IcLR-family transcriptional regulator (in SMCp6)	-4,21	-4,64	-4,21	3,50E-02	3,04E-02	5,60E-02	0,05	0,04	0,05

Tabla 7.14. Genes con funciones diversas sobreexpresados o subexpresados en *S. clavuligerus::pimM* en relación a *S. clavuligerus::pIB139*. Ver la leyenda de la tabla 7.2.

SCLAV ⁽²⁾	Producto ⁽³⁾	M _c			p BH			Cambio de expresión ⁽⁴⁾		
		84 h	90 h	96 h	84 h	90 h	96 h	84 h	90 h	96 h
Sobreexpresados										
SCLAV_1602	Sporozoite_P67 multi-domain protein	2,74	2,50	2,48	5,90E-02	7,51E-02	9,13E-02	6,70	5,65	5,58
SCLAV_1603	Hypothetical protein	2,72	2,82	2,72	4,26E-02	3,92E-02	5,95E-02	6,60	7,08	6,59
SCLAV_2043	Hypothetical protein	0,84	1,15	0,75	1,61E-01	7,99E-02	2,83E-01	1,79	2,21	1,68
SCLAV_2848	Putative ABC transporter permease protein	1,41	1,73	1,20	1,33E-01	8,07E-02	2,58E-01	2,65	3,32	2,30
SCLAV_4858	DUF692 multi-domain protein	1,19	0,82	0,69	7,40E-02	2,03E-01	3,61E-01	2,27	1,76	1,61
SCLAV_p0727	Putative alcohol dehydrogenase	0,65	1,17	1,31	3,30E-01	1,04E-01	8,52E-02	1,57	2,26	2,48
Subexpresados										
SCLAV_0142	Serine/threonine protein kinase	-3,16	-3,00	-2,82	1,31E-02	1,95E-02	3,08E-02	0,11	0,13	0,14
SCLAV_0143	Hypothetical protein	-3,01	-2,91	-2,65	5,56E-02	5,83E-02	9,13E-02	0,12	0,13	0,16
SCLAV_0319	YheO domain protein	-0,57	-1,04	-0,90	1,51E-01	3,52E-02	6,42E-02	0,67	0,49	0,54
SCLAV_0360	Subtilisin-like protease	-0,85	-1,56	-1,85	1,44E-01	3,33E-02	2,59E-02	0,56	0,34	0,28
SCLAV_0593	Putative pyridoxamine 5 ^{'''} -phosphate oxidase- related protein	-2,33	-1,62	-1,53	5,90E-02	1,70E-01	2,18E-01	0,20	0,33	0,35
SCLAV_0832	Short chain dehydrogenase	-2,39	-3,23	-3,38	7,98E-03	2,09E-03	1,97E-03	0,19	0,11	0,10
SCLAV_0833	Phenylacetaldehyde dehydrogenase	-2,55	-3,63	-3,58	4,53E-03	1,07E-03	1,15E-03	0,17	0,08	0,08
SCLAV_0834	Putative glutamine synthetase	-2,51	-3,16	-3,30	1,31E-02	6,21E-03	4,75E-03	0,18	0,11	0,10
SCLAV_0836	Ethanolamine transporter	-2,90	-3,76	-3,77	4,53E-03	1,12E-03	1,43E-03	0,13	0,07	0,07
SCLAV_0837	Amidotransferase	-2,79	-3,62	-3,47	7,80E-03	2,09E-03	2,38E-03	0,14	0,08	0,09
SCLAV_1442	Alpha-N-acetylglucosaminidase	-2,42	-2,06	-1,71	1,46E-02	3,04E-02	6,31E-02	0,19	0,24	0,31
SCLAV_1516	DNA-binding protein	-1,53	-1,12	-0,85	1,70E-02	5,16E-02	1,32E-01	0,35	0,46	0,56
SCLAV_1725	Lipoprotein	-1,96	-1,86	-1,71	7,98E-03	1,26E-02	1,79E-02	0,26	0,28	0,31
SCLAV_1862	Copper-binding protein	-1,36	-1,50	-1,69	7,81E-02	6,43E-02	6,31E-02	0,39	0,35	0,31
SCLAV_2555	Hypothetical protein	-2,11	-1,94	-1,66	7,50E-02	1,06E-01	1,83E-01	0,23	0,26	0,32
SCLAV_2800	Putative ABC transporter permease protein	-1,18	-0,80	-0,56	2,00E-02	6,84E-02	2,14E-01	0,44	0,57	0,68

SCLAV_2801	Putative ABC transporter ATP-binding protein	-1,28	-1,25	-0,97	5,90E-02	6,08E-02	1,49E-01	0,41	0,42	0,51
SCLAV_3160	Hypothetical protein	-1,55	-1,13	-1,05	1,67E-02	4,93E-02	6,97E-02	0,34	0,46	0,48
SCLAV_3413	Magnesium or manganese-dependent protein phosphatase prpM3	-1,51	-1,14	-1,08	4,53E-03	1,27E-02	1,79E-02	0,35	0,46	0,47
SCLAV_3581	Hypothetical protein	-4,37	-4,22	-4,01	2,58E-02	3,33E-02	5,60E-02	0,05	0,05	0,06
SCLAV_4170	Putative FAD-dependent oxidoreductase	-0,74	-1,02	-1,01	8,44E-02	3,99E-02	5,60E-02	0,60	0,49	0,50
SCLAV_4325	Hypothetical protein	-1,61	-1,17	-1,09	9,15E-02	2,27E-01	3,06E-01	0,33	0,44	0,47
SCLAV_4327	Integral membrane protein	-1,57	-1,42	-1,17	8,91E-02	1,45E-01	2,43E-01	0,34	0,37	0,44
SCLAV_4449	DUF397 domain-containing protein	-1,09	-0,43	-0,75	8,16E-02	6,72E-01	2,68E-01	0,47	0,74	0,59
SCLAV_4677	Putative secreted protein	-2,47	-1,79	-1,89	2,97E-02	7,68E-02	7,70E-02	0,18	0,29	0,27
SCLAV_4833	ABC transporter solute-binding protein	-0,75	-1,32	-1,18	2,61E-01	6,95E-02	1,22E-01	0,60	0,40	0,44
SCLAV_5152	Hypothetical protein	-1,77	-1,51	-1,11	7,80E-03	1,34E-02	5,60E-02	0,29	0,35	0,46
SCLAV_5282	Hypothetical protein	-1,79	-1,93	-1,62	5,90E-02	4,93E-02	9,13E-02	0,29	0,26	0,33
SCLAV_5283	SPDY domain-containing protein	-1,70	-1,93	-1,76	1,06E-01	7,70E-02	1,22E-01	0,31	0,26	0,30
SCLAV_5284	Hypothetical protein	-1,10	-0,93	-0,60	9,51E-02	1,66E-01	4,54E-01	0,47	0,52	0,66
SCLAV_5310	L-arginine:lysine amidinotransferase, putative	-1,63	-0,98	-0,72	7,50E-02	3,08E-01	5,86E-01	0,32	0,51	0,61
SCLAV_5318	Putative oxidoreductase	-2,65	-2,22	-1,84	1,67E-02	3,40E-02	6,59E-02	0,16	0,21	0,28
SCLAV_5359	Dimethylallyltranstransferase / geranyltranstransferase / geranylgeranyl pyrophosphate synthetase	-2,02	-1,52	-1,32	1,00E-02	3,15E-02	6,10E-02	0,25	0,35	0,40
SCLAV_5457	Histidine ammonia-lyase (in Naringenin)	-1,66	-1,94	-1,69	7,00E-02	4,80E-02	7,70E-02	0,32	0,26	0,31
SCLAV_5458	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR	-1,74	-2,16	-1,83	8,44E-02	5,02E-02	9,13E-02	0,30	0,22	0,28
SCLAV_5555	Hypothetical protein	-2,14	-1,62	-1,52	3,08E-02	6,95E-02	1,01E-01	0,23	0,32	0,35
SCLAV_p0164	Putative IS3 ISAav4-like family transposase	-1,12	-0,68	-0,24	5,56E-02	1,99E-01	9,39E-01	0,46	0,63	0,85
SCLAV_p0561	Putative translation initiation inhibitor	-1,15	-0,96	-0,88	8,44E-02	1,62E-01	2,21E-01	0,45	0,51	0,54
SCLAV_p0615	Probable isovaleryl-CoA dehydrogenase	-1,40	-1,12	-0,94	9,84E-03	2,66E-02	5,60E-02	0,38	0,46	0,52
SCLAV_p0736	Hypothetical protein	-3,61	-3,61	-3,51	7,23E-02	6,95E-02	9,13E-02	0,08	0,08	0,09
SCLAV_p0762	Lectin repeat domain protein (in SMCp9)	-2,36	-1,96	-1,69	2,25E-02	4,80E-02	7,70E-02	0,20	0,26	0,31
SCLAV_p0854	Secreted protein	-3,92	-3,96	-3,80	1,70E-02	2,24E-02	3,13E-02	0,07	0,06	0,07

SCLAV_p0855	Glyoxalase/bleomycin resistance protein/dioxygenase	-0,95	-1,11	-0,94	5,90E-02	4,18E-02	7,45E-02	0,52	0,46	0,52
SCLAV_p0877	Transposase family protein	-1,08	-0,58	-0,46	9,51E-02	4,45E-01	6,84E-01	0,47	0,67	0,73
SCLAV_p0983	Amidohydrolase (in SMCp10)	-2,16	-2,46	-2,25	1,21E-01	9,23E-02	1,37E-01	0,22	0,18	0,21
SCLAV_p1417	Hypothetical protein	-4,94	-3,92	-3,36	7,50E-02	1,62E-01	2,62E-01	0,03	0,07	0,10
SCLAV_p1425	Hypothetical protein	-1,07	-0,92	-0,75	8,16E-02	1,51E-01	2,60E-01	0,47	0,53	0,59
SCLAV_p1503	Hypothetical protein	-1,37	-1,33	-0,94	7,50E-02	8,79E-02	2,60E-01	0,39	0,40	0,52
SCLAV_p1504	Putative membrane protein	-2,06	-1,45	-1,26	4,91E-02	1,38E-01	2,13E-01	0,24	0,37	0,42
SCLAV_t009	tRNA-Val	-1,16	-0,84	-0,87	9,66E-02	2,39E-01	2,60E-01	0,45	0,56	0,55

Tabla 7.15. Datos de expresión obtenidos a las 90 horas de cultivo en medio MEY para cada gen analizado en los experimentos de micromatrices (M_c) y de RT-qPCR ($\log_2 2^{-\Delta\Delta Ct}$) en la comparación de *S. clavuligerus::pimM* respecto a *S. clavuligerus::pIB139*. En la columna de producto codificado se indica la agrupación de metabolitos secundarios a la que pertenece el gen.

Gen	Producto	M_c	$\log_2 2^{-\Delta\Delta Ct}$
SCLAV_0142	Serine/threonine protein kinase	-3,00	-3,38
SCLAV_0833	Phenylacetaldehyde dehydrogenase, <i>feaB</i>	-3,63	-4,62
SCLAV_0835	Transcriptional regulator	-2,43	-1,45
SCLAV_1951	Nocardamine synthetase (in SMC6)	1,78	2,18
SCLAV_4197	CeaS2, carboxyethylarginine synthase (in SMC10)	1,70	2,31
SCLAV_4207	CmcJ, methyltransferase (in SMC11)	2,20	2,79
SCLAV_4466	Hybrid NRPS / PKS (in SMC13)	2,11	1,59
SCLAV_5308	Transcription factor jumonji jmjC domain protein	-2,41	-3,36
SCLAV_p0511	Type II PKS (in SMCp5)	1,64	1,95
SCLAV_p0520	SGL domain-containing protein (in SMCp5)	1,86	2,54
SCLAV_p0566	3-Oxoacyl-ACP synthase (in SMCp6)	-2,30	-3,06
SCLAV_p0568	IcIR-family transcriptional regulator (in SMCp6)	-4,64	-4,53

9. Publicaciones



Heterologous expression of *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 cephamycin C gene cluster



Y. Martínez-Burgo^a, R. Álvarez-Álvarez^a, R. Pérez-Redondo^b, P. Liras^{a,*}

^a Microbiology Section, Department of Molecular Biology, Faculty of Biology and Environmental Sciences, Vegazana Campus, University of León, León 24071, Spain

^b Institute of Biotechnology INBIOTEC, Av. Real 1, León 24006, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 April 2014

Received in revised form 28 May 2014

Accepted 2 June 2014

Available online 26 June 2014

Keywords:

Cephamycin C

Streptomyces clavuligerus

CcaR regulatory protein

Heterologous expression

Streptomyces flavogriseus

ABSTRACT

The *Streptomyces clavuligerus* cephamycin C gene cluster has been subcloned in a SuperCos-derived cosmid and introduced in *Streptomyces flavogriseus* ATCC 33331, *Streptomyces coelicolor* M1146 and *Streptomyces albus* J1074. The exconjugant strains were supplemented with an additional copy of the *S. clavuligerus* cephamycin regulatory activator gene, *ccaR_C*, expressed from the constitutive P_{fur} promoter. Only *S. flavogriseus*-derived exconjugants produced a compound active against *Escherichia coli* ESS22-31 that was characterized by HPLC–MS as cephamycin C. The presence of an additional *ccaR* copy resulted in about 40-fold increase in cephamycin C production. Optimal heterologous cephamycin C production was in the order of 9% in relation to that of *S. clavuligerus* ATCC 27064. RT-qPCR studies indicated that *ccaR_C* expression in *S. flavogriseus*::[SCos-CF] was 7% of that in *S. clavuligerus* and increased to 47% when supplemented with a copy of P_{fur}-*ccaR*. The effect on cephamycin biosynthesis gene expression was thus improved but not in a uniform manner for every gene. In heterologous strains, integration of the cephamycin cluster results in a *ccaR*-independent increased resistance to penicillin, cephalosporin and cefoxitin, what corresponds well to the strong expression of the *pcbR* and *pbpA* genes in *S. flavogriseus*-derived strains.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The genome sequencing of actinomycetes isolated from soil, marine and plant origin, has resulted in the discovery of an array of clusters for secondary metabolites, which amounts to about 20 to 30 clusters per genome. This information opens unexpected perspectives in the discovery of new useful drugs. Most of these secondary metabolites clusters are either cryptic, i.e. the product that they encode is unknown (Medema et al., 2010), or silent gene clusters such as those for thienamycin or for clavulanic acid in *Streptomyces flavogriseus* (Blanco, 2012; Álvarez-Álvarez et al., 2013). Heterologous gene expression is a widely used tool in molecular biology and is being used to investigate the limits of known gene clusters, by subcloning them and detecting heterologous production of the compounds formed by the clusters. This technique is useful to know whether the expression of the gene clusters is dependent on a cascade of regulatory mechanism, i.e. general regulatory genes that might be close or separate from the cluster

(Pérez-Llarena et al., 1997a; Wietzorrek and Bibb, 1997; Martín and Liras, 2010), and the requirement for specific butyrolactone or butyrolactone receptor proteins (Ohnishi et al., 1999; Pan et al., 2009; López-García et al., 2010; Salehi-Najafabadi et al., 2014). Heterologous expression has been used for gene clusters of slow growing organisms, and in those cases in which the compound is unstable or produced at very low levels.

In general, expression of clusters for secondary metabolism gives a poor production of the derived metabolites. This applies for small gene clusters, in the order of 30 kb, such as that for holomycin, which was heterologously produced in *Streptomyces albus* and *Streptomyces coelicolor* (Huang et al., 2011; Robles-Reglero et al., 2013), or that for clavulanic acid expressed in *S. flavogriseus* (Álvarez-Álvarez et al., 2013) and also for large clusters such as the 83 kb tacrolimus cluster introduced in *S. coelicolor* (Jones et al., 2013). In all the indicated examples the heterologous production was lower than 10% of that in the parental strain. In a few cases levels of production similar to those found in the parental strain have been obtained, as occurs in the heterologous expression of coumermycin A1 or chlorobiocin genes after improving the culture conditions (Flinspach et al., 2010) or for indolocarbazole production (Tong et al., 2013). However, in general, antibiotic

* Corresponding author. Tel.: +34 987291505.

E-mail address: paloma.liras@unileon.es (P. Liras).

production titers similar to those of the parental strain are not the rule (Komatsu et al., 2010, 2013). Specific *S. coelicolor* host strains have been constructed lacking the clusters for their own antibiotics to facilitate the metabolic flux to the heterologous expressed antibiotic; in addition, host strains containing point mutations in the *rpsL* and *rpoB* genes (Gomez-Escribano and Bibb, 2011) to improve the transcriptional or translational machinery (Ochi and Hosaka, 2013) or strains devoid of large dispensable DNA fragments (Komatsu et al., 2010) have been constructed.

Cephamicin C is produced in a pathway (Fig. 1) starting with the condensation of α -amino adipic acid, cysteine and valine. The tripeptide LLD-ACV is cyclized to isopenicillin N, which is further epimerized to penicillin N. The thiazolidin ring is expanded by the deacetoxycephalosporin C (DAOC) synthase and DAOC is additionally modified by the late enzymes of the pathway to produce cephamicin C. A particular way to improve heterologous expression is the additional expression in the host of genes for *Streptomyces* antibiotic regulatory proteins (SARP), which are cluster specific activators (Jones et al., 2013; Komatsu et al., 2010). CcaR_C is the SARP protein that activates expression of the cephamicin C and the clavulanic acid gene clusters in *S. clavuligerus* (Pérez-Llarena et al., 1997a). In this strain, the *ccaR* gene is located in the cephamicin gene cluster. CcaR_C is an autoregulatory protein and binds specific hexameric sequences in the promoter regions of the cephamicin C biosynthesis genes *lat*, *cefD-cmcl* and *cefF* in *S. clavuligerus* (Santamarta et al., 2011). *S. flavogriseus* ATCC 33331 genome lacks the cephamicin C cluster but contains a clavulanic acid gene cluster which includes a gene (*ccaR_F*) encoding a CcaR_F regulator 63% similar to *S. clavuligerus* CcaR_C (Álvarez-Álvarez et al., 2013). In this work, we report the introduction of the cephamicin C gene cluster of *S. clavuligerus* in three different *Streptomyces* species and show that the heterologous production of cephamicin is highly dependent on the host strain used.

2. Materials and methods

2.1. Strains and culture conditions

S. clavuligerus ATCC 27064 was used as source of DNA and as control for cephamicin C production. The following strains were used as hosts: (i) as model of *Streptomyces* strains, *S. coelicolor* M1146, a strain devoid of the actinorhodin, prodiginine, calcium-dependent antibiotic and coelimycin gene clusters (Gomez-Escribano and Bibb, 2011) was used; (ii) *S. albus* J1074, a strain defective in the Pal6 restriction–modification system (Chater and Wilde, 1976) that has already been used for heterologous expression of gene clusters (Baltz, 2011; Huang et al., 2011) and, (iii) *S. flavogriseus* ATCC 33331 which has been used for heterologous production of clavulanic acid (Álvarez-Álvarez et al., 2013). The strains constructed in this work are described in Table 1.

The following complex solid media: TBO, containing tomato paste and oatmeal, used for sporulation and cephalosporin production by *Streptomyces* (Higgins et al., 1974), MS (Hobbs et al., 1989), TSA, MEY (Kieser et al., 2000), ME (Sánchez and Braña, 1996), ISP4 (Difco™), 2xTY (Sambrook and Russell, 2001) and the defined SA medium (Paradkar et al., 1998), were used to test cephamicin C production by the heterologous hosts. TBO, TSA or the liquid form TSB have been used previously for cephamicin C production and SA for clavulanic acid and cephamicin C production (Higgins et al., 1974; López-García et al., 2010). Liquid cultures were done in 500 ml triple baffled flasks containing 100 ml of TBO or MEY medium. The cultures were maintained at 30 °C and 220 rpm. Kanamycin (50 µg/ml), thiostrepton (10 µg/ml), hygromycin (50 µg/ml) and nalidixic acid (25 µg/ml) were added to the cultures when required. To test antibiotic resistance in the constructed strains, cefoxitin

(Normon), penicillin G (ICN Biochemicals) and cephalosporin C, sodium salt (from Antibióticos SA, León) were used.

2.2. Cephamicin C analysis

Cephamicin C quantification was performed by bioassay using *Escherichia coli* ESS22-31, a β -lactam antibiotics supersensitive strain (López-García et al., 2010). HPLC–MS analysis of cephamicin C production was done using an Atlantis T3 (3 µm, 2.1 × 150 mm, Waters) column. Acetonitrile containing 0.1% trifluoroacetic acid in water (1:99) was used as mobile phase. Samples (2.5 µl) were injected and eluted with a 0.25 ml/min flow using a 20 minutes gradient of 0 to 20% acetonitrile. Detection was done by absorbance at 264 nm (PDA) and the MS (scanning and SIR at *m/z* 447.2). Cephamicin C purified by HPLC from a *S. clavuligerus* culture was used as standard.

2.3. Nucleic acid manipulation

2.3.1. Characterization of a cosmid carrying the whole *S. clavuligerus* cephamicin C gene cluster

The location of cosmid G6-15 carrying the cephamicin C gene cluster has been described by Kurt et al. (2013). This cosmid was characterized by: (1) BamHI digestion, which resulted in DNA fragments (17.4, 8.4, 6.4, 4.6, 4.0 and 3.2 kb) in agreement with those expected by in silico analysis, and (2) by sequencing both ends of the cosmid. These ends correspond to internal regions of the SCLAV.4215 (*bla*) gene and of the clavulanic acid biosynthesis SCLAV.4196 (*bls2*) gene, indicating that the whole cephamicin C gene cluster was present in the 35670 bp insert of the cosmid.

2.3.2. Construction of vectors for the integration of the cephamicin C gene cluster

In order to express the cephamicin C gene cluster in heterologous hosts in a stable way, cosmid G6-15 was provided with an integration cassette. The cassette, containing the *int* gene, the *attP* site of phage ΦC31 (Eustáquio et al., 2005), the *tet^R* gene for selection and the *oriT* transference origin, was obtained by XbaI digestion of pFL1272. The ends of the XbaI fragment were filled with thymine and cytosine, and ligated to HindIII digested G6-15 filled with adenine and guanine. The resulting integrative cosmid will be named [SCos-CF] thereafter. After confirmation of the correct construction, this cosmid was introduced in *E. coli* ET12567[pUZ8002] which was conjugated with the appropriate *Streptomyces* host. Transformants resistant to kanamycin were tested by PCR for the presence of the [SCos-CF] cosmid.

In addition, *ccaR* was deleted from cosmid [SCos-CF] using the Redirect technology. Oligos *ccaR*.RedFor and *ccaR*.RedRev were used to substitute the *ccaR* gene by the apramycin cassette using PCR [98 °C 1 min, 98 °C 30 s, 48 °C 30 s, 72 °C 90 s 30 cycles, 72 °C 5 min] with Pfu DNA Polymerase (EurX). The cosmid obtained, [SCos::CFΔ*ccaR*], was transformed in *E. coli* 12567[pUZ8002] and introduced in *S. flavogriseus* spores by conjugation. DNA from apramycin resistant transformants was analyzed by PCR [95 °C 3 min, 95 °C 30 s, 68 °C 30 s (10 °C gradient), 72 °C 180 s, 10 cycles, 95 °C 30 s, 58 °C 30 s (10 °C gradient), 72 °C 180 s 30 cycles, 72 °C 5 min] using oligonucleotides orf10.F and QRT-2D.

2.3.3. Construction of strains carrying the *ccaR* gene expressed from the *P_{fur}* promoter

Cosmid G6-15 carries the *ccaR* gene expressed from its own promoter. The *ccaR* gene might be activated/regulated in *S. clavuligerus* by proteins or molecules not present in the heterologous host; to avoid this, *ccaR* was expressed from the constitutive *P_{fur}* promoter (Ortiz de Orué Lucana et al., 2003) using the integrative pMS82 vector which allows the integration of the φBT1 site in the SCO4848

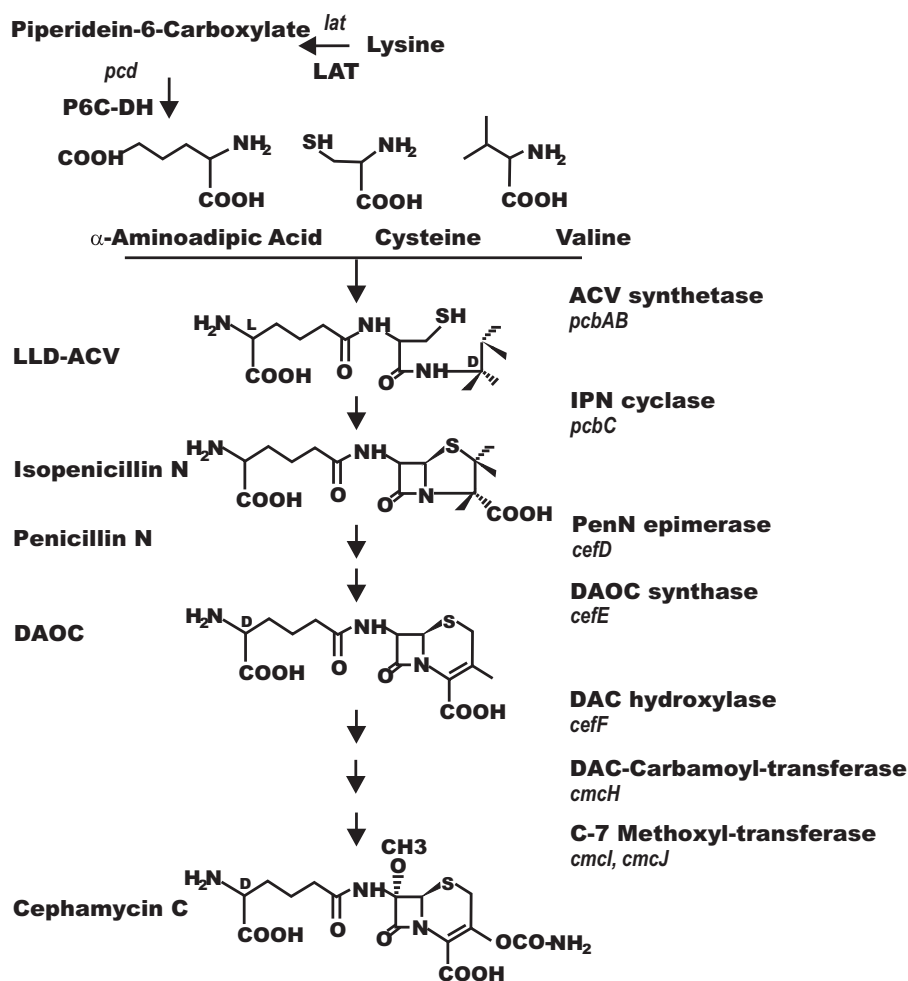


Fig. 1. Cephameycin C biosynthesis pathway. The simplified pathway shows the precursors, intermediates, enzymes and genes involved in cephamycin biosynthesis.

gene (Gregory et al., 2003). The *ccaR* gene was amplified with oligonucleotides *ccaR_F* and *ccaR_R* carrying *NcoI* and *HindIII* digestion sites at the ends; the amplified DNA fragment was digested with those enzymes and ligated with *NcoI*-*HindIII* digested vector *pUFurReg*, which contains the *furS* promoter (Ortiz de Oruía Lucana et al., 2003). The *ccaR* amplified DNA was sequenced for confirmation. Finally, to obtain *ccaR* in the correct frame, the plasmid was digested with *NotI*-*HindIII* and the ends were filled with Klenow. The fragment was then subcloned into the *EcoRV* site of the integrative vector *pMS82*, and the final [*P_{fur}*-*ccaR*] construction was characterized by digestion and introduced by conjugation in the appropriated host.

2.4. Isolation of RNA and qRT-PCR

RNA was isolated using the RNeasy Kit (Qiagen) from 48 h cultures grown in TBO medium. RNA was quantified in a Nano-Drop spectrophotometer (Thermo Scientific), and its integrity was

confirmed, after 10 min treatment at 50 °C, by electrophoresis in 2% agarose gels. cDNA was obtained with *SuperScript*TM III reverse transcriptase (Invitrogen) using 0.5 µg RNA as template and Random Primers (Invitrogen) at 12.5 ng/µl final concentration. The oligonucleotides used for qRT-PCR of the different genes are indicated in Table 2. The quantification of gene expression was performed by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Livak and Schmittgen, 2001; Schmittgen and Zakrajsek, 2000) using the *hrdB* gene as internal control (Aigle et al., 2000).

3. Results

3.1. Strains constructed for cephamycin C heterologous expression.

The strains used for the heterologous cephamycin C cluster expression, *S. coelicolor* M1146, *S. albus* J1074 and *S. flavogriseus* ATCC 33331 were conjugated with the [SCos-CF] cosmid. In addition, to assure expression of the cephamycin C gene cluster, the

Table 1
Strains constructed in this work.

Original strain	Strains with <i>ccaR</i> integrated	Strains with the cephamycin cluster integrated	Strains with the cephamycin cluster and the <i>ccaR</i> gene integrated
<i>S. coelicolor</i> M1146	<i>S. coelicolor</i> M1146::[<i>P_{fur}</i> - <i>ccaR</i>]	<i>S. coelicolor</i> M1146::[SCos-CF]	<i>S. coelicolor</i> M1146::[SCos-CF]::[<i>P_{fur}</i> - <i>ccaR</i>]
<i>S. albus</i> J1074	<i>S. albus</i> ::[<i>P_{fur}</i> - <i>ccaR</i>]	<i>S. albus</i> ::[SCos-CF]	<i>S. albus</i> ::[SCos-CF]::[<i>P_{fur}</i> - <i>ccaR</i>]
<i>S. flavogriseus</i> ATCC33331	<i>S. flavogriseus</i> ::[<i>P_{fur}</i> - <i>ccaR</i>]	<i>S. flavogriseus</i> ::[SCos-CF]	<i>S. flavogriseus</i> ::[SCos-CF]::[<i>P_{fur}</i> - <i>ccaR</i>]
<i>S. flavogriseus</i> ATCC33331		<i>S. flavogriseus</i> ::[SCos-CFΔ <i>ccaR</i>]	

Table 2
Oligonucleotides used in this work.

Name	Sequence 5' → 3'	Comment	PCR (nt)	Amplified gene
cmcTF	GGCGGTATGCTGCTGGTCT	qRT-PCR	137	SCLAV_4213
cmcTR	CGCTGTCGGGGTGATGG	qRT-PCR	137	SCLAV_4213
pcdF	CAGCAATCAGTGTACCGACGAGA	qRT-PCR	138	SCLAV_4212
pcdR	CGCGCAGGCCGAACAGAT	qRT-PCR	138	SCLAV_4212
cefEF	ACCTCGCCCGTCCCCACCA	qRT-PCR	161	SCLAV_4211
cefER	GTCCAGATCCGCTCGAAGTCACCG	qRT-PCR	161	SCLAV_4211
cefDF	GCTGTGGCAGCGCGGGAGAG	qRT-PCR	110	SCLAV_4210
cefDR	GCAGTGACGACGCGACGAGTTGA	qRT-PCR	110	SCLAV_4210
cmcIF	TACACACCCAGCTCCACGAT	qRT-PCR	119	SCLAV_4208
cmcIR	GGACTTCTCCCGTACCAGT	qRT-PCR	119	SCLAV_4208
cmcJF	AGATGCGCGGACTGATG	qRT-PCR	123	SCLAV_4207
cmcJR	AGCGGGAGACCGAAGAG	qRT-PCR	123	SCLAV_4207
ceffF	CGCGCCGCACATCACGACG	qRT-PCR	149	SCLAV_4206
ceffR	GGATGGCCCCGACTACGACCTG	qRT-PCR	149	SCLAV_4206
cmcHF	CCATCAGCTTGCCCGCTCGTTC	qRT-PCR	164	SCLAV_4205
cmcHR	CGTGGGCGGCTTCTACCTCGTCG	qRT-PCR	164	SCLAV_4205
ccaRF	GCTTCTTGAGATGACCTG	qRT-PCR	144	SCLAV_4204
ccaRR	CACCTGGAATGATGTGACGA	qRT-PCR	144	SCLAV_4204
orf10F	CGCAGGGGACCGCGTGAAT	qRT-PCR	133	SCLAV_4203
orf10R	TGCGCTGGCTGGGGGTCTC	qRT-PCR	133	SCLAV_4203
blpF	GCCTCCGTATGCCCGTCTG	qRT-PCR	130	SCLAV_4202
blpR	CGCAGGGCCACTTCTTCTCAA	qRT-PCR	130	SCLAV_4202
latF	CGTACGGCACCGAATAAAGA	qRT-PCR	159	SCLAV_4201
latR	TCACCAGAAGCGGTATCTC	qRT-PCR	159	SCLAV_4201
pcbABF	GTGGTGCCGTTGGTGACGA	qRT-PCR	124	SCLAV_4200
pcbABR	CACGCTCGGCATCTGGAAGG	qRT-PCR	124	SCLAV_4200
pcbCF	GGATCGCCAGGTCGTCTTCTC	qRT-PCR	111	SCLAV_4199
pcbCR	CGCGGCTCGGCTTCTTCTAC	qRT-PCR	111	SCLAV_4199
pcbRF	GTGGGCTCGGCTATTGGGGTTAC	qRT-PCR	111	SCLAV_4198
pcbRR	CCAGGCGCCGAGGAAGGTGT	qRT-PCR	111	SCLAV_4198
cmcH.ccaRF	CAGGAGCCGATCGTCACAT	Cosmidlocation	1064	cmcH-ccaRintergenic
cmcH.ccaRR	ACGGCGACGGTTCATCAA	Cosmidlocation	1064	cmcH-ccaRintergenic
ccaR_F	ATCATAT CCATGG ACACCTGGAATGATGT	ccaRwithout promoter	809	SCLAV_4204
ccaR_R	AATGACA AGCTTT CAGGCCGGGTACCGACCC	ccaRwithout promoter	809	SCLAV_4204
ccaR_RedFor	CGGCGAGGGCGTGGTTCCTTCAACAAGGGGACCGCCATGATTCGGGGATCCGTCGACC	RedirectccaRdeletion	1400	apramycincassette
ccaR_RedRev	AAAACGTCCGACAAACATTCCCGTATCGCGCGCGGTTTCATGTAGGCTGGAGCTGCTTC	RedirectccaRdeletion	1400	apramycincassette
Am_F	CTATGATCGACTGATGTCATCAGCGGTGGAGTGCAATGTC	ccaRdeletionconfirmation		apramycincassette
QRT-2-D	GGGGTAGGGAGGGGAGAGT	ccaRdeletionconfirmation		cmcH-ccaRintergenic
T3	ATTAACCCCTACTAAAGGGA	Sequencing primer		
T7	TAATACGACTACTATAGGG	Sequencing primer		

Oligonucleotides ccaR_F and ccaR_R carry additional sites for NcoI and HindIII digestion, respectively (shown in bold letters).

integrative plasmid [P_{fur}-ccaR] was introduced in the previous strains. The resulting strains are described in Table 1.

3.2. Analysis of cephamycin C production by the transformed strains

All the strains shown in Table 1 and their original control strains were grown in eight different solid media: TBO, MS, MEY, ISP4, ME, 2XTY, TSA and SA. Agar plugs were taken from the plates every 24 h up to 96 h, and bioassayed on *E. coli* ESS22-31 to test cephamycin production. In addition to the wild type *S. clavuligerus* ATCC27064 only *S. flavogriseus*::[SCos-CF] and *S. flavogriseus*::[SCos-CF]::[P_{fur}-ccaR] produced clear inhibition zones in all the assayed media except on 2xTY and SA media (Fig. 2). No inhibition zones were ever found for *S. coelicolor* or *S. albus*-derived exconjugants, independently of the media or the time assayed (not shown). Therefore, antibiotic production was analyzed in liquid cultures of *S. clavuligerus* ATCC 27064, *S. flavogriseus* ATCC 33331, *S. flavogriseus*::[SCos-CF], *S. flavogriseus*::[SCos-CF]::[P_{fur}-ccaR] grown in TBO (Fig. 3) and MEY liquid media.

Cephamycin C production was about 10-fold higher in TBO than in MEY medium (not shown). The highest levels of cephamycin C production in TBO medium were those of *S. clavuligerus* ATCC 27064 (3640 µg/ml at 80 h of culture) (Fig. 3A). Cephamycin was never produced by *S. flavogriseus* ATCC 33331, or by the *S. coelicolor* and *S. albus*-derived exconjugants. The cephamycin gene cluster activated by its own CcaR_C regulator in *S. flavogriseus*::[SCos-CF]

resulted in up to 8 µg/ml cephamycin C production (Fig. 3B). When an additional copy of *ccaR*, expressed from the P_{fur} promoter, was introduced in the previous *S. flavogriseus* strain, the resulting exconjugant *S. flavogriseus*::[SCos-CF]::[P_{fur}-ccaR] produced up to 300 µg/ml of cephamycin C. This is almost 40-fold higher than the production by *S. flavogriseus*::[SCos-CF] but still in the order of 8% of the production by *S. clavuligerus* ATCC 27064 grown in the same medium.

S. flavogriseus contains its own *ccaR*_F gene, which is located in the clavulanic acid gene cluster (Álvarez-Álvarez et al., 2013). To know if the endogenous CcaR_F protein was functional and able to activate the cephamycin C biosynthesis genes the *S. clavuligerus* original *ccaR* (*ccaR*_C) was disrupted in the [SCos-CF] cosmid to give [SCos-CF]::Δ*ccaR* and this construction was introduced in *S. flavogriseus* ATCC 33331.

As shown in Fig. 3B, *S. flavogriseus*::[SCos-CF]::Δ*ccaR* was unable to produce cephamycin. This confirms that the *S. flavogriseus* CcaR_F regulator is not very efficient in activation of heterologous cephamycin C gene cluster expression, as shown previously for the heterologous expression of clavulanic acid genes in this strain (Álvarez-Álvarez et al., 2013).

3.3. The antibiotic produced by *S. flavogriseus*::[SCos-CF] is authentic cephamycin C

To confirm that the bioactive compound produced by *S. flavogriseus*::[SCos-CF] was cephamycin C, the broth from a 96 h

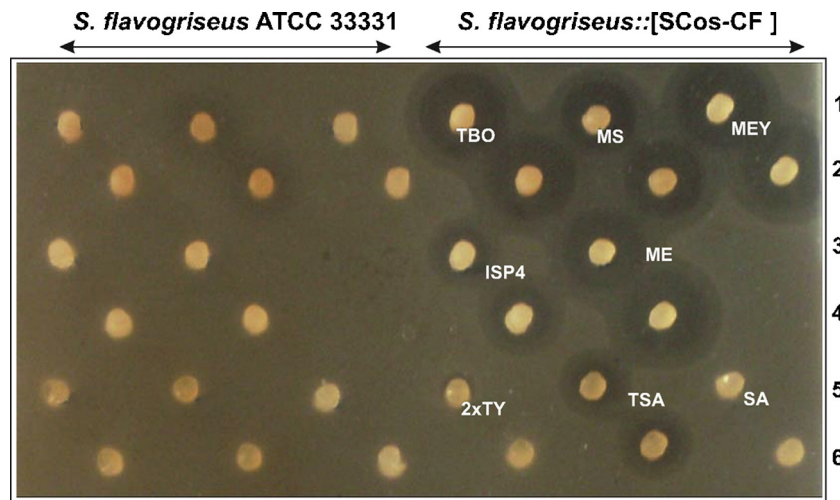


Fig. 2. Bioactivity of *S. flavoviridis* ATCC 33331 and *S. flavoviridis*::[SCos-CF] cultures. The strains were grown in the solid media indicated for 48 h. Bioassays using agar plugs were performed for detection of cephamycin C production by the transformants as detailed in Section 2. Lines (1) and (2) plugs of TBO, MS and MEY medium. (3) and (4) Plugs of ISP4 and ME medium. (5) and (6) Plugs of 2xTY, TSA and SA medium. The plugs correspond to *S. flavoviridis* ATCC 33331 (left side) and *S. flavoviridis*::[SCos-CF] (right side).

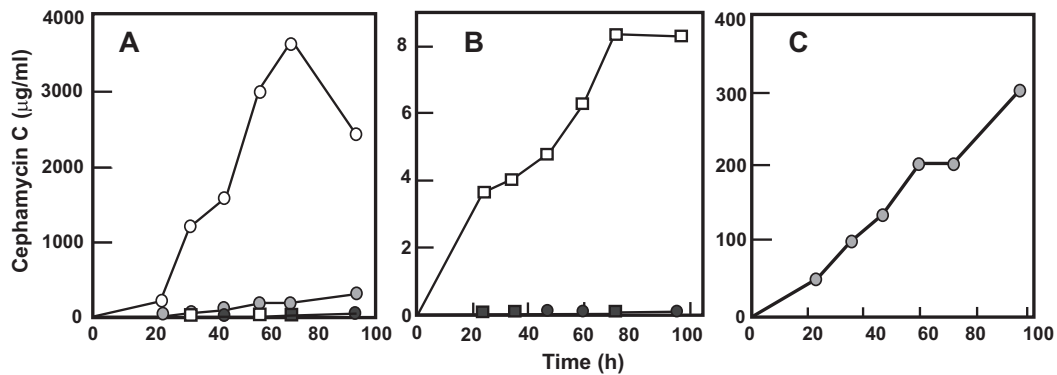


Fig. 3. Cephalexin C production in liquid cultures. Cephalexin C production in TBO medium by *S. clavuligerus* ATCC 27064 (white circles), *S. flavoviridis* ATCC 33331 (black circles), *S. flavoviridis*::[SCos-CF] (white squares), *S. flavoviridis*::[SCos-CF]:ΔccaR (black squares) and *S. flavoviridis*::[SCos-CF]:[Pfur-ccaR] (gray circles). The panels represent different scales of the same cultures.

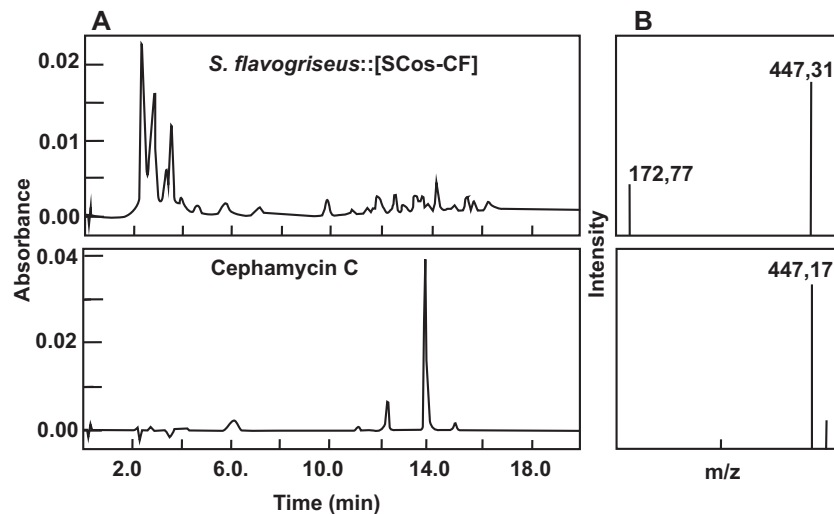


Fig. 4. HPLC–MS of heterologously expressed cephamycin C. (A) HPLC from a *S. flavoviridis*::[SCos-CF] culture broth grown for 96 h in TBO medium (upper panel) and pure standard of cephamycin C (lower panel). (B) Mass chromatography obtained by selected ion recording at m/z 447.17 of the *S. flavoviridis*::[SCos-CF] peak shown in (A) (upper panel) and mass spectra of the pure cephamycin C acid peak (lower panel) shown at (A).

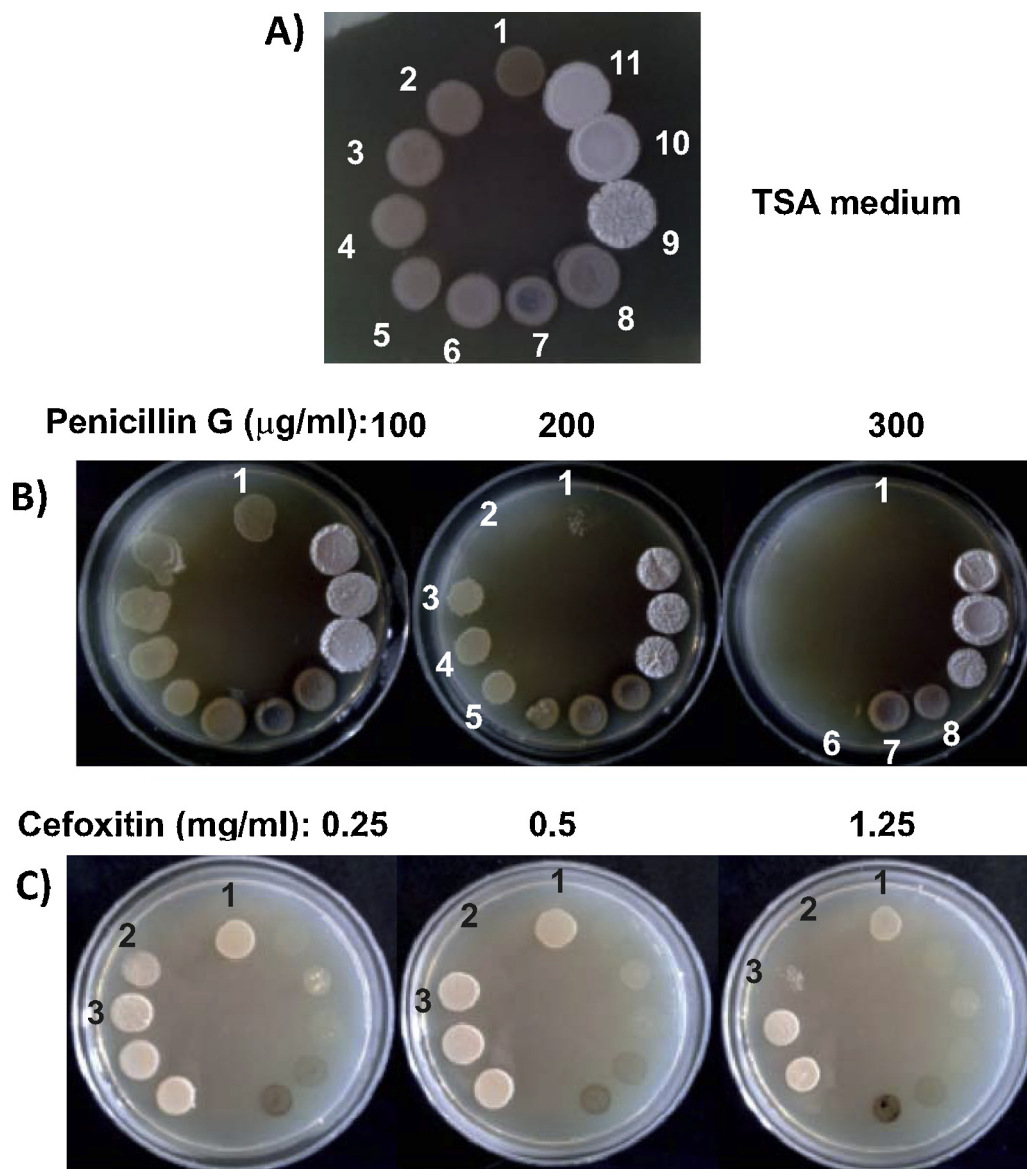


Fig. 5. Resistance to cefoxitin and penicillin G of the different strains. (A) Growth of the strains in unsupplemented TSA plates. (B) Effect of penicillin G on the growth. TSA plates supplemented with: 100 $\mu\text{g/ml}$ penicillin G (left), 200 $\mu\text{g/ml}$ penicillin G (center), 300 $\mu\text{g/ml}$ penicillin G (right). (C) Effect of cefoxitin on the growth. TSA plate supplemented with: 0.25 mg/ml cefoxitin (left), 1 mg/ml cefoxitin (center) and 1.25 mg/ml cefoxitin (right). The strains used are: (1) *S. clavuligerus* ATCC 27064, (2) *S. flavogriseus* ATCC 33331, (3) *S. flavogriseus*::[SCos-CF], (4) *S. flavogriseus*::[SCos-CF]::[P_{fur}-ccaR], (5) *S. flavogriseus*::[SCos-CF Δ ccaR], (6) *S. coelicolor* M1146, (7) *S. coelicolor*::[SCos-CF], (8) *S. coelicolor*::[SCos-CF]::[P_{fur}-ccaR], (9) *S. albus* J1074, (10) *S. albus*::[SCos-CF], (11) *S. albus*::[SCos-CF]::[P_{fur}-ccaR].

TBO culture was analyzed by HPLC–MS using as control pure cephamycin C purified from an *S. clavuligerus* culture. A small peak was detectable in *S. flavogriseus*::[SCos-CF] broths (Fig. 4A) which was not present in cultures of *S. flavogriseus* ATCC 33331. This peak corresponds to the retention time of pure cephamycin C (14 min), and not to a cephem intermediate of the cephamycin pathway, and showed an m/z value of 447.17 coincident with that of pure cephamycin C (Fig. 4B).

3.4. Characterization of the level of resistance to β -lactam antibiotics in the parental and derived exconjugant strains

Penicillinases and cephalosporinases occur in many *Streptomyces* species (Forsman et al., 1990; Sendouda et al., 1993). They are encoded by genes in the cephamycin C gene cluster of *S. clavuligerus* (Pérez-Llarena et al., 1997b) and *Amycolatopsis lactamdurans* (Kumar et al., 1996). All the strains constructed in this work

(Fig. 5A) and their controls were tested for its ability to grow on solid TSA medium supplemented with penicillin G (100 to 400 $\mu\text{g/ml}$), cefoxitin (0 to 2 mg/ml) or cephalosporin C (0 to 7.5 mg/ml). The *Streptomyces* strains studied were always more sensitive to penicillin than to cephalosporin C. All the parental strains grew well on 100 $\mu\text{g/ml}$ penicillin G. *S. clavuligerus* ATCC 27064 and *S. flavogriseus* ATCC 33331 were unable to grow at 200 $\mu\text{g/ml}$, but the *S. flavogriseus*-derived strains showed a good growth on 200 $\mu\text{g/ml}$ penicillin G (Fig. 5B, numbers 3 to 5). A similar result was observed with *S. coelicolor* M1146 which was sensitive to 300 $\mu\text{g/ml}$ penicillin G while *S. coelicolor*::[SCos-CF] was able to grow in the presence of 300 (Fig. 5B, 7 to 8) and weakly on 400 $\mu\text{g/ml}$ penicillin G (not shown). On the contrary *S. albus* J1074 and all the *S. albus*-derived strains were resistant to up to 400 $\mu\text{g/ml}$ penicillin G (Fig. 5B, 9 to 11) and no differences of growth were observed at the penicillin G concentrations used due to the presence of the integrated cephamycin cluster.

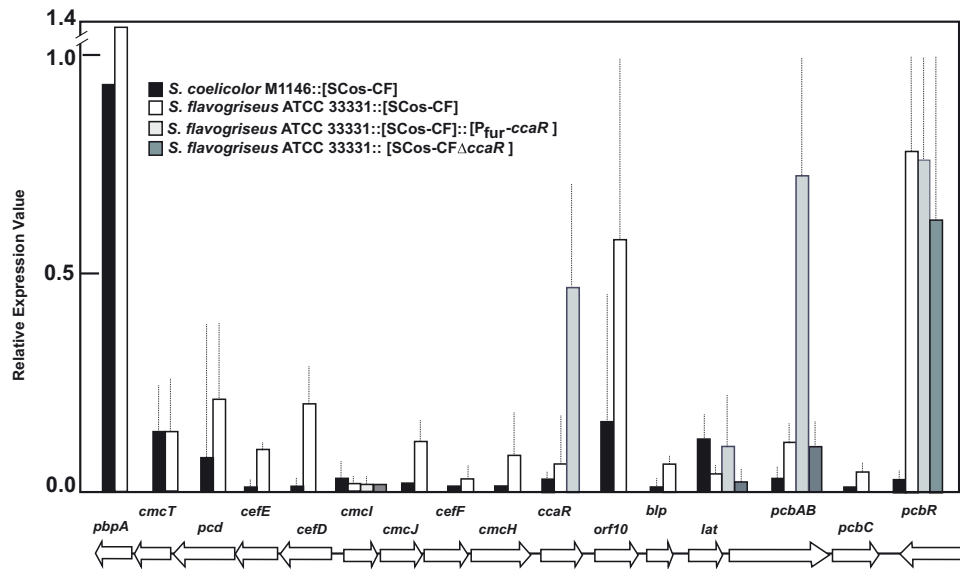


Fig. 6. Expression of genes of the cephamycin C cluster as detected by RT-qPCR. Relative expression value of the cephamycin C genes indicated below in *S. coelicolor* M1146::[SCos-CF] (black bars), *S. flavovirgatus* ATCC 33331::[SCos-CF] (white bars), *S. flavovirgatus* ATCC 33331::[SCos-CF]::[P_{fur}-ccaR] (light gray bars), *S. flavovirgatus* ATCC 33331::[SCos-CFΔccaR] (dark gray bars). Expression is measured in cultures grown in liquid TBO medium for 48 h. The values are referred to the expression of each gene in *S. clavuligerus* ATCC 27064, taken as 1.0. The cephamycin genes shown at the bottom are merely indicative of their location and do not reflect their size.

S. coelicolor M1146 and *S. albus* J1074 and strains derived from them, were unable to grow in 0.25 mg/ml of ceftioxin, a semisynthetic cephamycin, but *S. clavuligerus* ATCC 27064 grew up to 1.25 mg/ml (Fig. 5C). *S. flavovirgatus* supported growth up to 0.25 mg/ml ceftioxin but *S. flavovirgatus*-derived strains grew up to 1.25 mg/ml.

All the strains were more resistant to cephalosporin C than to ceftioxin. *S. clavuligerus* is completely insensitive to cephalosporin, being able to grow on 7 mg/ml cephalosporin, while *S. albus* J1074, *S. albus*-derived strains and *S. flavovirgatus* ATCC 33331 were not able to grow in 2.0 mg/ml cephalosporin C, and *S. coelicolor* M1146 grew in 3.0 mg/ml but not in 7.0 mg/ml cephalosporin C. *S. coelicolor* or *S. flavovirgatus* transformants carrying [SCos-CF] or [SCos-CFΔccaR], were able to grow in the presence of 3.0 and even in 4.0 mg/ml (not shown) cephalosporin C.

This confirms that some genes in the cephamycin cluster confer penicillin and cephalosporin resistance. These genes appear to be expressed independently of the presence of an active *ccaR_C* gene such as occurs in strains carrying the cosmid [SCos-CFΔccaR].

3.5. Expression of the heterologous genes as detected by RT-qPCR

In order to understand the origin of the low production of cephamycin C by the heterologous hosts, quantitative RT-PCR was done for the regulatory gene *ccaR*, all the cephamycin biosynthetic genes and the putative resistance genes *cmcT*, *pcbR* and *pbpA* in strains derived from *S. flavovirgatus* ATCC 33331 and *S. coelicolor* M1146. Expression was compared to that of the endogenous *S. clavuligerus* genes. In all the cases, it was assigned a relative expression value of 1.0 to *S. clavuligerus* endogenous gene expression (Fig. 6). The strains were grown in TBO liquid medium and RNA was extracted from 48 h cultures.

Expression of the *ccaR* gene in *S. coelicolor*::[SCos-CF] was 4% of that in *S. clavuligerus* and 7% in *S. flavovirgatus*::[SCos-CF]. The biosynthetic genes (*pcd*, *cefE*, *cefD*, *cefF*, *cmcI*, *cmcJ*, *cmcH*, *lat*, *pcbAB*, and *pcbC*) were expressed in *S. coelicolor* [SCos-CF] with an average level of 3.4% in relation to their expression in *S. clavuligerus*, being *lat* (encoding the aminotransferase forming α -amino adipic acid) the best expressed gene (12%). In general,

expression of the cephamycin C biosynthetic genes was higher in *S. flavovirgatus*::[SCos-CF] than in *S. coelicolor*-derived strains, with an average level of 9.6% in relation to *S. clavuligerus*, being *pcd* and *cefD* the best expressed genes (21%).

The *ccaR* gene was well expressed from the P_{fur} promoter as shown by the higher expression of *ccaR* expression (47%) in exconjugant *S. flavovirgatus*::[SCos-CF]::[P_{fur}-ccaR]. Expression of the biosynthetic genes *pcbAB* and *lat* increased in this strain to 72% and 11%, respectively. This increase in *ccaR* and the biosynthetic gene transcription explains the higher cephamycin C production by this strain (Fig. 6); however, there is not a strict correlation between the increase in *ccaR* expression (47%) and the increase in cephamycin C production (12%) probably because the expression of some genes in the cluster, as it occurs to *cmcI*, is limiting.

Several genes have been described as responsible for the high cephalosporin C resistance observed in *S. clavuligerus*. Some of them have been related with cephamycin or β -lactam biosynthesis as *cmcT*, *pbpA* or *pcbR* (Paradkar et al., 1996; Ishida et al., 2006; Pérez-Llarena et al., 1998), while the role of *orf10* and *blp* appears to be more related to clavulanic acid formation (Thai et al., 2001). Expression of *cmcT* was similar in *S. flavovirgatus* and *S. coelicolor* strains carrying [SCos-CF] but *pcbR* expression was much higher in *S. flavovirgatus*-derived strains reaching values up to 78% of that in *S. clavuligerus*. This gene expression is similar in *S. flavovirgatus*::[SCos-CF] and *S. flavovirgatus*::[SCos-CF]::[P_{fur}-ccaR] (not shown). The same occurs to *pbpA*, a gene that is expressed in the heterologous hosts at similar or higher levels than in *S. clavuligerus*. The strong expression of *pcbR* and *pbpA*, both encoding penicillin binding proteins, might explain the high resistance to penicillin G and ceftioxin observed for *S. flavovirgatus*-derived strains (Fig. 6B and C).

These differences in penicillin or cephalosporin resistance are not due to the *S. clavuligerus bla* gene, encoding a type I β -lactamase (Pérez-Llarena et al., 1997b), since this gene is not complete in cosmid [SCos-CF].

The absence of *ccaR_C* expression in the transformant *S. flavovirgatus*::[SCos-CFΔccaR] which lacks CcaR_C did not significantly affect the expression of the genes analyzed (as *cmcI* or *pcbAB*), but decreased slightly that of *lat* and *pcbR*.

4. Discussion

Heterologous expression of secondary metabolites clusters results, generally, in low yield of the compounds produced. More than 20 different compounds have been heterologously produced by optimized *S. coelicolor* host strains by several research groups (Gomez-Escribano and Bibb, 2014) and a similar number of metabolites has been heterologously produced in large-deletion mutants of *S. avermitilis* (Ikeda et al., 2014). However, in most cases the heterologous final production has not been either reported or compared with the production of the native strain in the same culture conditions. While in some cases yield improvement can be obtained by optimizing the culture medium and conditions (Flinspach et al., 2010), the dosis of activator regulatory genes or their expression by strong promoters (Komatsu et al., 2010; Goranovič et al., 2012; Álvarez-Álvarez et al., 2013) in other cases, such as for platencin, microbisporicin or pladienolides (Smanski et al., 2012; Foulston and Bibb, 2010; Komatsu et al., 2010) heterologous production could not be achieved.

In this work we found that the same cephamycin cluster-carrying cosmids and identical supplementation with the P_{fur} expressed *ccaR* activator gene results in production of cephamycin C in *S. flavogriseus* but not in *S. coelicolor* or *S. albus*. The analysis of the cephamycin cluster, as detected by RT-qPCR, shows a great expression variability between different genes and is clearly lower in *S. coelicolor* than in *S. flavogriseus*-derived strains. Gene expression is not strictly dependent on the *ccaR* dosis provided to the strain, i.e. an additional copy of *ccaR_C* expressed from the P_{fur} promoter in *S. flavogriseus* improves the cephamycin to only 10% of that found in the *S. clavuligerus* ATCC 27064, probably due to the poor expression of many genes; however, additional copies of *ccaR* results in duplication of both cephamycin C and clavulanic acid production in *S. clavuligerus* (Pérez-Llarena et al., 1997a). Each strain has its own genetic background, i.e. the internal *S. flavogriseus ccaR_F* activator gene, located in *S. flavogriseus* clavulanic acid cluster, is poorly efficient in activating the expression of heterologous clavulanic acid genes (Álvarez-Álvarez et al., 2013) or, as shown here in the expression of the cephamycin C biosynthesis, as deletion of *ccaR_C* in *S. flavogriseus*::[SCos-CFΔ*ccaR_C*], results in no detectable cephamycin C heterologous production.

The role of CcaR in regulation of the cephamycin C or clavulanic acid biosynthesis genes has been analyzed by EMSA assays, RT-qPCR or transcriptomic studies using *ccaR*-deleted strains (Álvarez-Álvarez et al., 2014b; Santamarta et al., 2011). However, other additional factors required for optimal expression might be involved. The phylogenetic proximity and genetic background of the strains might be important for an efficient gene expression.

S. flavogriseus, as well as *S. avermitilis*, in which cephamycin C has been produced at good levels (Komatsu et al., 2010), are strains phylogenetically closer to *S. clavuligerus* than *S. albus* J1074 or *S. coelicolor* A3(2) (Zhou et al., 2011). This might explain the lack of production observed in these two hosts, both for cephamycin C and clavulanic acid (Álvarez-Álvarez et al., 2013), as well as the non-heterologous production of pladienolide from *S. platenis* Mer-11107 in *S. avermitilis* (Komatsu et al., 2010) or that from *S. griseus* fredericamycin in *S. albus* but not in *S. lividans* (Chen et al., 2008). A particularly interesting example is that of holomycin; holomycin is strongly produced in the absence of plasmid pSCL4 which probably carries a holomycin repressor encoding gene (Álvarez-Álvarez et al., 2014a). It would be expected that heterologous expression in the absence of this repressor protein will result in very efficient holomycin production; however, holomycin is poorly produced in *S. albus* or *S. coelicolor* (Huang et al., 2011; Robles-Reglero et al., 2013) and moderately produced in the phylogenetically closer *S. avermitilis* strain (Ikeda et al., 2014).

Quantitative analysis by RT-qPCR of heterologous expression of *S. clavuligerus* cephamycin C genes shows a great variability in transcription. Genes related to antibiotic resistance appear to be well expressed. This results in the growth of *S. flavogriseus* and *S. coelicolor* exconjugants at higher concentration of penicillin or cefoxitin. However, most of the biosynthetic genes are poorly expressed in the heterologous strain.

Therefore, while the use of an optimized host might be useful, the phylogenetic proximity of *Streptomyces* strains should also be considered when heterologous expression of gene clusters is approached.

Acknowledgements

This work was supported by Grant BIO2012-34723 of the Spanish Ministry of Economy and Competitivity. The technical by HPLC-MS analysis of cephamycin C production by Dr. A. Braña (Oviedo University, Spain) is greatly appreciated. Y. Martínez-Burgo and R. Álvarez-Álvarez received PFU fellowships of the Spanish Ministry of Economy and Competitivity. We appreciate the collaboration of Dr. A. Kurt in the design of oligonucleotides for RT-qPCR experiments and Prof. J.F. Martín for helpful discussions of the work.

References

- Aigle, B., Wietzorrek, A., Takano, E., Bibb, M.J., 2000. A single amino acid substitution in region 1.2 of the principal sigma factor of *Streptomyces coelicolor* A3(2) results in pleiotropic loss of antibiotic production. *Mol. Microbiol.* 37, 995–1004.
- Álvarez-Álvarez, R., Martínez-Burgo, Y., Pérez-Redondo, R., Braña, A.F., Martín, J.F., Liras, P., 2013. Expression of the endogenous and heterologous clavulanic acid cluster in *Streptomyces flavogriseus*: why a silent cluster is sleeping. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 9451–9463.
- Álvarez-Álvarez, R., Rodríguez-García, A., Martínez-Burgo, Y., Robles-Reglero, V., Santamarta, I., Pérez-Redondo, R., Martín, J.F., Liras, P., 2014a. A 1.8-Mb-reduced *Streptomyces clavuligerus* genome: relevance for secondary metabolism and differentiation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 2183–2195.
- Álvarez-Álvarez, R., Rodríguez-García, A., Santamarta, I., Pérez-Redondo, R., Prieto-Domínguez, A., Martínez-Burgo, Y., Liras, P., 2014b. Transcriptomic analysis of *Streptomyces clavuligerus* Δ*ccaR::tsr*: effects of the cephamycin C-clavulanic acid C cluster regulator CcaR on global regulation. *Microb. Biotechnol.*, <http://dx.doi.org/10.1111/1751-7915.12109>.
- Baltz, R.H., 2011. Strain improvement in actinomycetes in the postgenomic era. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 657–666.
- Blanco, G., 2012. Comparative analysis of a cryptic thienamycin-like gene cluster identified in *Streptomyces flavogriseus* by genome mining. *Arch. Microbiol.* 194, 549–555.
- Chater, K.F., Wilde, L.C., 1976. Restriction of a bacteriophage of *Streptomyces albus* G involving endonuclease Sall. *J. Bacteriol.* 128, 644–650.
- Chen, Y., Wendt-Pienkowski, E., Shen, B., 2008. Identification and utility of FdmR1 as a *Streptomyces* antibiotic regulatory protein activator for fredericamycin production in *Streptomyces griseus* ATCC 49344 and heterologous hosts. *J. Bacteriol.* 190, 5587–5596.
- Eustáquio, A.S., Gust, B., Galm, U., Li, S.M., Chater, K.F., Heide, L., 2005. Heterologous expression of novobiocin and clorobiocin biosynthetic gene clusters. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2452–2459.
- Flinspach, K., Westrich, L., Kayser, 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.
- Forsman, M., Haggstrom, B., Lindgren, L., Jaurin, B., 1990. Molecular analysis of β-lactamases from four species of *Streptomyces*: comparison of amino acid sequences with those of other β-lactamases. *J. Gen. Microbiol.* 136, 589–598.
- Foulston, L.C., Bibb, M.J., 2010. Microbisporicin gene cluster reveals unusual features of lantibiotic biosynthesis in actinomycetes. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 13461–13466.
- Gomez-Escribano, J.P., Bibb, M.J., 2011. Engineering *Streptomyces coelicolor* for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *Microb. Biotechnol.* 4, 207–215.
- Gomez-Escribano, J.P., Bibb, M.J., 2014. Heterologous expression of natural product biosynthetic gene clusters in *Streptomyces coelicolor*: from genome mining to manipulation of biosynthetic pathways. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 41, 425–431.
- Goranovič, D., Blažič, M., Magdevska, V., Horvat, J., Kuščer, E., Polak, T., Santos-Aberturas, J., Martínez-Castro, M., Barreiro, C., Mrak, P., Kopitar, G., Kosec, G., Fujs, S., Martín, J.F., Petkovič, H., 2012. FK506 biosynthesis is regulated by two positive regulatory elements in *Streptomyces tsukubaensis*. *BMC Microbiol.* 12, 238.

- Gregory, M.A., Till, R., Smith, M.C., 2003. Integration site for *Streptomyces* phage phiBT1 and development of site-specific integrating vectors. *J. Bacteriol.* 185 (17), 5320–5323.
- Higgins, C.E., Hamill, R.L., Sands, T.H., Hoehn, M.M., Davis, N.E., 1974. The occurrence of desacetoxyccephalosporin C in fungi and *Streptomyces*. *J. Antibiot.* 27, 298–300.
- Hobbs, G., Frazer, C.M., Gardner, D.C.J., Cullum, J.A., Oliver, S.G., 1989. Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31, 272–277.
- Huang, S., Yudong, Z., Zhiwei, Q., Xiaoling, W., Mayca, O., Chen, L., He, J., Yu, Y., Deng, H., 2011. Identification and heterologous expression of the biosynthetic gene cluster for holomycin produced by *Streptomyces clavuligerus*. *Process Biochem.* 3, 811–816.
- Ishida, K., Hung, T.V., Liou, K., Lee, H.C., Shin, C.H., Sohng, J.K., 2006. Characterization of *pbpA* and *pbp2* encoding penicillin-binding proteins located on the downstream of clavulanic acid gene cluster in *Streptomyces clavuligerus*. *Biotechnol. Lett.* 28, 409–417.
- Ikeda, H., Kazuo, S.Y., Omura, S., 2014. Genome mining of the *Streptomyces avermitilis* genome and development of genome-minimized hosts for heterologous expression of biosynthetic gene clusters. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 41, 233–250.
- Jones, A.C., Gust, B., Kulik, A., Heide, L., Buttner, M.J., Bibb, M.J., 2013. Phage p1-derived artificial chromosomes facilitate heterologous expression of the FK506 gene cluster. *PLoS One* 8, e69319.
- Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., Hopwood, D.A., 2000. *Practical Streptomyces Genetics*. John Innes Foundation, Norwich, UK.
- Komatsu, M., Uchiyama, T., Omura, S., Cane, D.E., Ikeda, H., 2010. Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 2646–2651.
- Komatsu, M., Komatsu, K., Koizumi, H., Yamada, Y., Kozono, I., Izumikawa, M., Hashimoto, J., Takagi, M., Omura, S., Shin-ya, K., Cane, D.E., Ikeda, H., 2013. Engineered *Streptomyces avermitilis* host for heterologous expression of biosynthetic gene cluster for secondary metabolites. *ACS Synth. Biol.* 19, 384–396.
- Kumar, V., de la Fuente, J.L., Leitao, A.L., Liras, P., Martín, J.F., 1996. Effect of amplification or targeted disruption of the β -lactamase gene of *Nocardia lactamdurans* on cephamycin biosynthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45, 621–628.
- Kurt, A., Álvarez-Álvarez, R., Liras, P., Özcengiz, G., 2013. Role of the *cmcH-ccaR* intergenic region and *ccaR* overexpression in cephamycin C biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 5869–5880.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods* 25, 402–408.
- López-García, M.T., Santamarta, I., Liras, P., 2010. Morphological differentiation and clavulanic acid formation are affected in a *Streptomyces clavuligerus* *adpA*-deleted mutant. *Microbiology* 156, 2354–2365.
- Martín, J.F., Liras, P., 2010. Engineering of regulatory cascades and networks controlling antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Curr. Opin. Microbiol.* 13, 263–273.
- Medema, M.H., Trefzer, A., Kovalchuk, A., van den Berg, M., Müller, U., Heijne, W., Wu, L., Alam, M.T., Ronning, C.M., Nierman, W.C., Bovenberg, R.A., Breitling, R., Takano, E., 2010. The sequence of a 1.8-Mb bacterial linear plasmid reveals a rich evolutionary reservoir of secondary metabolic pathways. *Genome Biol. Evol.* 2, 212–224.
- Ochi, K., Hosaka, T., 2013. New strategies for drug discovery: activation of silent or weakly expressed microbial gene clusters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 87–98.
- Ohnishi, Y., Kameyama, S., Osaka, H., Horinouchi, S., 1999. The A-factor regulatory cascade leading to streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: identification of a target gene of the A-factor receptor. *Mol. Microbiol.* 34, 102–111.
- Ortiz de Oruá Lucana, D., Tröller, M., Schrempf, H., 2003. Amino acid residues involved in reversible thiol formation and zinc ion binding in the *Streptomyces reticuli* redox regulator FurS. *Mol. Genet. Genomics* 268, 618–627.
- Pan, Y., Liu, G., Yang, H., Tian, Y., Tan, H., 2009. The pleiotropic regulator AdpA-L directly controls the pathway specific activator of nikkomycin biosynthesis in *Streptomyces ansochromogenes*. *Mol. Microbiol.* 72, 710–723.
- Paradkar, A.S., Aidoo, K.A., Jensen, S.E., 1998. A pathway-specific transcriptional activator regulates late steps of clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Mol. Microbiol.* 27, 831–843.
- Paradkar, A.S., Aidoo, K.A., Wong, A., Jensen, S.E., 1996. Molecular analysis of a beta-lactam resistance gene encoded within the cephamycin gene cluster of *Streptomyces clavuligerus*. *J. Bacteriol.* 178, 6266–6274.
- Pérez-Llarena, F.J., Liras, P., Rodríguez-García, A., Martín, J.F., 1997a. A regulatory gene (*ccaR*) required for cephamycin and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*: amplification results in overproduction of both β -lactam compounds. *J. Bacteriol.* 179, 2053–2059.
- Pérez-Llarena, F., Martín, J.F., Galleni, M., Coque, J.J.R., Fuente, J.L., Frère, J.-M., Liras, P., 1997b. The bla gene of the cephamycin cluster of *Streptomyces clavuligerus* encodes a class A β -lactamase of low enzymatic activity. *J. Bacteriol.* 179, 6035–6040.
- Pérez-Llarena, F.J., Rodríguez-García, A., Enguita, F.J., Martín, J.F., Liras, P., 1998. The *pcd* gene encoding piperidine-6-carboxylate dehydrogenase involved in biosynthesis of α -amino adipic acid is located in the cephamycin cluster of *Streptomyces clavuligerus*. *J. Bacteriol.* 180, 4753–4756.
- Robles-Reglero, V., Santamarta, I., Álvarez-Álvarez, R., Martín, J.F., Liras, P., 2013. Transcriptional analysis and proteomics of the holomycin gene cluster in overproducer mutants of *Streptomyces clavuligerus*. *J. Biotechnol.* 163, 69–76.
- Salehi-Najafabadi, Z., Barreiro, C., Rodríguez-García, A., Cruz, A., López, G.E., Martín, J.F., 2014. The gamma-butyrolactone receptors BulR1 and BulR2 of *Streptomyces tsukubaensis*: tacrolimus (FK506) and butyrolactone synthetases production control. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98 (11), 4919–4936.
- Sambrook, J., Russell, D., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, third ed. Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sánchez, L., Braña, A.F., 1996. Cell density influences antibiotic biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Microbiology* 142, 1209–1220.
- Santamarta, I., López-García, M.T., Kurt, A., Nárdiz, N., Álvarez-Álvarez, R., Pérez-Redondo, R., Martín, J.F., Liras, P., 2011. Characterization of DNA-binding sequences for CcaR in the cephamycin-clavulanic acid supercluster of *Streptomyces clavuligerus*. *Mol. Microbiol.* 81, 968–981.
- Schmittgen, T.D., Zakrajsek, B.A., 2000. Effect of experimental treatment on house-keeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J. Biochem. Biophys. Methods* 46, 69–81.
- Sendouda, A., Urabe, H., Ogawara, H., 1993. Cloning, nucleotide sequence and expression of a β -lactamase gene from *Streptomyces lavendulae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 112, 343–348.
- Smanski, M.J., Casper, J., Peterson, R.M., Yu, Z., Rajski, S.R., Shen, B., 2012. Expression of the platencin biosynthetic gene cluster in heterologous hosts yielding new platencin congeners. *J. Nat. Prod.* 75, 2158–2167.
- Thai, W., Paradkar, A.S., Jensen, S.E., 2001. Construction and analysis of ss-lactamase-inhibitory protein (BLIP) non-producer mutants of *Streptomyces clavuligerus*. *Microbiology* 147, 325–335.
- Tong, L., Yuanyuan, D., Qiu, C., Jingtao, Z., Weiming, Z., Kui, H., Wenli, L., 2013. Cloning, characterization and heterologous expression of the indolocarbazole biosynthetic gene cluster from marine-derived *Streptomyces sanyensis* FMA. *Mar. Drugs* 11, 466–488.
- Wietzorek, A., Bibb, M., 1997. A novel family of proteins that regulates antibiotic production in streptomycetes appears to contain an OmpR-like DNA-binding fold. *Mol. Microbiol.* 25, 1181–1184.
- Zhou, Z., Gu, J., Du, Y.L., Li, Y.Q., Wang, Y., 2011. The omics era – toward a systems-level understanding of *Streptomyces*. *Curr. Genomics* 12, 404–416.

The Pathway-Specific Regulator *ClaR* of *Streptomyces clavuligerus* Has a Global Effect on the Expression of Genes for Secondary Metabolism and Differentiation

Yolanda Martínez-Burgo,^a Rubén Álvarez-Álvarez,^a Antonio Rodríguez-García,^{a,b} Paloma Liras^a

Área de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad de León, León, Spain^a; Instituto de Biotecnología de León, INBIOTEC, León, Spain^b

Streptomyces clavuligerus claR::aph is a *claR*-defective mutant, but in addition to its *claR* defect it also carries fewer copies of the resident linear plasmids pSCL2 and pSCL4 (on the order of 4×10^5 -fold lower than the wild-type strain), as shown by qPCR. To determine the function of *ClaR* without potential interference due to plasmid copy number, a new strain, *S. clavuligerus* Δ *claR::aac*, with *claR* deleted and carrying the wild-type level of plasmids, was constructed. Transcriptomic analyses were performed in *S. clavuligerus* Δ *claR::aac* and *S. clavuligerus* ATCC 27064 as the control strain. The new Δ *claR* mutant did not produce clavulanic acid (CA) and showed a partial expression of genes for the early steps of the CA biosynthesis pathway and a very poor expression (1 to 8%) of the genes for the late steps of the CA pathway. Genes for cephamycin C biosynthesis were weakly upregulated (1.7-fold at 22.5 h of culture) in the Δ *claR* mutant, but genes for holomycin biosynthesis were expressed at levels from 3- to 572-fold higher than in the wild-type strain, supporting the observed overproduction of holomycin by *S. clavuligerus* Δ *claR::aac*. Interestingly, three secondary metabolites produced by gene clusters SMCp20, SMCp22, and SMCp24, encoding still-cryptic compounds, had partially or totally downregulated their genes in the mutant, suggesting a regulatory role for *ClaR* wider than previously reported. In addition, the *amfR* gene was downregulated, and consequently, the mutant did not produce aerial mycelium. Expression levels of about 100 genes in the genome were partially up- or downregulated in the Δ *claR* mutant, many of them related to the upregulation of the sigma factor-encoding *rpoE* gene.

The *claR* gene, located in the *Streptomyces clavuligerus* CA gene cluster, encodes a LysR-type regulator (1, 2). LysR-type transcriptional regulators (LTTRs) follow the pattern of the model regulator controlling *lysA* expression in *Enterobacteriaceae* (3). The LTTRs act on metabolic pathways but also in quorum sensing, virulence, motility, nitrogen fixation, oxidative stress responses, and other systems (3, 4, 5). These global transcriptional regulators act mostly as activators but also as repressors and control single genes or operons. The LysR proteins are tetramers, have a helix-turn-helix (HTH) motif close to the N terminus, and bind palindromic sequences identified as T-N₁₁-A (6). The binding affinity is usually determined by a ligand coinducer molecule (7).

The presence of LysR-type regulators in antibiotic biosynthesis gene clusters is relatively frequent (8, 9, 10). In undecylprodigiosin and actinorhodin production, the autoregulated StgR LTTR negatively controls the expression of the *redD* and *actII-orf4* genes encoding pathway-specific activators (11).

The *claR* gene of *S. clavuligerus* is expressed as a monocistronic transcript that encodes a protein of 431 amino acids (M_r , 47,080). *ClaR* contains HTH motifs in its amino- and carboxyl-terminal regions. The HTH close to the C-terminal end of the protein contains, fully conserved, the S³⁵²Q, T³⁵⁷, and L³⁶³E positions present in all LysR-type regulators; an additional HTH motif present at the N-terminal end of *ClaR* (amino acids 3 to 51) is less conserved (2). Disruption of the *claR* gene resulted in lack of CA production and accumulation of the intermediate clavaminic acid (1). Amplification of *claR* in a multicopy plasmid increased 3-fold clavulanic acid production, whereas cephamycin C production was significantly reduced (2).

Northern transcriptional analysis using RNA isolated from the wild type and a *claR* mutant obtained in S. E. Jensen's laboratory showed that the expression of genes encoding the early steps of the

pathway, *ceaS2* to *cas2*, was normal in the mutant (1); these results and the accumulation of the intermediate clavaminic acid in the *claR* mutant supported a *ClaR* control on the expression of genes for the late steps of the clavulanic acid pathway.

Expression of *claR* itself is subject to control by CcaR, the cephamycin C-clavulanic acid supercluster specific regulator. Northern hybridization (2) or S1 analysis (1) showed undetectable *claR* transcription in *ccaR*-disrupted mutants. Transcriptomic studies indicated that the *ccaR*-disrupted mutant expressed *claR* at a level on the order of 16- to 24-fold lower than for the wild-type strain (12). Recombinant CcaR protein purified from *Escherichia coli* gave two complexes of gel mobility shift on probes carrying the *claR* promoter, showing that CcaR had higher specificity for the lower-mobility complex, as detected by competition studies (13).

Improving our knowledge of *claR* function has been hampered by the difficulty in purifying the recombinant *ClaR* (r*ClaR*) in an

Received 22 March 2015 Accepted 8 July 2015

Accepted manuscript posted online 17 July 2015

Citation Martínez-Burgo Y, Álvarez-Álvarez R, Rodríguez-García A, Liras P. 2015. The pathway-specific regulator *ClaR* of *Streptomyces clavuligerus* has a global effect on the expression of genes for secondary metabolism and differentiation. *Appl Environ Microbiol* 81:6637–6648. doi:10.1128/AEM.00916-15.

Editor: M. A. Elliot

Address correspondence to Paloma Liras, paloma.liras@unileon.es.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00916-15>.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved. doi:10.1128/AEM.00916-15

TABLE 1 Strains used in this work

Strain	Origin	Characteristics
<i>S. clavuligerus</i> ATCC 27064	ATCC	Wild-type strain. Produces cephamycin C and clavulanic acid. Does not produce holomycin. Carries standard copy no. of plasmids pSCL2 and pSCL4.
<i>S. clavuligerus</i> Δ cl <i>aR</i> ::aac	This work	Clavulanic acid nonproducer, holomycin producer, apramycin-resistant strain. Standard copy no. of pSCL2 and pSCL4.
<i>S. clavuligerus</i> cl <i>aR</i> ::aph	Fuente et al., 2002 (16)	Clavulanic acid nonproducer, holomycin producer strain. Low copy no. of pSCL2 and pSCL4. Obtained by transformation of protoplasts. Renamed <i>S. clavuligerus</i> cl <i>aR</i> ::aph pSCL ^{low}
<i>S. clavuligerus</i> oppA2::aph pSCL ^{low}	Lorenzana et al., 2004 (32); Álvarez-Álvarez et al., 2014 (21)	Clavulanic acid nonproducer, holomycin producer strain. Kanamycin resistant. Low copy no. of pSCL2 and pSCL4. No sporulating strain. Used in qPCR as low plasmid copy no. control strain.
<i>S. clavuligerus</i> Δ cl <i>aR</i> ::aac(pMS83-cl <i>aR</i>)	This work	Clavulanic acid producer, holomycin nonproducer, apramycin- and hygromycin-resistant strain. Standard copy no. of pSCL2 and pSCL4. Sporulating strain.
<i>S. clavuligerus</i> Δ cl <i>aR</i> ::aac(pMS83)	This work	Clavulanic acid nonproducer, holomycin producer, apramycin- and hygromycin-resistant strain. Standard copy no. of pSCL2 and pSCL4.

active form. Therefore, in this work we focused our attention on the transcriptomic analysis of the strain *S. clavuligerus* Δ cl*aR*::aac in comparison to the wild-type strain. The analysis revealed that Cl*aR* has a wider effect than previously thought, affecting *S. clavuligerus* development and additional clusters for secondary metabolites.

MATERIALS AND METHODS

Strains and culture conditions. The strains used in this work are listed in Table 1. A preculture of these strains was grown in Trypticase soy broth (TSB) for 24 h at 28°C and 220-rpm shaking to an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 6.5. These seed cultures were used to inoculate (5%, vol/vol) duplicated 500-ml triple-baffled flasks containing 100 ml of SA defined medium (14), and the culture were grown for 72 h under the same conditions. ME medium (15) was used to analyze the aerial mycelium formation and sporulation of the strains. Apramycin (50 µg/ml), hygromycin (50 µg/ml), or nalidixic acid (25 µg/ml) was added to the cultures when required.

Strain construction. *S. clavuligerus* Δ cl*aR*::aac was obtained from *S. clavuligerus* ATCC 27064 using a SuperCos1 cosmid carrying the whole clavulanic acid gene cluster, oligonucleotides cl*aR*-F and cl*aR*-R (TCTTTACTGGACGCGGTGGGACACTGCGGAGACCTCATGATTCCGGGGATCCGCTCGACC and CCGCCCCGGTCCGGTCCGACCCGGTCCGGGCGCTCATGTAGGCTGGAGCTGCTTC, where nucleotides in bold correspond to the cl*aR* sequence) and the ReDirect Method. In the apramycin-resistant exconjugants, the cl*aR* deletion was reconfirmed by PCR, using oligonucleotides cyp-F and Am-R (ACATCGGGACCATCTCCTC and TCAGCCAATCGACTGGCGAGCGGCATCGCATTTCTCGCAT), and by sequencing of the amplicon.

To complement *S. clavuligerus* Δ cl*aR*::aac, the cl*aR* gene with its own promoter (1,516 bp) was amplified by PCR using oligonucleotides cl*aR*_cF (GGGCGCGTTCCGCTTCCCG) and cl*aR*_cR (CCGCTCAGCCGGACATCCG). The amplified DNA fragment was sequenced and subcloned into the EcoRV site of the integrative vector pMS83, leading to pMS83-cl*aR*. The complemented mutant *S. clavuligerus* Δ cl*aR*::aac(pMS83-cl*aR*) was obtained by conjugation and selected by apramycin and hygromycin resistance. The presence of cl*aR* in this strain was reconfirmed by PCR and sequencing of the amplicon. *S. clavuligerus* Δ cl*aR*::aac(pMS83) was used as the complementation control strain.

Antibiotic assays. Clavulanic acid and cephamycin C were quantified as indicated by Pérez-Redondo et al. (2). Holomycin was determined by bioassay against *Micrococcus luteus* ATCC 9341 as described by de la Fuente et al. (16). Clavaminic acid was detected as described by Paradkar et al. (1).

Nucleic acids isolation. DNA was isolated as described by Pospiech and Neumann (17). For RNA isolation, samples from the *Streptomyces* cultures were stabilized with 2 volumes of RNA Protect Bacteria Reagent (Qiagen) for 5 min, and 150 µl lysozyme (30 mg/ml) in Tris-EDTA (TE) buffer was added to the stabilized mycelium pellet of 1 ml of culture samples. After 10 min, 600 µl buffer RLT (Qiagen) with β-mercaptoethanol was added to the samples, mixed by vortex, transferred to Lysing Matrix B (MP Biomedicals) microtubes, and processed in a FastPrep instrument (MP Biomedicals) with the following program: 30 s, 6.5 m/s; 1 min at 0°C; 30 s, 6.5 m/s; 1 min at 0°C. One volume of phenol-chloroform-isoamyl alcohol was added to the extracts, and the aqueous phase was applied to RNeasy minikit columns (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. RNA preparations were incubated with DNase I (Qiagen) to eliminate DNA contamination. When used in reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR) analysis, the RNA preparations were further treated with DNase I (Ambion) to eliminate all DNA contamination. The RNA was quantified spectrophotometrically in a NanoDrop ND-1000 UV-vis (Thermo Scientific), and its integrity was determined using a Bioanalyzer 2100 and the RNA 6000 Nano LabChip kit (Agilent Technologies). Only RNAs with RNA integrity values above 7.0 were used.

PCR. PCRs were performed as described by Kieser et al. (18) with a T-gradient thermocycler (Biometra). The PCR mixture contained, in a 20-µl volume, 40 ng DNA template, 0.2 mM each deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 0.75 mM MgCl₂, 5% dimethyl sulfoxide (DMSO), and 0.1 units of GoTaq DNA Polymerase (Promega). The amplification was carried out with an initial 3-min, 95°C denaturing step. The cycles comprised a denaturing step of 30 s at 95°C, annealing for 30 s at 68°C, and extension for 3.5 min at 72°C. Successive cycles were carried out, decreasing the annealing temperature by 1°C/cycle between 68°C and 58°C. The amplification was completed with a final extension of 5 min at 72°C. The EcoRI-HindIII 1,382-bp fragment from pIJ774 was used to obtain the deletion cassette (19). Quantification and purity analysis of PCR products were performed using a NanoDrop ND-1000 UV-vis (Thermo Scientific), and the fidelity of the amplification was confirmed by sequencing.

qPCR. Detection and quantification of plasmids pSCL2 and pSCL4 were carried out using 20 ng DNA by qPCR as described by Lee et al. (20). To detect and quantify pSCL2, the *parA*_{pSCL2} gene was used, and the *brp*, *parB*_{pSCL4}, and *traA* genes were used to detect and quantify pSCL4. The chromosomal genes *adpA* and *hrdB* were used as controls. The oligonucleotides used in this experiment were previously described by Álvarez-Álvarez et al. (21).

RT-qPCR. Gene expression analysis and quantification were performed by RT-qPCR as described by López-García et al. (22) using the

$2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (where C_T is threshold cycle) (23, 24) and the constitutive housekeeping gene *hrdB* gene as internal control (25). cDNAs were synthesized as described by López-García et al. (22). Negative controls were always carried out to confirm the absence of contaminating DNA.

Microarray design. (i) Prediction of noncoding RNAs. *S. clavuligerus* genome sequence and annotation (5,710 chromosomal coding sequences [CDS], 1,581 pSCL4 CDS, 18 rRNA, and 66 tRNA) were downloaded from StrepDB (<http://strepdb.streptomyces.org.uk/>). To identify noncoding RNA (ncRNA) in the genome sequence, two procedures were used. First, 27 sequences of small RNA (sRNA) of the closely related species *Streptomyces avermitilis* were used to identify homologous sequences in the genome of *S. clavuligerus* by means of BLAST searches. These sequences were obtained from the StrepDB database (*ssrA*, *srp*, and *mpB* genes) and from the tRNADB database of predicted ncRNA (26). In this way, 20 sequences were identified (systematic names, SCLAV_mr001 to SCLAV_mr020). Second, the procedure and nocoRNAC program of Herbig and Nieselt (27) were used to predict 164 ncRNAs in the chromosome (systematic names with prefix “SCLAV_nr”) and 30 ncRNAs in the pSCL4 plasmid (SCLAV_pnr). Thus, a total of 7,589 loci were the starting target set for the probe design.

Microarray probes (45- to 60-mer) were designed with the online tool eArray (Agilent) for gene expression probes (1 to 3 probes per locus) and with the chipD program (28) for tiling probes. The eArray procedure was the “ T_m matching methodology” used with the option “best probe methodology” (DSCV01 probes) or “best distribution” (DSCV02 probes, an option used to obtain 3 probes per gene only for those genes larger than 1,500 nucleotides [nt]); in both cases, 85°C was the “preferred probe T_m .” The chipD procedure was used to cover 13 genome regions for a deeper analysis, including the known or putative biosynthesis clusters for secondary metabolites. The tiling design (DSCV05, 5,559 probes) included the following parameters: Na concentration, 1.134; target T_m , 97; T_m model, 3; and interval size, 30. Finally, a total of 14,867 probes were selected, covering 98.85% of the targeted locus. Microarrays were manufactured by Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) in the format $8 \times 15K$.

(ii) **Microarray labeling and hybridization.** RNA was extracted from the culture samples at 22.5, 46.5, and 60 h. The analysis was performed for two biological replicates for each condition (two strains and three growth times). Labeling of RNA preparations with Cy3-dCTP, labeling of genomic DNA as the reference sample with Cy5-dCTP, and the purification procedures were carried out as indicated previously (21), except that 2.5 pmol was the amount of Cy5-gDNA added to 50 μ l of the hybridization solution. The hybridization conditions, washing, scanning with Agilent Scanner G2565BA, and the quantification of the images were carried out as previously described (29).

Transcriptome analysis. Microarray fluorescence data were normalized and analyzed with the Bioconductor package limma (30).

First, net fluorescence intensities were calculated as mean foreground minus background median; when this subtraction was lower than the background standard deviation, the latter value was used as the surrogate.

Second, the binary logs of Cy3/Cy5 net intensities were normalized (M_g value) with cycling loess and global median using spot weights (assigning weights of 1 for CDS probes and of $1E^{-6}$ for the rest of the probes), so the only values taken into account in the normalization were those from the chromosome coding genes, while the pSCL4 probes were practically discarded. The M_g value is proportional to the abundance of the transcript for a particular gene (31).

Third, the spot values corresponding to the same probe sequence were averaged, and then the probe values of the same locus were averaged. Tiling probe data were discarded for this analysis.

The M_g transcription values of the six experimental conditions were compared using three contrasts, mutant versus wild type, corresponding to the three studied growth times. For each gene, P values and M_c values were calculated (three sets of values, one for each comparison). M_c values

are the binary log of the differential transcription between the mutant and the wild-type strain.

The Benjamini-Hochberg (BH) false-discovery rate correction was applied to the P values. For each comparison, a result was considered statistically significant if the BH-corrected P value was ≤ 0.05 . A positive M_c value indicates upregulation, and a negative M_c value indicates downregulation.

Microarray data accession number. The microarray data used in this work have been deposited in the National Center for Biotechnology Information–Gene Expression Omnibus database under accession number GSE66683.

RESULTS

The mycelium of the old mutant *S. clavuligerus claR::aph* carries a low number of copies of plasmids pSCL4 and pSCL2. The *S. clavuligerus oppA2::aph* strain used previously in our laboratory (16, 32) was shown by qPCR amplification and transcriptomic analysis to carry in the mycelium 25,000-fold fewer copies of plasmid pSCL2 and 10,000-fold fewer copies of plasmid pSCL4 than the wild-type strain (21). The lack of sporulation of *S. clavuligerus oppA2::aph*, previously believed to be due to the *oppA2* mutation (32), was shown to be dependent on the lack of pSCL4 (21). To discriminate whether the effects described for the mutations in the clavulanic acid gene cluster are real or due to the absence of plasmids in the mutant strains, the levels of plasmids pSCL2 and pSCL4 were quantified in our collection of mutant strains and compared to those of the wild-type strain. The *parA* gene in pSCL2 and 11 genes located in pSCL4 (SCLAV_p0032, p0126, p0353, p0528, p0713, p0828, p1090, p1250, p1328, p1452, and p1539) were quantified by qPCR. Levels of the linear plasmids similar to those of the wild-type strain were found in strains *S. clavuligerus ccaR::aph*, *S. clavuligerus cyp::tsr*, *S. clavuligerus orf13::apr*, *S. clavuligerus orf14::aph*, *S. clavuligerus oppA1::acc*, *S. clavuligerus relA::neo*, and *S. clavuligerus Δ adpA* (22, 32, 33, 34, 35, 36). However, the old *S. clavuligerus claR::aph* strain, obtained by transformation of protoplasts to disrupt the *claR* gene (16), was found to give a very low qPCR DNA amplification of genes located in either pSCL2 or pSCL4 (Fig. 1A), suggesting that this mutant has a low number of copies of both plasmids. A transcriptomic study performed as described by Álvarez-Álvarez et al. (12) confirmed that genes located in the pSCL2 and pSCL4 plasmids gave a very poor transcription signal in *S. clavuligerus claR::aph* (data not shown). Therefore, the old *S. clavuligerus claR::aph* strain has now been renamed *S. clavuligerus claR::aph pSCL^{low}*. To distinguish the phenotypes due to the absence of the *ClA*R regulator from the effects due to the lack of linear plasmids, we constructed a new mutant with *claR* deleted, which carried a normal number of copies of pSCL2 and pSCL4. The new strain, named *S. clavuligerus Δ claR::aac*, was constructed by the ReDirect method using *S. clavuligerus* ATCC 27064 as the parental strain (Table 1), and its correct number of copies of plasmids was confirmed by qPCR (Fig. 1A). The old *S. clavuligerus claR::aph pSCL^{low}* mutant did not produce clavulanic acid but produced larger amounts of cephamycin C and of holomycin than the wild-type strain (16). When tested by bioassay, the new *S. clavuligerus Δ claR::aac* broth cultures did not contain clavulanic acid at any time during the fermentation. These culture broths contained about 40% more cephamycin C than those of the parental strain *S. clavuligerus* ATCC 27064 at 72 h of fermentation and produced significant amounts of holomycin (Fig. 1B). Since the same pattern of antibiotic production was found in both *claR*-null strains, we conclude that these effects were due to the lack of *ClA*R.

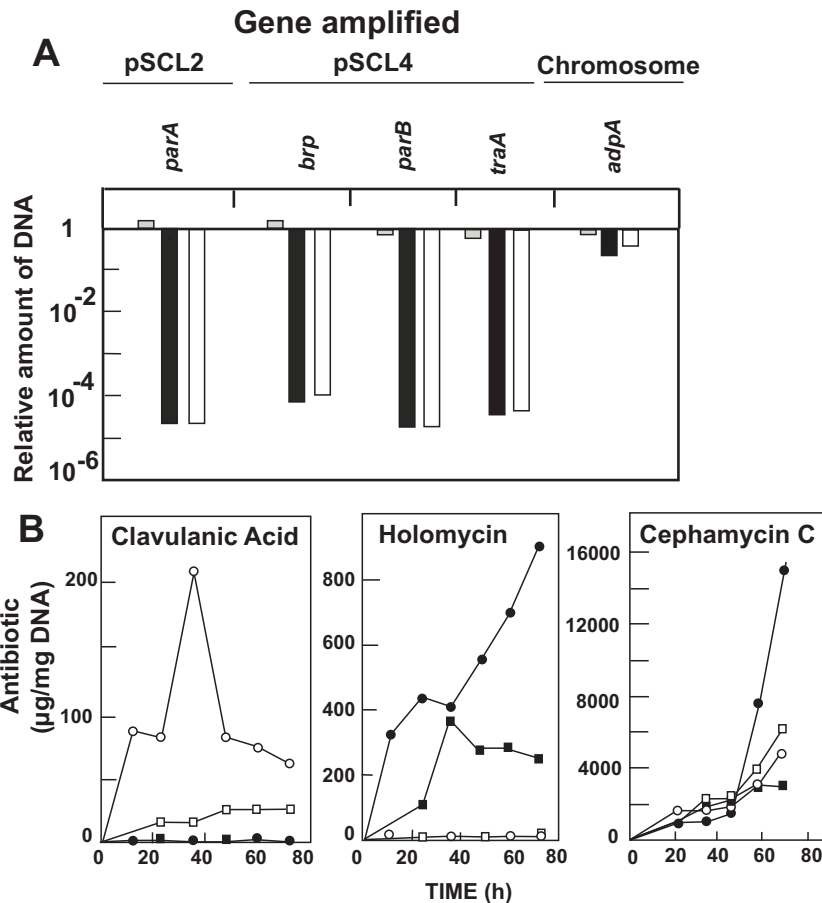


FIG 1 Plasmid copy number and antibiotic production by *S. clavuligerus* Δ *claR*::*aac*. (A) Relative amount of DNA measured by qPCR of the genes indicated above. DNA samples were obtained from *S. clavuligerus* *claR*::*aph* pSCL^{low} (black columns), *S. clavuligerus* Δ *claR*::*aac* (gray columns), and *S. clavuligerus* *oppA2*::*aph* pSCL^{low} (white columns). The relative amounts of DNA shown for the three mutant strains were determined by comparison to the amounts obtained with wild-type *S. clavuligerus*. (B) Production of clavulanic acid (left panel), holomycin (central panel), and cephamycin C (right panel) by *S. clavuligerus* ATCC 27064 (white circles), *S. clavuligerus* Δ *claR*::*aac* (black circles), *S. clavuligerus* Δ *claR*::*aac*(pMS83) (black squares), and *S. clavuligerus* Δ *claR*::*aac*(pMS83-*claR*) (white squares).

Transcriptomic analysis of *S. clavuligerus* Δ *claR*::*aac* in comparison to the parental *S. clavuligerus* ATCC 27064. The differential transcriptomic analysis between the *S. clavuligerus* Δ *claR*::*aac* mutant and the wild-type parental strain were performed on 22.5-, 46.5-, and 60-h SA-grown culture samples. The transcriptomic results were filtered for the three sampling times, applying the criteria of $M_c \geq 1.0$ or $M_c \leq -2.0$ and a BH-corrected P value of ≤ 0.05 , to restrict the data to only those genes that were strongly affected by the lack of *Cl*aR. By these criteria, 103 genes were clearly downregulated and 64 genes were upregulated in the Δ *claR* mutant.

Differential transcription of the clavulanic acid (CA) and clavam gene clusters. The effect produced by the lack of *Cl*aR on the CA biosynthesis gene expression is shown in Fig. 2. Genes for the early steps of the pathway were relatively well expressed (39 to 56% in relation to the wild-type strain). All the genes for the late steps of CA biosynthesis (*gcas*, *orf16*, *oppA2*, *orf14*, *orf13*, *orf12*, *cyp-fd*) had very low expression levels, between 1% (*orf16*) and 8% (*car*), in relation to those of the control strain. The fluorescence value for the *claR* probe, a gene that is not present in the mutant, indicated a background level of 1.3% in relation to the wild-type-

strain-derived value. Therefore, we might conclude that the late genes for CA biosynthesis, as well as the two oligopeptide permease-encoding genes *oppA1* and *oppA2* (32) with differential transcription of 3.1% and 1.2%, respectively, are, for all practical purposes, not expressed in the Δ *claR* mutant (Fig. 2A). Only *car*, a gene divergent from *claR*, which encodes the enzyme for the last step of the pathway, is partially expressed (8%). All the cephamycin C-clavulanic acid supercluster genes putatively involved in β -lactam antibiotic resistance (*pbpA*, *pbp2*, *pcbR*) were upregulated in the Δ *claR* mutant. This finding is important and correlates with the increased production of cephamycin C. An expression increase is observed at 22.5 h of culture for all the cephamycin C biosynthesis genes in the *S. clavuligerus* Δ *claR*::*aac* strain, explaining the increase of cephamycin production observed in the mutant; however, all the biosynthesis genes' expression decreases thereafter.

Interestingly, the clavam gene cluster (SCLAV_2921 to 2935), which is located far from the CA cluster (37), showed no significant differences in the expression of most genes. Only *cvm5* and *cvm7* were slightly upregulated (2.0-fold and 2.4-fold, respectively) and *cvm3* was downregulated (2.4-fold) in the mutant, at

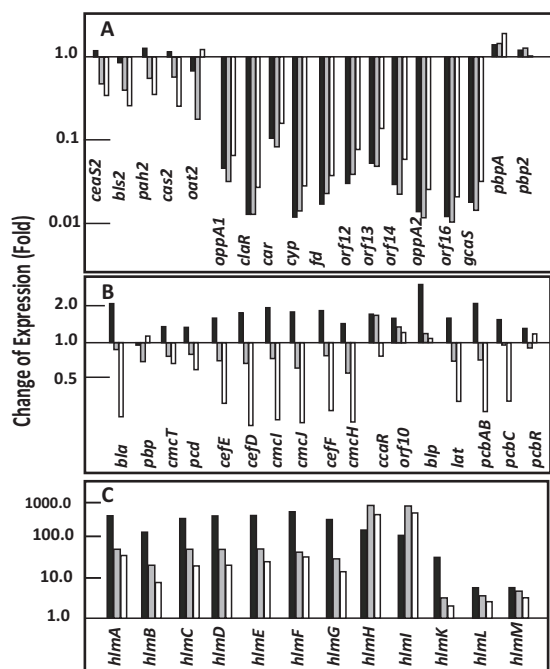


FIG 2 Effects of the lack of *ClrA* on transcription of clavulanic acid, cephamycin C, and holomycin biosynthesis genes. Transcriptomic results of genes for clavulanic acid biosynthesis (A), cephamycin C biosynthesis (B), and holomycin biosynthesis (C) in *S. clavuligerus* Δ *clrA::aac* compared to *S. clavuligerus* ATCC 27064. The columns represent the average of the fold change of expression at 22.5 h (black columns), 46.5 h (gray columns), and 60 h (white columns). The corresponding gene is indicated at the bottom of the columns. The values are compared to those of the control strain, *S. clavuligerus* ATCC 27064, taken as 1.

46.5 h of culture. In the clavam paralogous gene cluster (SCLAV_p1069 to p1082), located in the pSCL4 megaplasmid, the *bls1*, *pah1*, *cvm6P*, and *orfB* genes were upregulated (2.2- to 5.8-fold) (data not shown). The cluster SMCp25 (SCLAV_p1508 to SCLAV_p1510) (38) showed a downregulation of 21-fold on average. This cluster contains a clavamate synthase-like oxygenase (18-fold downregulated) and a putative carbamoyltransferase.

Differential transcription of the cephamycin C and holomycin gene clusters. All the genes in the cephamycin C gene cluster were moderately upregulated at 22.5 h of culture in the Δ *clrA* mutant, with an average fold change of 1.7 at this sampling time, but their expression decreased at 46.5 and 60 h of culture (Fig. 2B). The *hlm* genes, encoding enzymes for holomycin biosynthesis (Fig. 2C), showed diverse expression changes. The expression increases were small for *hlmK*, *hlmL*, and *hlmM* genes (14-fold change average at 22.5 h). The other *hlm* genes had a large expression increase at 22.5 h, on the order of 250.7-fold change average. These high expression differences decreased at later sampling times. Only two genes, *hlmI* and *hlmH*, showed a high and maintained upregulation at all sampling times with maximum differences in relation to the wild-type strain at 46.5 h and 60 h. The *hlmI* gene encodes the thioredoxin-like dithiol oxidase forming the disulfide bond that cyclizes the second ring in holomycin (39). The *hlmH* gene encodes an MSF-type transporter, and its role in holomycin production is still unknown (40).

The differences in the cephamycin C biosynthesis gene expression did not meet the criteria initially applied to the data ($M_c \geq 1.0$

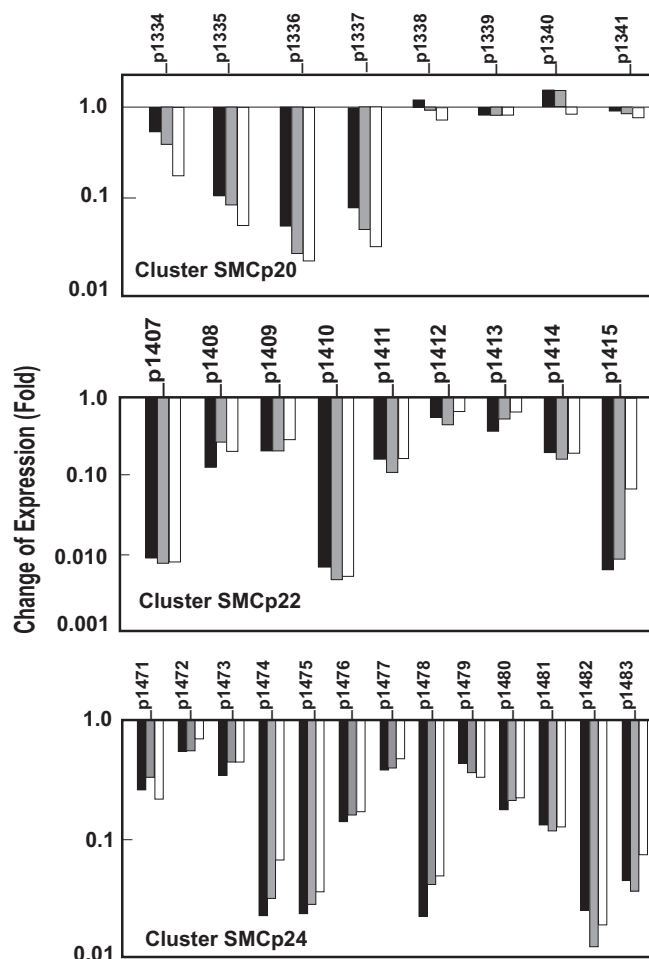


FIG 3 Effects of the lack of *ClrA* on the SMCp20, SMCp22, and SMCp24 gene cluster transcription. Transcriptomic results of genes of the SMCp20 cluster (top), the SMCp22 cluster (middle), and the SMCp24 cluster (bottom) in *S. clavuligerus* Δ *clrA::aac* compared to *S. clavuligerus* ATCC 27064. The columns represent the average of the fold change of expression at 22.5 h (black columns), 46.5 h (gray columns), and 60 h (white columns). The corresponding gene is indicated at the top of the columns. The values are compared to those of the control strain, *S. clavuligerus* ATCC 27064, taken as 1.

or $M_c \leq -2.0$ and BH-corrected P value of ≤ 0.05); however, the differences observed correlated well with the different cephamycin C production levels by *S. clavuligerus* Δ *clrA::aac* and the wild-type strain (Fig. 1B).

Other putative secondary metabolites gene clusters affected by the lack of *ClrA*. Three clusters (SMCp20, SMCp22, and SMCp24) putatively involved in secondary metabolite formation (38) and located in plasmid pSCL4 were specially affected by the lack of *ClrA*. The block of genes SCLAV_p1334 to SCLAV_p1337 (cluster SMCp20) was strongly downregulated. These genes encode proteins with a UPF0089 domain, an acyl-coenzyme A (acyl-CoA) synthetase, a caffeoyl O-methyltransferase, and a histidine ammonia-lyase, respectively. The remaining genes in the cluster, encoding nonribosomal peptide synthetases (SCLAV_p1339, SCLAV_p1340, SCLAV_p1341) were not affected (Fig. 3, top panel). The SMCp20 cluster appears to be involved in the biosynthesis of a nonribosomal peptide containing a caffeic acid-derived moiety. All the genes of cluster SMCp22 were downregulated, es-

A) Genes encoding regulatory proteins which are up-regulated or down-regulated in *S. clavuligerus* Δ *cl**aR*::*aac*

Gene	Product	M_c			BH-corrected <i>P</i> -value at			Fold change at		
		22.5 h	46.5 h	60 h	22.5 h	46.5 h	60 h	22.5 h	46.5 h	60 h
Up-regulated										
SCLAV_4082	RNA polymerase sigma factor RpoE	1.98	2.60	1.18	3.93E ⁻⁰⁹	1.67E ⁻¹⁰	4.57E ⁻⁰⁶	3.96	6.06	2.27
SCLAV_5384	GntR-type transcriptional regulator	1.07	1.11	1.58	4.71E ⁻⁰³	2.16E ⁻⁰³	5.78E ⁻⁰⁵	2.11	2.16	3.01
SCLAV_5409	ArsR-type transcriptional regulator	1.20	1.47	1.77	5.64E ⁻⁰⁵	3.52E ⁻⁰⁶	3.94E ⁻⁰⁷	2.30	2.79	3.43
SCLAV_5692	LysR-type transcriptional regulator	1.32	1.32	1.98	7.86E ⁻⁰³	4.70E ⁻⁰³	9.51E ⁻⁰⁵	2.51	2.51	3.96
SCLAV_p0561	Translation initiation inhibitor	1.02	1.99	2.22	1.70E ⁻⁰¹	2.61E ⁻⁰³	7.70E ⁻⁰⁴	2.03	3.97	4.68
SCLAV_p1122	StaR, Staurosporine regulator	1.54	2.94	2.30	1.79E ⁻⁰²	2.40E ⁻⁰⁵	3.10E ⁻⁰⁴	2.92	7.71	4.92
Down-regulated										
SCLAV_4956	AmfR, Transcriptional regulator	-5.28	-5.92	-5.62	1.37E ⁻¹⁰	2.57E ⁻¹¹	8.70E ⁻¹¹	39.0	60.9	49.4
SCLAV_p1354	AraC-type transcriptional regulator	-5.29	-4.82	-3.71	2.27E ⁻¹⁰	5.90E ⁻¹⁰	2.46E ⁻⁰⁸	39.4	28.4	13.1
SCLAV_p1438	Sensor protein	-3.92	-4.25	-2.33	1.38E ⁻⁰⁷	7.14E ⁻⁰⁸	1.27E ⁻⁰⁴	15.2	19.1	5.03
SCLAV_p1439	Response regulator	-3.21	-3.32	-2.34	8.89E ⁻⁰⁶	5.01E ⁻⁰⁶	2.53E ⁻⁰⁴	9.31	10.0	5.07
SCLAV_p1581	Regulator of the BadM/Rrf2 family	-4.52	-4.25	-4.71	1.88E ⁻⁰⁸	5.43E ⁻⁰⁸	1.94E ⁻⁰⁸	23.1	19.1	26.3
SCLAV_p1587	LysR-type transcriptional regulator	-3.20	-3.31	-3.62	9.77E ⁻⁰⁶	3.93E ⁻⁰⁶	1.36E ⁻⁰⁶	9.22	9.9	12.3

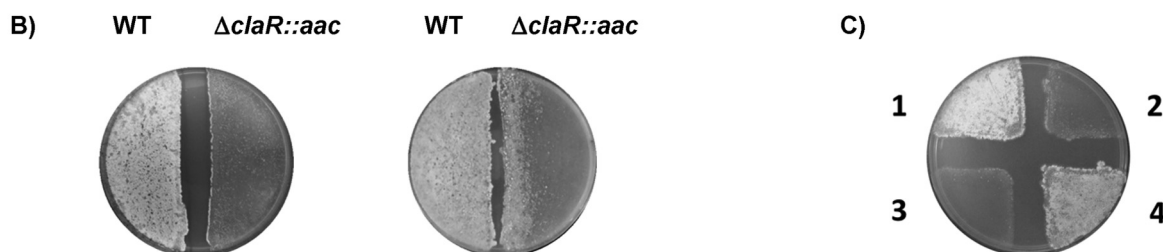


FIG 4 Different transcription of genes encoding regulators. (A) Regulatory genes up- or downregulated in *S. clavuligerus* Δ *cl**aR*::*aac*. Note that the shaded data correspond to downregulated genes. (B) Plates of ME medium at 7 days (left plate) and 12 days (right plate) of culture. *S. clavuligerus* ATCC 27064 (WT) is grown at the left side of the plates. *S. clavuligerus* Δ *cl**aR*::*aac* is grown at the right side of each plate. Note in the 12-day culture the formation of aerial mycelium on the *S. clavuligerus* Δ *cl**aR*::*aac* lawn when grown in the proximity of the wild-type strain. (C) Aerial mycelium and sporulation by *S. clavuligerus* ATCC 27064 (1), *S. clavuligerus* Δ *cl**aR*::*aac* (2), *S. clavuligerus* Δ *cl**aR*::*aac*(pMS83) (3), and *S. clavuligerus* Δ *cl**aR*::*aac*(pMS83-*cl**aR*) (4).

pecially SCLAV_p1407, encoding a pentalenene synthase (140-fold down-expressed), SCLAV_p1410, encoding a protein with a DUF397 domain, and SCLAV_p1415, encoding a hydrolase (Fig. 3, middle panel); the cluster genes showed an average of 5-fold downregulation in the mutant strain. Also, all the genes in cluster SMCp24 were downregulated in the Δ *cl**aR* mutant (average, 4.75-fold decrease), but specially affected were (i) SCLAV_p1474 and SCLAV_p1475, encoding a putative indigoidine synthase and a transporter, and (ii) SCLAV_p1478, SCLAV_p1482, and SCLAV_p1483 for two DUF-domain-containing proteins and a hypothetical protein, respectively (Fig. 3, bottom panel). The products of clusters SMCp20, SMCp22, and SMCp24 have not yet been characterized.

Other genes affected in the Δ *claR* mutant. (i) Regulatory genes.** Twelve regulatory genes were up- or downregulated in the Δ *cl**aR* mutant (Fig. 4). Six genes were upregulated, with an average increase of 4.2-fold. A high change (6-fold increase) was observed in SCLAV_4082, a gene annotated as *rpoE*, which encodes the RNA polymerase sigma factor RpoE. The orthologous gene of *S. coelicolor* is *sigR*, encoding the SigR regulator, which, coordinated with the anti-sigma factor RsaR, controls the cellular redox homeostasis and a regulon of 160 genes (41). Strongly affected was also *staR* (SCLAV_p1122), encoding the staurosporine biosynthesis transcriptional activator (42). This gene showed a 7.7-fold increase in the mutant; surprisingly, the staurosporine biosynthesis genes were not affected, with the exception of SCLAV_p1123, en-

coding a methyltransferase, which was upregulated at all sampling times, with a maximum change of 70-fold at 46.5 h.

Six regulatory genes were downregulated by the lack of *Cl**aR*, with an average change of 24.6-fold. The most affected downregulated gene was SCLAV_4956, encoding the response transcriptional regulator *AmfR*, with a 61-fold change. This gene is orthologous to *S. coelicolor ramR* and *S. griseus amfR* (43, 44); the latter is known to control the operon *amfTSBA*, which is strictly required for aerial mycelium formation. This low expression of *amfR* supports the observation that *S. clavuligerus* Δ *cl**aR*::*aac* is unable to form aerial mycelium (Fig. 4B) (see Discussion). The *S. clavuligerus* chromosomal genes SCLAV_4787 and SCLAV_4788 are orthologous to the *Streptomyces lividans* two-component system (TCS)-encoding genes *cutS* and *cutR*, and their expression was not affected in the Δ *cl**aR* mutant. However, a putative paralogous TCS-encoding *cutS-cutR* (SCLAV_p1438 and SCLAV_p1439) was downregulated in the Δ *cl**aR* mutant (14.5-fold average decrease).

(ii) Genes with various functions. In addition to the genes already mentioned, 48 genes encoding miscellaneous proteins were upregulated and 69 genes were downregulated in the Δ *cl**aR* mutant (Table 2). The proteins encoded by these genes exert different functions in the cell. The more affected genes were the ATP-dependent Clp protease-encoding gene (SCLAV_0526) and the staurosporin-related methyltransferase (SCLAV_p1123), which was upregulated 70-fold. Upregulated changes between 10- and

TABLE 2 Genes encoding nonregulatory proteins that are upregulated or downregulated in *S. clavuligerus* Δ *clrR::aac* in relation to *S. clavuligerus* ATCC 27064

Gene	Product	M_c			BH-corrected <i>P</i> value			Fold change ^a		
		22.5 h	46.5 h	60 h	22.5 h	46.5 h	60 h	22.5 h	46.5 h	60 h
Upregulated										
SCLAV_0156	Hypothetical protein	1.60	2.87	2.71	4.52E ⁻⁰²	2.64E ⁻⁰⁴	3.90E ⁻⁰⁴	3.03	7.32	6.56
SCLAV_0254	Putative acetyltransferase	4.07	1.51	2.18	8.61E ⁻⁰⁶	4.56E ⁻⁰²	3.56E ⁻⁰³	16.80	2.86	4.55
SCLAV_0526	ATP-dependent Clp protease	1.63	4.45	3.02	2.50E ⁻⁰²	<1E ⁻⁰⁶	5.64E ⁻⁰⁵	3.10	21.99	8.15
SCLAV_1182	Hypothetical protein	1.69	2.03	1.61	1.03E ⁻⁰⁵	<1E ⁻⁰⁶	1.63E ⁻⁰⁵	3.24	4.11	3.05
SCLAV_1184	ATP grasp superfamily enzyme	2.99	3.58	1.34	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	6.86E ⁻⁰⁴	7.98	12.02	2.54
SCLAV_1186	Putative dephospho-CoA kinase	1.17	2.12	1.16	1.01E ⁻⁰²	1.58E ⁻⁰⁵	4.88E ⁻⁰³	2.25	4.37	2.24
SCLAV_1187	Hypothetical protein	1.57	1.74	1.43	5.77E ⁻⁰⁴	5.80E ⁻⁰⁵	3.92E ⁻⁰⁴	2.97	3.35	2.70
SCLAV_1453	Alkaline d-peptidase	1.70	1.60	1.56	7.69E ⁻⁰³	1.21E ⁻⁰²	6.99E ⁻⁰³	3.27	3.04	2.95
SCLAV_1808	DsbA oxidoreductase	2.17	2.38	1.48	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	5.70E ⁻⁰⁶	4.51	5.21	2.80
SCLAV_1991	<i>N</i> -Acetylglucosamine catabolism protein	1.01	1.22	1.45	2.60E ⁻⁰³	2.69E ⁻⁰⁴	3.83E ⁻⁰⁵	2.02	2.33	2.74
SCLAV_2412	GTP cyclohydrolase I	1.03	1.69	1.93	1.29E ⁻⁰³	2.99E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	2.04	3.24	3.82
SCLAV_2900	GCN5-related <i>N</i> -acetyltransferase	1.38	1.74	1.27	2.36E ⁻⁰⁵	<1E ⁻⁰⁶	4.66E ⁻⁰⁵	2.60	3.35	2.42
SCLAV_2956	Hypothetical protein	1.51	1.79	1.36	6.38E ⁻⁰³	8.38E ⁻⁰⁴	6.51E ⁻⁰³	2.85	3.48	2.57
SCLAV_3213	Glycosyltransferase	2.78	2.71	1.10	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	3.98E ⁻⁰⁵	6.89	6.57	2.15
SCLAV_3214	DUF2596 domain-containing protein	1.53	1.40	1.41	3.75E ⁻⁰⁵	8.39E ⁻⁰⁵	6.56E ⁻⁰⁵	2.89	2.64	2.68
SCLAV_3281	Putative permease of the MFS superfamily	2.73	2.81	1.50	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	2.05E ⁻⁰⁴	6.65	7.04	2.83
SCLAV_3946	Fumarate hydratase	2.35	3.61	2.04	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	5.13	12.29	4.13
SCLAV_4021	Hypothetical protein	2.15	1.95	1.61	2.45E ⁻⁰⁶	7.86E ⁻⁰⁶	6.93E ⁻⁰⁵	4.46	3.88	3.07
SCLAV_4151	Hypothetical protein	1.29	3.08	1.31	7.78E ⁻⁰⁴	<1E ⁻⁰⁶	3.80E ⁻⁰⁴	2.45	8.50	2.48
SCLAV_4287	NAD-dependent epimerase/dehydratase	1.07	1.46	1.31	3.56E ⁻⁰²	2.30E ⁻⁰³	4.35E ⁻⁰³	2.10	2.76	2.49
SCLAV_4768	3'-OH-methylcephem-O-carbamoyltransferase	1.12	2.50	1.34	3.81E ⁻⁰²	1.49E ⁻⁰⁵	5.53E ⁻⁰³	2.17	5.69	2.54
SCLAV_4869	Oxidoreductase	1.12	2.57	1.13	6.63E ⁻⁰⁵	<1E ⁻⁰⁶	4.42E ⁻⁰⁵	2.19	5.96	2.20
SCLAV_4922	Ribosome-associated GTPase	1.19	2.52	1.28	5.71E ⁻⁰⁴	<1E ⁻⁰⁶	1.71E ⁻⁰⁴	2.30	5.77	2.43
SCLAV_5145	Potassium-transporting ATPase subunit B	1.94	2.21	1.97	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	3.85	4.64	3.94
SCLAV_5146	Potassium-transporting ATPase C chain	2.98	2.68	2.58	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	7.93	6.43	5.99
SCLAV_5150	TrkABC domain-containing protein	1.18	1.08	1.39	2.89E ⁻⁰⁵	6.59E ⁻⁰⁵	3.11E ⁻⁰⁶	2.27	2.11	2.63
SCLAV_5161	Hypothetical protein	1.85	1.16	1.03	1.49E ⁻⁰⁵	1.72E ⁻⁰³	3.79E ⁻⁰³	3.62	2.25	2.04
SCLAV_5162	NocE-like protein	1.36	1.26	2.33	1.98E ⁻⁰²	1.91E ⁻⁰²	9.08E ⁻⁰⁵	2.58	2.40	5.03
SCLAV_5163	Hypothetical protein	1.18	1.77	1.20	8.26E ⁻⁰⁵	<1E ⁻⁰⁶	4.86E ⁻⁰⁵	2.27	3.43	2.30
SCLAV_5198	Copper oxidase	1.35	2.91	3.80	1.28E ⁻⁰⁴	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	2.56	7.52	14.00
SCLAV_5199	Putative hydroxylase	1.15	2.86	3.77	6.01E ⁻⁰⁴	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	2.22	7.30	13.66
SCLAV_5222	Hypothetical protein	1.79	2.14	1.16	8.85E ⁻⁰⁵	8.10E ⁻⁰⁶	3.47E ⁻⁰³	3.47	4.42	2.24
SCLAV_5248	Zn-dependent hydrolase	1.44	1.55	1.08	2.63E ⁻⁰⁴	8.20E ⁻⁰⁵	2.30E ⁻⁰³	2.72	2.94	2.11
SCLAV_5256	Putative ABC transporter permease	1.33	1.43	1.05	5.92E ⁻⁰³	1.91E ⁻⁰³	1.54E ⁻⁰²	2.52	2.70	2.07
SCLAV_5350	Acytransferase 3	1.03	1.80	1.27	1.34E ⁻⁰⁵	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	2.05	3.49	2.41
SCLAV_5511	Hypothetical protein	1.23	1.62	1.37	2.69E ⁻⁰²	2.12E ⁻⁰³	6.19E ⁻⁰³	2.35	3.08	2.60
SCLAV_5534	Selenocysteine lyase	1.26	1.22	2.62	3.76E ⁻⁰²	2.70E ⁻⁰²	1.39E ⁻⁰⁵	2.40	2.34	6.16
SCLAV_5547	YD repeat protein	1.02	1.66	1.19	1.01E ⁻⁰²	5.78E ⁻⁰⁵	1.31E ⁻⁰³	2.03	3.17	2.29
SCLAV_5583	Putative oxidoreductase	1.44	1.97	1.19	1.95E ⁻⁰²	9.78E ⁻⁰⁴	2.95E ⁻⁰²	2.73	3.93	2.29
SCLAV_5617	Putative dehydrogenase	1.12	1.40	1.28	1.28E ⁻⁰²	1.26E ⁻⁰³	2.54E ⁻⁰³	2.18	2.64	2.43
SCLAV_5688	Hypothetical protein	1.58	1.43	1.14	4.15E ⁻⁰⁵	1.10E ⁻⁰⁴	8.55E ⁻⁰⁴	3.01	2.69	2.21
SCLAV_5714	Cysteine desulfurase	1.40	1.51	1.22	2.01E ⁻⁰²	7.02E ⁻⁰³	2.25E ⁻⁰²	2.65	2.85	2.34
SCLAV_p0020	Hypothetical protein	1.37	1.33	1.25	1.89E ⁻⁰²	1.31E ⁻⁰²	1.60E ⁻⁰²	2.59	2.52	2.38
SCLAV_p0560	Multimeric flavodoxin WrB	3.40	2.97	1.37	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	1.61E ⁻⁰³	10.63	7.85	2.59
SCLAV_p0693	Luciferase domain-containing protein	1.85	1.63	1.61	9.22E ⁻⁰⁴	1.95E ⁻⁰³	1.76E ⁻⁰³	3.62	3.11	3.06
SCLAV_p0703	Carbonic anhydrase	1.28	1.17	1.77	2.86E ⁻⁰²	2.89E ⁻⁰²	1.18E ⁻⁰³	2.44	2.26	3.43
SCLAV_p0842	NADPH-dependent FMN reductase	3.15	3.14	1.18	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	9.18E ⁻⁰³	8.91	8.85	2.28
SCLAV_p1123	Putative methyltransferase	4.57	6.13	6.06	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	23.83	70.03	66.95
Downregulated										
SCLAV_3892	DUF946 domain-containing protein	-2.09	-4.38	-2.63	1.23E ⁻⁰³	<1E ⁻⁰⁶	6.82E ⁻⁰⁵	4.26	20.8	6.19
SCLAV_4953	AmfT: putative AmfS-modifying enzyme	-5.99	-6.68	-4.86	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	63.6	103	29.1
SCLAV_4954	AmfB, membrane translocator	-1.98	-2.56	-1.68	2.10E ⁻⁰³	9.78E ⁻⁰⁵	4.03E ⁻⁰³	3.95	5.93	3.22
SCLAV_4955	AmfA, membrane translocator	-2.45	-2.85	-1.15	3.01E ⁻⁰⁵	3.68E ⁻⁰⁶	1.74E ⁻⁰²	5.47	7.21	2.23
SCLAV_4957	Hypothetical protein	-3.72	-4.68	-4.31	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	13.3	25.8	19.9
SCLAV_4968	CbbY/CbbZ/GpH/YieH family hydrolase	-5.40	-6.38	-5.60	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	42.4	83.8	48.6
SCLAV_4971	ATPase with various cellular activities	-6.24	-6.26	-5.55	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	76.0	77.0	47.0
SCLAV_4973	Hypothetical protein	-3.15	-3.14	-2.11	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	8.89	8.82	4.34
SCLAV_p1192	Peptidoglycan-binding LysM	-2.00	-3.67	-2.97	4.11E ⁻⁰³	3.56E ⁻⁰⁶	4.60E ⁻⁰⁵	4.00	12.8	7.85
SCLAV_p1196	Secreted protein	-2.45	-4.70	-3.51	9.78E ⁻⁰⁴	<1E ⁻⁰⁶	1.21E ⁻⁰⁵	5.50	26.1	11.5

(Continued on following page)

TABLE 2 (Continued)

Gene	Product	M_c			BH-corrected P value			Fold change ^a		
		22.5 h	46.5 h	60 h	22.5 h	46.5 h	60 h	22.5 h	46.5 h	60 h
SCLAV_p1197	Phage tail protein	-2.42	-3.93	-3.21	4.78E ⁻⁰³	2.06E ⁻⁰⁵	1.74E ⁻⁰⁴	5.37	15.2	9.31
SCLAV_p1198	Tail sheath protein	-2.77	-5.20	-3.75	2.12E ⁻⁰³	1.03E ⁻⁰⁶	5.69E ⁻⁰⁵	6.86	36.8	13.5
SCLAV_p1200	Hydrolytic protein	-2.85	-5.19	-3.71	1.07E ⁻⁰³	<1E ⁻⁰⁶	3.98E ⁻⁰⁵	7.22	36.5	13.2
SCLAV_p1328	SAM-dependent O-methyltransferase	-2.80	-2.63	-3.42	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	6.99	6.20	10.7
SCLAV_p1329	Peptidases S1 and S6; chymotrypsin/Hap	-5.41	-6.13	-6.47	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	42.5	70.0	89.2
SCLAV_p1330	Oxidoreductase UcpA	-4.85	-5.25	-5.29	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	29.0	38.1	39.1
SCLAV_p1342	Hypothetical protein	-3.89	-4.46	-3.91	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	14.9	22.1	15.0
SCLAV_p1352	Flavin reductase domain protein	-2.50	-2.40	-2.99	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	5.69	5.28	7.97
SCLAV_p1355	Hypothetical protein	-6.24	-5.70	-5.27	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	75.7	52.3	38.6
SCLAV_p1370	Acyl-CoA dehydrogenase	-5.00	-4.97	-3.79	1.18E ⁻⁰⁶	1.19E ⁻⁰⁶	3.47E ⁻⁰⁵	32.1	31.5	13.9
SCLAV_p1378	Dyp-type peroxidase family protein	-3.42	-3.36	-2.09	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	2.93E ⁻⁰⁵	10.7	10.3	4.27
SCLAV_p1379	Plastocyanin	-6.14	-6.33	-4.73	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	71.0	80.6	26.6
SCLAV_p1381	CnaB domain-containing protein	-7.44	-7.81	-7.59	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	174.0	225.0	193.0
SCLAV_p1382	Putative peptidase inhibitor	-3.03	-3.95	-3.83	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	8.18	15.5	14.3
SCLAV_p1383	YVTN family beta-propeller repeat protein	-4.90	-5.06	-3.48	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	7.61E ⁻⁰⁶	29.9	33.5	11.2
SCLAV_p1388	Putative secreted metalloprotease	-5.43	-5.92	-6.17	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	43.2	61.0	72.2
SCLAV_p1389	Putative secreted protein	-5.88	-6.60	-7.19	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	59.2	97.3	147
SCLAV_p1402	Actinohivin	-2.33	-2.91	-3.45	2.95E ⁻⁰³	2.11E ⁻⁰⁴	3.02E ⁻⁰⁵	5.04	7.53	10.9
SCLAV_p1403	DNA-binding protein	-5.48	-5.25	-4.43	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	44.9	38.3	21.6
SCLAV_p1404	Multicopper oxidase, type 2	-2.56	-2.82	-2.55	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	5.93	7.10	5.87
SCLAV_p1417	Hypothetical protein	-3.94	-4.30	-5.75	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	15.4	19.8	53.9
SCLAV_p1420	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR	-3.40	-3.34	-3.59	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	10.6	10.2	12.1
SCLAV_p1421	Hypothetical protein	-3.29	-3.68	-4.52	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	9.8	12.8	23.0
SCLAV_p1424	Hypothetical protein	-2.03	-2.36	-2.23	5.62E ⁻⁰⁴	8.00E ⁻⁰⁵	1.29E ⁻⁰⁴	4.10	5.13	4.71
SCLAV_p1425	Hypothetical protein	-6.05	-6.15	-5.91	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	66.5	71.5	60.5
SCLAV_p1428	Prenyltransferase/squalene oxidase	-4.07	-4.16	-3.34	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	2.85E ⁻⁰⁶	16.9	18.0	10.2
SCLAV_p1431	Putative surface layer protein	-6.92	-8.23	-7.18	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	121	302	146
SCLAV_p1434	Hypothetical protein	-5.19	-5.27	-4.83	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	36.6	38.8	28.6
SCLAV_p1442	Hypothetical protein	-2.94	-4.27	-4.42	5.55E ⁻⁰⁵	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	7.70	19.4	21.5
SCLAV_p1443	Integrin alpha-2 domain-containing protein	-5.89	-6.30	-4.17	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	59.6	79.0	18.1
SCLAV_p1445	Calcium binding protein	-4.72	-5.43	-3.07	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	5.30E ⁻⁰⁶	26.5	43.4	8.42
SCLAV_p1448	Methyltransferase family protein	-5.26	-4.40	-2.11	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	4.97E ⁻⁰⁶	38.4	21.2	4.33
SCLAV_p1449	Hypothetical protein	-5.86	-6.38	-5.81	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	58.1	83.3	56.4
SCLAV_p1451	Cytochrome P450	-4.12	-4.91	-5.35	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	17.4	30.1	41.0
SCLAV_p1453	Trypsin	-4.07	-5.48	-4.76	1.43E ⁻⁰⁵	<1E ⁻⁰⁶	1.78E ⁻⁰⁶	16.8	44.8	27.3
SCLAV_p1455	Hypothetical protein	-3.66	-3.41	-3.50	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	12.7	10.7	11.3
SCLAV_p1459	Mg ²⁺ transporter C	-3.50	-3.60	-6.28	2.70E ⁻⁰⁴	1.04E ⁻⁰⁴	<1E ⁻⁰⁶	11.4	12.2	78.2
SCLAV_p1469	Lipoprotein	-6.34	-5.34	-3.96	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	81.4	40.8	15.6
SCLAV_p1484	Oxidoreductase	-2.53	-3.01	-2.25	5.14E ⁻⁰⁵	5.02E ⁻⁰⁶	1.36E ⁻⁰⁴	5.81	8.06	4.78
SCLAV_p1485	ATP-dependent RNA helicase	-4.07	-4.12	-4.31	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	16.9	17.5	19.9
SCLAV_p1491	Hypothetical protein	-2.33	-2.22	-2.81	1.38E ⁻⁰⁵	2.15E ⁻⁰⁵	1.19E ⁻⁰⁶	5.06	4.67	7.05
SCLAV_p1497	Inhibitor I36 domain-containing protein	-3.28	-3.28	-3.01	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	9.8	9.7	8.06
SCLAV_p1506	WD40 domain-containing protein	-3.50	-4.20	-3.22	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	1.08E ⁻⁰⁶	11.4	18.4	9.37
SCLAV_p1511	Putative integrin gene cassette protein	-4.39	-4.91	-5.31	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	21.0	30.1	39.9
SCLAV_p1515	NAD-dependent epimerase/dehydratase	-5.50	-5.45	-5.24	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	45.5	44.0	37.9
SCLAV_p1526	Hypothetical protein	-4.56	-4.06	-3.67	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	23.6	16.7	12.8
SCLAV_p1527	Secreted protein	-3.50	-3.20	-3.34	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	11.4	9.21	10.1
SCLAV_p1528	DUF574 domain-containing protein	-3.87	-4.07	-4.73	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	14.7	16.8	26.7
SCLAV_p1539	Folypolyglutamate synthetase	-2.24	-4.19	-4.55	1.17E ⁻⁰³	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	4.72	18.3	23.5
SCLAV_p1556	Adenosylcobinamide amidohydrolase (putative)	-5.29	-4.92	-3.04	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	2.80E ⁻⁰⁵	39.2	30.4	8.23
SCLAV_p1558	Beta-xylosidase	-2.97	-3.97	-4.40	5.36E ⁻⁰⁴	1.42E ⁻⁰⁵	4.10E ⁻⁰⁶	7.85	15.7	21.2
SCLAV_p1566	Phenolic acid decarboxylase	-4.82	-4.69	-4.40	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	28.3	25.8	21.3
SCLAV_p1580	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR	-3.28	-2.92	-2.18	4.44E ⁻⁰⁶	1.70E ⁻⁰⁵	3.57E ⁻⁰⁴	9.7	7.57	4.55
SCLAV_p1582	Putative DNA-binding protein	-2.40	-2.21	-2.46	1.18E ⁻⁰⁶	3.21E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	5.28	4.65	5.53
SCLAV_p1585	Hypothetical protein	-2.11	-2.28	-2.06	4.78E ⁻⁰⁴	1.10E ⁻⁰⁴	2.81E ⁻⁰⁴	4.33	4.88	4.17
SCLAV_p1586	Oxidoreductase	-3.24	-3.51	-4.06	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	<1E ⁻⁰⁶	9.5	11.4	16.8
SCLAV_p1588	Reductase	-2.79	-2.99	-2.81	1.24E ⁻⁰⁵	4.30E ⁻⁰⁶	9.27E ⁻⁰⁶	6.94	7.99	7.06
SCLAV_pnr026	Predicted ncRNA	-4.67	-3.66	-3.43	6.25E ⁻⁰⁶	9.90E ⁻⁰⁵	1.75E ⁻⁰⁴	25.5	12.7	10.8
SCLAV_pnr029	Predicted ncRNA	-2.73	-2.54	-2.54	9.73E ⁻⁰⁶	2.03E ⁻⁰⁵	2.02E ⁻⁰⁵	6.68	5.85	5.82

^a Boldface data correspond to downregulated fold changes.

20-fold were observed for an ATP grasp superfamily enzyme (SCLAV_1184), for putative hydroxylase- and putative acetyltransferase-encoding genes (SCLAV_5199, SCLAV_0254), and for genes encoding a copper oxidase, a flavodoxin, and a fumarate hydratase (SCLAV_5198, SCLAV_p0560, SCLAV_3946). The most affected genes were those encoding a CnaB domain-containing protein (SCLAV_p1381) and a putative surface layer protein (SCLAV_p1431), which seemed to be not expressed at any time in the culture (decreased 100-fold compared to the wild-type strain). Sixteen genes (about 13% of these genes) encode oxidoreductases, oxidases, flavodoxins, peroxidases, or reductases, which might form part of the RpoE regulon (see Discussion) as occurs with the oxidoreductases encoded by SCLAV_1808 and SCLAV_4869. From them, SCLAV_1808, SCLAV_4869, and SCLAV_5583, encoding oxidoreductases, SCLAV_5198, encoding a copper oxidase, SCLAV_p0560, encoding a flavodoxin, and SCLAV_p0842, coding for an NADPH-dependent FMN reductase, are upregulated, while all the other 10 genes are downregulated.

Complementation of *S. clavuligerus* Δ *clrR::aac*. To confirm the *Clr* effect on antibiotic production and the lack of aerial mycelium formation, the deleted Δ *clrR* mutant was complemented with plasmid pMS83-*clrR*. *S. clavuligerus* Δ *clrR::aac*, *S. clavuligerus* Δ *clrR::aac*(pMS83-*clrR*), and the control strains *S. clavuligerus* Δ *clrR::aac*(pMS83) and *S. clavuligerus* ATCC 27064 were grown in SA medium to compare the antibiotic production levels. The complementation did not affect appreciably cephamycin C production (Fig. 1B, right panel); however, a clear effect on clavulanic acid and holomycin production was observed. Clavulanic acid was produced by the complemented strain, although to a lower level than by *S. clavuligerus* ATCC 27064 (Fig. 1B, left panel). No holomycin production was observed in the complemented *clrR* mutant (Fig. 1B, central panel), confirming that the lack of *Clr* was responsible for the holomycin production phenotype. Aerial mycelium formation and sporulation were fully restored in the complemented *clrR* strain (Fig. 4C).

Validation of the transcriptomic data. The transcriptomic data have been validated using RT-qPCR on the same RNA samples as those used for the transcriptomic studies at 46.5 h. Fifteen genes were validated (Fig. 5), including genes for the biosynthesis of clavulanic acid (SCLAV_4183), cephamycin C (SCLAV_4199), holomycin (SCLAV_5267, SCLAV_5275), and staurosporine (SCLAV_p1122) and several genes encoding regulatory proteins (SCLAV_4956, SCLAV_5384, SCLAV_5409, SCLAV_5692, SCLAV_p1581), as well as five genes for miscellaneous proteins. The RT-qPCR values consistently confirmed those obtained in the microarrays; a Pearson's correlation of 0.918 between the data obtained by the two techniques was obtained (Fig. 5B).

DISCUSSION

The detection of a low copy number of plasmids pSCL2 and pSCL4 in the mycelium of the old *S. clavuligerus* *clrR::aph* indicates that our previous results on the loss of large plasmids in *Streptomyces* mutants (21) is a rather frequent event, probably associated to protoplast preparation and regeneration. Control of the cellular levels of these large plasmids is essential to avoid errors in the interpretation of the phenotypes caused by mutants, especially those obtained by classical mutagenesis and methods that utilize protoplasts.

The construction of a new strain, *S. clavuligerus* Δ *clrR::aac*, carrying a wild-type dosage of pSCL2 and pSCL4, allowed us to

confirm by transcriptomic methods the results obtained previously by Northern and S1 high-resolution transcriptional analyses (1). These authors described that *Clr* controls genes encoding enzymes for the late steps of CA biosynthesis (*oppA1*, *car*, and *cyp*). In addition, the transcriptomic approach showed that also *gcaS*, *oppA2*, and the *orf12*, *orf13*, *orf14*, and *orf16* genes of the CA gene cluster were downregulated in the Δ *clrR* mutant with an average transcription of 2.3% in relation to the control strain. It was previously described that the genes for the early steps of the CA pathway were not affected by the *clrR* mutation (1); in this study, we found that they are also downregulated, although to a lower extent (39 to 56%). This low expression allows a partial flux of the early part of the pathway to clavaminic acid and explains that this intermediate is accumulated in the *S. clavuligerus* Δ *clrR::aac* mutant grown in SA medium barely above the levels found for the wild-type strain (data not shown). The flux of the clavam pathway, starting with clavaminic acid, is probably weak and unable to use all the clavaminic acid accumulated in the Δ *clrR* mutant cells.

Pérez-Redondo et al. (2) described that increasing the copy number of *clrR* resulted in lower cephamycin C production. This transcriptomic study confirms that the lack of *Clr* upregulates the expression of the cephamycin C genes (up to 1.7-fold) at early times of the fermentation, which results in a 3-fold increase of cephamycin C production at 72 h of culture. The effect of the *clrR* deletion is much stronger on the upregulation of the holomycin biosynthesis gene cluster (3- to 572-fold increase, depending on the gene), a metabolite that was overproduced in the deleted Δ *clrR* mutant and in *S. clavuligerus* *clrR::aph* (16). In this work, we demonstrate that lack of *Clr* upregulated all the genes of the *hlmABCDEFGHIJ* cluster (289-fold change on average) at the 22.5-h culture sample, and then their expression decreased gradually at 46.5 and 60 h. Two genes, *hlmI* and *hlmH*, showed a continuous upregulation along the entire fermentation with a maximum at 46.5 h (555-fold change on average). HlmI is a flavin-dependent dithiol oxidase using oxygen as a cosubstrate, which might be part of the RpoE regulon. HlmH is an MFS-type transporter; the S-methylation of holomycin has been described as the mechanism of holomycin resistance in *S. clavuligerus* (45); however, the high expression of *hlmH* when the strain is actively producing holomycin suggests that the pumping out of holomycin might be an alternative resistance mechanism.

While *Clr* has been described as involved in clavulanic acid biosynthesis regulation and related to overproduction of holomycin, in this work we demonstrate that additional blocks of genes not directly related to antibiotic production are also controlled by *Clr*, including genes encoding other regulators. The most affected regulator in the *S. clavuligerus* Δ *clrR* mutant is that encoded by SCLAV_4956, a gene that is almost completely silent in the mutant, especially at 46.5 h of growth. AmfR is a NarL/FixJ-type regulator, orthologous to *S. griseus* AmfR and to *S. coelicolor* RamR. AmfR activates the expression of the *amfTSBA* operon in *S. griseus*, and the same occurs with RamR in the *ramCSAB* operon in *S. coelicolor* or *S. lividans* (44, 46, 47). The lack of *amfR* expression in *S. clavuligerus* Δ *clrR* strongly downregulates *amfT* (100-fold), which encodes a putative protein kinase orthologous to RamC. The effect of the low *amfR* expression on *amfA* and *amfB*, encoding subunits of an ABC transporter, is lesser, and their transcription decreased only 6- to 7-fold in relation to the wild-type strain (Fig. 4). The *amfTBAR* cluster of *S. clavuligerus* appears to be similar to the *ramCSABR* cluster of *S. coelicolor*, but no *S. cla-*

A) Data obtained for each gene comparing microarray transcriptomic and RT-qPCR

Gene	Product	M_c	$\log_2(2^{-\Delta\Delta Ct})$
SCLAV_3946	Fumarate hydratase	3.62	4.09
SCLAV_4183	OppA2, oligopeptide permease	-6.37	-8.08
SCLAV_4199	PcbC, cephamycin C biosynthesis	-0.04	0.11
SCLAV_4764	Oxidoreductase	2.03	1.83
SCLAV_4956	AmfR, transcriptional regulator	-5.93	-18.7
SCLAV_5146	Potassium-transporting ATPase, C chain	2.69	3.93
SCLAV_5267	HlmA, holomycin biosynthesis	5.68	5.96
SCLAV_5275	HlmI, holomycin biosynthesis	9.16	9.77
SCLAV_5384	GntR-family transcriptional regulator	1.11	1.34
SCLAV_5409	ArsR-family transcriptional regulator	1.48	1.47
SCLAV_5692	LysR-family transcriptional regulator	1.33	0.74
SCLAV_p0566	3-Oxoacyl-ACP synthase	1.75	4.21
SCLAV_p1006	Putative thioredoxin	-3.47	-5.77
SCLAV_p1122	StaR, staurosporine transcriptional regulator	2.95	6.08
SCLAV_p1581	BadM/Rrf2-family transcriptional regulator	-4.26	-13.4

B) Correlation plot for the data shown above

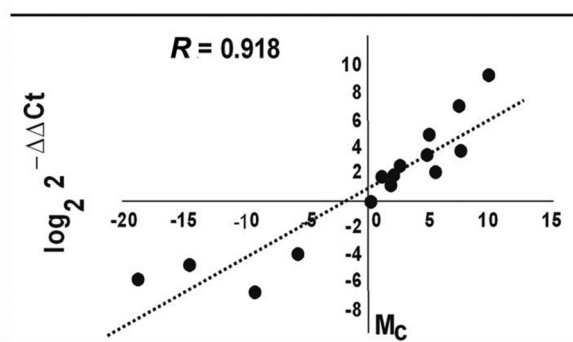


FIG 5 Validation of the transcriptomic results. (A) Comparison of the data obtained for each gene analyzed in the transcriptomic experiment and by RT-qPCR. (B) Representation of the correlation between the results shown in panel A.

viligerus amfS gene can be found in public databases (see Addendum in Proof). The *ramS* gene encodes the 42-amino-acid peptide that, after posttranslational modification, produces SapB, a “lan-tibiotic-like” peptide required for aerial mycelium formation in *S. coelicolor* (48). RamC, initially described as a protein kinase, is now considered to be the putative enzyme that dehydrates and cyclizes the RamS peptide (49, 50) to produce the pro-SapB peptide. While an *amfS* (*ramS*) annotated gene is not present in the *S. clavuligerus* genome, a RamS-like peptide must be produced by *S. clavuligerus* ATCC 27064 since it induces aerial mycelium formation in *S. clavuligerus* $\Delta claR::aac$ when the two strains are grown close together (Fig. 4B, right), suggesting that a diffusible compound is produced by the wild-type strain. This extracellular complementation phenomenon, a cross-feeding experiment between the wild-type strain and the *amfS* mutant, was also observed in *S. griseus* cocultures (51) of the wild type and the *amfS* mutant. A similar phenomenon occurs in *S. coelicolor* when the RamS peptide is added to solid cultures of a *ramS* mutant (52). The observed effect on *amfT* appears to be characteristic of ClaR and not of

AdpA or BldD, which have been described to control *amfT* expression in *S. griseus* (44, 53), since expression of the gene SCLAV_0719 (*bldD*) was not affected in *S. clavuligerus* $\Delta claR::aac$ and SCLAV_1957 (*adpA*) was upregulated (3.7-fold) only at 60 h of culture.

The SCLAV_4082 and SCLAV_4083 genes are orthologous to the *sigR-rsrA* system of *S. coelicolor* and encode, respectively, an RNA polymerase sigma factor (RpoE), and an anti-sigma factor (RsrA). Both genes are upregulated in the $\Delta claR$ mutant (6- and 4-fold above their level in the control strain, respectively). The SigR regulon controls oxidative stress, allowing thiol homeostasis, correct protein folding, and flavin- or Fe-S protein-dependent redox reactions (41). Oxidative stress leads to RsrA inactivation, releasing SigR for the expression activation of genes in the SigR regulon (54). The anti-sigma factor RsrA detects thiol oxidation and modulates the SigR activity in *Streptomyces coelicolor* (54, 55, 56). The SigR regulon is formed by at least 160 genes (41). In *S. clavuligerus* $\Delta claR$, 73 of 117 genes orthologous to those of the *S. coelicolor* SigR regulon are upregulated with a level equal to or

greater than 1.5-fold at some of the three sampling times, 31 of them being upregulated at all the sampling times (see Table S1 in the supplemental material). *S. clavuligerus* Δ *clA*R does not produce clavulanic acid, and this compound might be a sink for cellular oxygen, since several steps of the pathway (as those involving the clavaminic synthase) consume oxygen and, therefore, CA production might help in controlling the oxidative stress. The activation of the RpoE regulon in the Δ *clA*R mutant would account for the upregulation of the thioredoxin reductase (SCLAV_5275) for holomycin biosynthesis and also for the differential transcription of many oxidases, oxidoreductases, and reductases genes (see Table S1 in the supplemental material).

In summary, deletion of the *clA*R gene affects all the genes for clavulanic acid biosynthesis, especially those encoding the late steps of the pathway. It affects also all the genes for holomycin biosynthesis but also results in downregulation of several clusters for cryptic metabolites. The downregulation observed for *amfR* confirms the concomitant loss of aerial mycelium formation. Genes involved in oxidative stress are also affected, which would account for the differential transcription of many genes of the RpoE regulon.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grant BIO2013-34723 from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness. Y. Martínez-Burgo and R. Álvarez-Álvarez received PFU fellowships from the Spanish Ministry of Science and Innovation.

The collaboration of R. Pérez Redondo and Juan F. Martín in different steps of this work is appreciated.

ADDENDUM IN PROOF

An ORF previously unidentified in public databases has been located in the *S. clavuligerus* genome between *amfT* and *amfB* (nt 5822261 to 5822392). It encodes a 43-amino-acid peptide (56% identical to SapB) which contains the RamS-conserved positions S²⁴, S²⁷, C³¹, S³⁵, S³⁸, and C⁴². The ORF should be named *amfS*.

REFERENCES

- Paradkar AS, Aidoo KA, Jensen SE. 1998. A pathway-specific transcriptional activator regulates late steps of clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Mol Microbiol* 27:831–843. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00731.x>.
- Pérez-Redondo R, Rodríguez-García A, Martín JF, Liras P. 1998. The *clA*R 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. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119\(98\)00106-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119(98)00106-1).
- Maddocks SE, Oyston PC. 2008. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology* 154:3609–3623. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.2008/022772-0>.
- Schlaman HR, Okker RJ, Lugtenberg BJ. 1992. Regulation of nodulation gene expression by NodD in rhizobia. *J Bacteriol* 174:5177–5182.
- Lehnen D, Blumer C, Polen T, Wackwitz B, Wendisch VF, Uden G. 2002. LrhA as a new transcriptional key regulator of flagella, motility and chemotaxis in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 45:521–532. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03032.x>.
- Parsek MR, Ye RW, Pun P, Chakrabarty AM. 1994. Critical nucleotides in the interaction of a LysR-type regulator with its target promoter region. *catBC* promoter activation by CatR. *J Biol Chem* 269:11279–11284.
- Tropel D, van der Meer JR. 2004. Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds. *Microbiol Mol Biol Rev* 68:474–500. <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.68.3.474-500.2004>.
- Martínez-Costa OH, Martín-Triana AJ, Martínez E, Fernández-Moreno MA, Malpartida F. 1999. An additional regulatory gene for actinorhodin production in *Streptomyces lividans* involves a LysR-type transcriptional regulator. *J Bacteriol* 181:4353–4364.
- Rodríguez M, Núñez LE, Braña AF, Méndez C, Salas JA, Blanco G. 2008. Identification of transcriptional activators for thienamycin and cephamycin C biosynthetic genes within the thienamycin gene cluster from *Streptomyces cattleya*. *Mol Microbiol* 69:633–645. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06312.x>.
- Martín JF, Liras P. 2010. Engineering of regulatory cascades and networks controlling antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Curr Opin Microbiol* 13:263–273. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2010.02.008>.
- Mao XM, Sun ZH, Liang BR, Wang ZB, Feng WH, Huang FL, Li YQ. 2013. Positive feedback regulation of *stgR* expression for secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* 195:2072–2078. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00040-13>.
- Álvarez-Álvarez R, Rodríguez-García A, Santamarta I, Pérez-Redondo R, Prieto-Domínguez A, Martínez-Burgo Y, Liras P. 2014. Transcriptional analysis of *Streptomyces clavuligerus* Δ *cCaR::tsr*: effects of the cephamycin C-clavulanic acid cluster regulator CcaR on global regulation. *Microb Biotechnol* 7:221–231. <http://dx.doi.org/10.1111/1751-7915.12109>.
- Santamarta I, López-García MT, Kurt A, Nárdiz N, Álvarez-Álvarez R, Pérez-Redondo R, Martín JF, Liras P. 2011. Characterization of DNA-binding sequences for CcaR in the cephamycin-clavulanic acid supercluster of *Streptomyces clavuligerus*. *Mol Microbiol* 81:968–981. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07743.x>.
- 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. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90036-1](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119(94)90036-1).
- Sánchez L, Braña A. 1996. Cell density influences antibiotic biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Microbiology* 142:1209–1220. <http://dx.doi.org/10.1099/13500872-142-5-1209>.
- de la Fuente A, Lorenzana LM, Martín 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. *J Bacteriol* 184:6559–6565. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.184.23.6559-6565.2002>.
- Pospiech A, Neumann B. 1995. A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. *Trends Genet* 11:217–218. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9525\(00\)89052-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9525(00)89052-6).
- Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. 2000. Practical *Streptomyces* genetics. John Innes Foundation, Norwich, England.
- Gust B, Challis GL, Fowler K, Kieser T, Chater KF. 2003. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1541–1546. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0337542100>.
- Lee C, Kim J, Shin SG, Hwang S. 2006. Absolute and relative qPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 123:273–280. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.11.014>.
- Álvarez-Álvarez R, Rodríguez-García A, Martínez-Burgo Y, Robles-Reglero V, Santamarta I, Pérez-Redondo R, Martín JF, Liras P. 2014. A 1.8-Mb-reduced *Streptomyces clavuligerus* genome: relevance for secondary metabolism and differentiation. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:2183–2195. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-013-5382-z>.
- López-García MT, Santamarta I, Liras P. 2010. Morphological differentiation and clavulanic acid formation are affected in an *S. clavuligerus* Δ *adpA*-deleted mutant. *Microbiology* 156:2354–2365. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.035956-0>.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta$ CT}. *Methods* 25:402–408. <http://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Schmittgen TD, Zakrajsek BA. 2000. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods* 46:69–81. [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-022X\(00\)00129-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-022X(00)00129-9).
- Aigle B, Wietzorrek A, Takano E, Bibb MJ. 2000. A single amino acid substitution in region 1.2 of the principal sigma factor of *Streptomyces coelicolor*A3(2) results in pleiotropic loss of antibiotic production. *Mol Microbiol* 37:995–1004. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02022.x>.
- Kin T, Yamada K, Terai G, Okida H, Yoshinari Y, Ono Y, Kojima A, Kimura Y, Komori T, Asai K. 2007. fRNAdb: a platform for mining/annotating functional RNA candidates from non-coding RNA sequences. *Nucleic Acids Res* 35:D145–D148. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkl837>.

27. Herbig A, Nieselt K. 2011. nocoRNAc: characterization of non-coding RNAs in prokaryotes. *BMC Bioinformatics* 12:40. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-12-40>.
28. Dufour YS, Wesenberg GE, Tritt AJ, Glasner JD, Perna NT, Mitchell JC, Donohue TJ. 2010. chipD: a web tool to design oligonucleotide probes for high-density tiling arrays. *Nucleic Acids Res* 38:W321–W325. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkq517>.
29. Yagüe P, Rodríguez-García A, López-García MT, Rioseras B, Martín JF, Sánchez J, Manteca A. 2014. Transcriptomic analysis of liquid non-sporulating *Streptomyces coelicolor* cultures demonstrates the existence of a complex differentiation comparable to that occurring in solid sporulating cultures. *PLoS One* 9:e86296. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0086296>.
30. Smyth G. 2005. limma: linear models for microarray data, p 397–420. *In* Gentleman R, Carey VJ, Huber W, Irizarry RA, Dudoit S (ed), *Statistics for biology and health*. Springer, New York, NY.
31. Mehra S, Lian W, Jayapal KP, Charaniya SP, Sherman DH, Hu W-S. 2006. A framework to analyze multiple time series data: a case study with *Streptomyces coelicolor*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33:159–172. <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-005-0034-7>.
32. Lorenzana LM, Pérez-Redondo R, Santamarta I, Martín JF, Liras PP. 2004. Two oligopeptide-permease-encoding genes in the clavulanic acid cluster of *Streptomyces clavuligerus* are essential for production of the β -lactamase inhibitor. *J Bacteriol* 186:3431–3438.
33. Pérez-Llarena FJ, Liras P, Rodríguez-García A, Martín JF. 1997. A regulatory gene (*caar*) required for cephamycin and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*: amplification results in overproduction of both β -lactam compounds. *J Bacteriol* 179:2053–2059.
34. Li R, Khaleeli N, Townsend CA. 2000. Expansion of the clavulanic acid gene cluster: identification and in vivo functional analysis of three new genes required for biosynthesis of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. *J Bacteriol* 182:4087–4095. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.182.14.4087-4095.2000>.
35. Mellado E, Lorenzana LM, Rodríguez-Sáiz M, Díez BB, Liras P, Barredo JL. 2002. The clavulanic acid biosynthetic cluster of *Streptomyces clavuligerus*: genetic organization of the region upstream of the *car* gene. *Microbiology* 148:1427–1438.
36. Gomez-Escribano JP, Martín JF, Hesketh A, Bibb MJ, 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. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.2007/011890-0>.
37. Tahlan K, Anders C, Wong A, Mosher RH, Beatty PH, Brumlik MJ, Griffin A, Hughes C, Griffin J, Barton B, Jensen SE. 2007. 5S clavam biosynthetic genes are located in both the clavam and paralog gene clusters in *Streptomyces clavuligerus*. *Chem Biol* 14:131–142. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2006.11.012>.
38. Medema MH, Trefzer A, Kovalchuk A, van den Berg M, Müller U, Heijne W, Wu L, Alam MT, Ronning CM, Nierman WC, Bovenberg RAL, Breitling R, Takano E. 2010. The sequence of a 1.8-Mb bacterial linear plasmid reveals a rich evolutionary reservoir of secondary metabolic pathways. *Genome Biol Evol* 2:212–224. <http://dx.doi.org/10.1093/gbe/evq013>.
39. Li B, Walsh CT. 2011. *Streptomyces clavuligerus* HlmI is an intramolecular disulfide-forming dithiol oxidase in holomycin biosynthesis. *Biochemistry* 50:4615–4622. <http://dx.doi.org/10.1021/bi200321c>.
40. Liras P. 2014. Holomycin, a dithiopyrrolone compound produced by *Streptomyces clavuligerus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:1023–1030. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-013-5410-z>.
41. Kim MS, Dufour YS, Yoo JS, Cho YB, Park JH, Nam GB, Kim HM, Lee KL, Donohue TJ, Roe JH. 2012. Conservation of thiol-oxidative stress responses regulated by SigR orthologues in actinomycetes. *Mol Microbiol* 85:326–434. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08115.x>.
42. Onaka H, Taniguchi S, Igarashi Y, Fumurai T. 2002. Cloning of the staurosporine biosynthetic gene cluster from *Streptomyces* sp. TP-A0274 and its heterologous expression in *Streptomyces lividans*. *J Antibiot* 55:1063–1071.
43. O'Connor TJ, Kanellis P, Nodwell JR. 2002. The *ramC* gene is required for morphogenesis in *Streptomyces coelicolor* and expressed in a cell type-specific manner under the direct control of RamR. *Mol Microbiol* 45:45–57. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03004.x>.
44. Yamazaki H, Takano Y, Ohnishi Y, Horinouchi S. 2003. *amfR*, an essential gene for aerial mycelium formation, is a member of the AdpA regulon in the A-factor regulatory cascade in *Streptomyces griseus*. *Mol Microbiol* 50:1173–1187. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03760.x>.
45. 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. <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.201200536>.
46. Keijsers B, van Wezel JG, Canters PGW, Vijgenboom EJ. 2002. Developmental regulation of the *Streptomyces lividans* *ram* genes: involvement of RamR in regulation of the *ramCSAB* operon. *J Bacteriol* 184:4420–4429. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.184.16.4420-4429.2002>.
47. O'Connor TJ, Nodwell JR. 2005. Pivotal roles for the receiver domain in the mechanism of action of the response regulator RamR of *Streptomyces coelicolor*. *J Mol Biol* 351:1030–1047. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2005.06.053>.
48. Flärdh K, Buttner MJ. 2009. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat Rev Microbiol* 7:36–49. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1968>.
49. Kodani S, Hudson ME, Durrant MC, Buttner MJ, Nodwell JR, Willey JM. 2004. The SapB morphogen is a lantibiotic-like peptide derived from the product of the developmental gene *ramS* in *Streptomyces coelicolor*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:11448–11453. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0404220101>.
50. Goto Y, Li B, Claesen J, Shi Y, Bibb MJ, van der Donk WA. 2010. Discovery of unique lanthionine synthetases reveals new mechanistic and evolutionary insights. *PLoS Biol* 8:e1000339. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1000339>.
51. Ueda K, Oinuma KG, Ikeda K, Hosono K, Ohnishi Y, Horinouchi S, Beppu T. 2002. Amfs, an extracellular peptidic morphogen in *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol* 184:1488–1492. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.184.5.1488-1492.2002>.
52. Willey J, Santamaria R, Guijarro J, Geistlich M, Losick R. 1991. Extracellular complementation of a developmental mutation implicates a small sporulation protein in aerial mycelium formation by *S. coelicolor*. *Cell* 65:641–650. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90096-H](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(91)90096-H).
53. Ueda K, Hideaki T, Nishimoto M, Inaba H, Beppu T. 2005. Dual transcriptional control of *amfTSBA*, which regulates the onset of cellular differentiation in *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol* 187:135–142. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.187.1.135-142.2005>.
54. Antelmann H, Helmann JD. 2011. Thiol-based redox switches and gene regulation. *Antioxid Redox Signal* 14:1049–1063. <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2010.3400>.
55. Paget MS, Buttner MJ. 2003. Thiol-based regulatory switches. *Annu Rev Genet* 37:91–121. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.genet.37.110801.142538>.
56. D'Autréaux B, Toledano MB. 2007. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:813–824.

Expression of the endogenous and heterologous clavulanic acid cluster in *Streptomyces flavogriseus*: why a silent cluster is sleeping

R. Álvarez-Álvarez · Y. Martínez-Burgo · R. Pérez-Redondo ·
A.F. Braña · J.F. Martín · P. Liras

Received: 18 June 2013 / Revised: 22 July 2013 / Accepted: 24 July 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract Clusters for clavulanic acid (CA) biosynthesis are present in the actinomycetes *Streptomyces flavogriseus* ATCC 33331 and *Saccharomonospora viridis* DSM 43017. These clusters, which are silent, contain blocks of conserved genes in the same order as those of the *Streptomyces clavuligerus* CA cluster but assembled in a different organization. *S. flavogriseus* was grown in nine different media, but clavulanic acid production was undetectable using bioassays or by high-performance liquid chromatography analyses. Reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) of *S. flavogriseus* CA biosynthesis genes showed that the regulatory genes *ccaR* and *claR* and some biosynthetic genes were expressed whereas expression of *cyp*, *orf12*, *orf13*, and *oppA2* was undetectable. The *ccaR* gene of *S. clavuligerus* was unable to switch on CA production in *S. flavogriseus*::[P_{fur-ccaR_C}], but insertion of a cosmid carrying

the *S. clavuligerus* CA cluster (not including the *ccaR* gene) conferred clavulanic acid production on *S. flavogriseus*::[SCos-CA] particularly in TBO and YEME media; these results suggest that some of the *S. flavogriseus* CA genes are inactive. The known heptameric sequences recognized by CcaR in *S. clavuligerus* are poorly or not conserved in *S. flavogriseus*. Quantitative RT-PCR analysis of the CA gene clusters of *S. clavuligerus* and *S. flavogriseus* showed that the average expression value of the expressed genes in the former strain was in the order of 1.68-fold higher than in the later. The absence of CA production by *S. flavogriseus* can be traced to the lack of expression of the essential genes *cyp*, *orf12*, *orf13*, *orf14*, and *oppA2*. Heterologous expression of *S. clavuligerus* CA gene cluster in *S. flavogriseus*::[SCos-CA] was 11- to 14-fold lower than in the parental strain, suggesting that the genetic background of the host strain is important for optimal production of CA in *Streptomyces*.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00253-013-5148-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

R. Álvarez-Álvarez · Y. Martínez-Burgo · J. Martín · P. Liras (✉)
Microbiology Section, Department of Molecular Biology, Faculty of
Biology and Environmental Sciences, Vegazana Campus,
University of León, León 24071 Spain
e-mail: paloma.liras@unileon.es

R. Álvarez-Álvarez
e-mail: ralva@unileon.es

Y. Martínez-Burgo
e-mail: ymarb@unileon.es

R. Álvarez-Álvarez · R. Pérez-Redondo · P. Liras
Institute of Biotechnology INBIOTEC, Av. Real 1,
León 24006 Spain

R. Pérez-Redondo
e-mail: r.perez.redondo@unileon.es

A. Braña
Fundamental Biology Department, Faculty of Medicine and
University Institute of Oncology from the Principado de Asturias
(I.U.O.P.A), University of Oviedo, Oviedo 33006 Spain
e-mail: afb@uniovi.es

Keywords Genomes · Clavulanic acid · Gene clusters ·
Heterologous expression · *Streptomyces clavuligerus*.
Streptomyces flavogriseus · *Saccharomonospora viridis*

Introduction

Clavulanic acid (CA) is a β -lactamase inhibitor with clam structure produced industrially from cultures of *Streptomyces clavuligerus*. The CA molecule is formed by condensation of a five-carbon fragment of arginine (the ornithine moiety) with a three-carbon glyceraldehyde-3-phosphate unit (Khaleeli et al. 1999; Valentine et al. 1993) by the carboxyethylarginine (CEA) synthase encoded by *ceaS2* (Pérez-Redondo et al. 1999). The product of this condensation, carboxyethylarginine, is cyclized to proclavaminic acid by the β -lactam synthetase (*bls2*) (Bachmann et al. 1998) and modified in sequential steps by the clavamate synthetase (*cas2*) and the proclavaminic acid hydrolase (*pah2*) that removes the amidino group of arginine

to produce clavaminic acid (Marsh et al. 1992; Aidoo et al. 1994) (Fig. 1a). The known late steps of the CA pathway involve at least two enzymes, the glycyl clavaminic acid synthase (encoded by *gcaS*) forming the peptide-like intermediate N-glycyl-clavaminic acid. This compound is the precursor of clavalddehyde from which clavulanic acid is formed by the final enzyme of the pathway, clavalddehyde reductase (Car) (Pérez-Redondo et al. 1998; Nicholson et al. 1994).

Besides the biosynthetic genes encoding enzymes of the pathway, some additional genes located in the CA cluster are important for CA production. These include *oppA1* and *oppA2*, encoding two oligopeptide permeases; *cyp*, encoding a P450 cytochrome monooxygenase; and *orf12*, encoding a putative lipoprotein. Disruption of each of these genes led to lack of CA production (Bachmann et al. 1998; Mellado et al. 2002; Lorenzana et al. 2004). Other genes in the cluster (*orf13*, *orf14*, and *oat2*) are required for maximum CA production, but their disruption still allows some production of the β -lactamase inhibitor (for a review, see Liras et al. 2011).

The CA gene cluster of *S. clavuligerus* is adjacent to the cephamycin C gene cluster (including 17 genes from *bla* to *pbpR*). A SARP-type regulatory gene, *ccaR*, controlling clavulanic acid and cephamycin C biosynthesis (Pérez-Llarena et al. 1997a) is located within the cephamycin C gene cluster. A second regulatory gene, *claR*, of the LysR family, located in the CA cluster, controls the expression of genes for the late steps of the CA pathway (Pérez-Redondo et al. 1998; Paradkar et al. 1998).

The ability to produce β -lactams and other secondary metabolites is usually restricted to a few species within different genera (Martín et al. 2000; Martín and Liras 2010), and this ability is due to (1) the ancestral assembling of the gene cluster or (2) to the acquisition of genes by horizontal transfer either in the same species (there are two sets of paralogous clavam genes in *S. clavuligerus*) or between different species (Liras et al. 1998). The availability of microbial genomes is revealing the existence of gene clusters for secondary metabolites which are not expressed. The awakening of these silent clusters is a

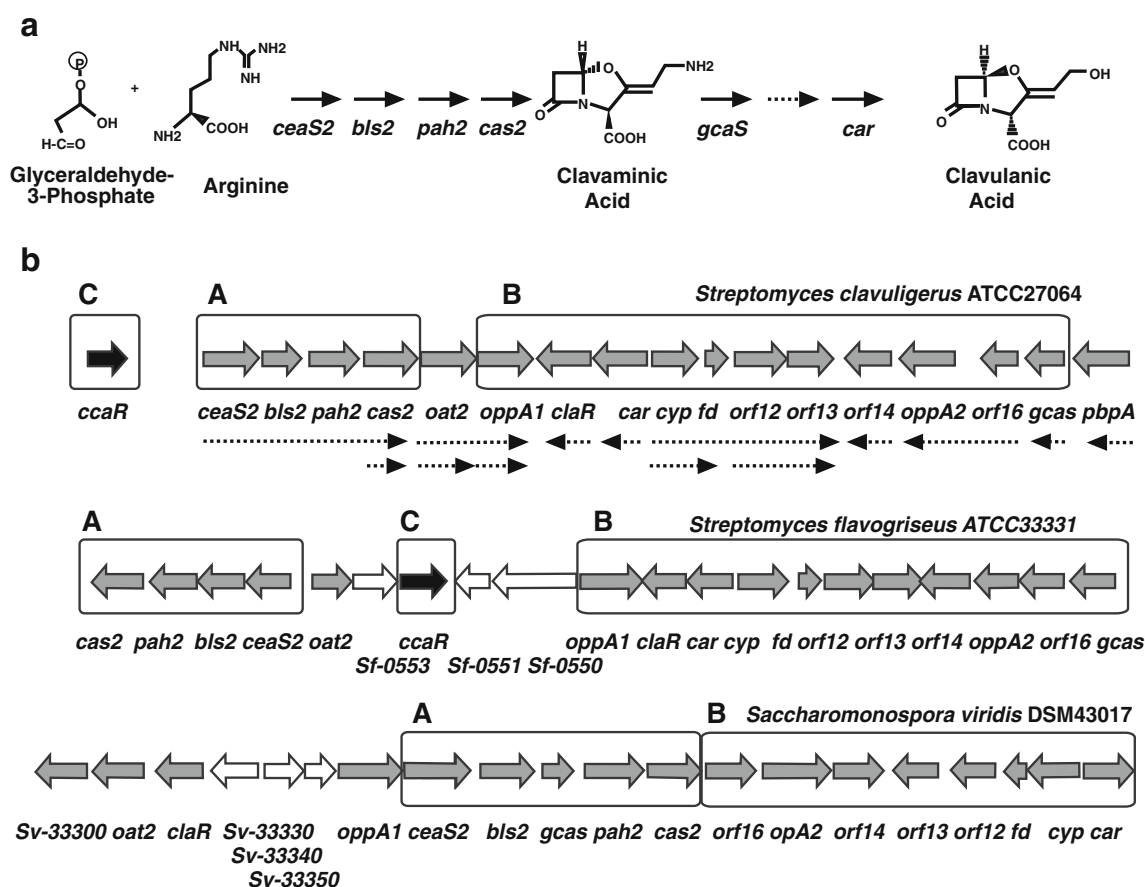


Fig. 1 Clavulanic acid biosynthesis pathway and gene clusters. **a** Scheme of the clavulanic acid pathway. The gene encoding enzymes involved in the different steps are indicated. **b** Clavulanic acid gene cluster in *S. clavuligerus*, *S. flavogriseus*, and *Sac. viridis*. The transcriptional pattern of

the *S. clavuligerus* cluster is indicated with broken arrows. The grouped subclusters (blocks A, B, and C) referred in the text are enclosed in square boxes. The regulatory gene *ccaR* (block C) is indicated with a black-filled arrow

challenge for the pharmaceutical industry and requires understanding of the molecular basis for this lack of expression (Lauretí et al. 2011).

Taking into account the increasing number of fully or partially sequenced microbial genomes (www.ncbi.nlm.nih.gov), we undertook the search for other putative CA gene clusters in different microorganisms that may contain (or lack) additional genes. Our aim was to test production of CA or related compounds in different media by high-performance liquid chromatography (HPLC) and biological assays to determine if those novel CA gene clusters were expressed.

In this work, the CA cluster of *Streptomyces flavogriseus* and *Saccharomonospora viridis* (hereafter abbreviated as *Sac. viridis*) was analyzed, and the production of CA by these strains was tested. In addition, the heterologous expression of the *S. clavuligerus* CA cluster in *S. flavogriseus* was allowed to identify non-expressed genes that explain the silent nature of the *S. flavogriseus* CA cluster.

Materials and methods

Strains and culture conditions

Streptomyces strains used in this work are described in Table 1. They were grown at 28 °C and 220 rpm in 500-ml baffled flasks containing 100 ml TSB medium for 24 h to an OD_{600 nm} of 6.5 and used to inoculate (5 % v/v) the final cultures. The following media were used to grow the *Streptomyces* species: defined SA and MG as described by

Paradkar et al. (1998) and Doull and Vining (1989). Complex TSB, YEME, R5 media, MEY, or MS as described by Kieser et al. (2000), TBO as described by Higgins et al. (1974), and ISP4 (Difco™). Kanamycin (50 µg/ml), thiostrepton (10 µg/ml), hygromycin (50 µg/ml), and nalidixic acid (25 µg/ml) were added to the cultures when required.

Clavulanic acid analysis

Clavulanic acid production was quantified using bioassay with *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665 as test strain as indicated by Romero et al. (1984). When required, the bioassays were repeated in plates lacking penicillin G. Broth of the cultures of *S. flavogriseus*::[SCos-AC] was derivatized with imidazole as described by Foulstone and Reading (1982). These samples were analyzed by HPLC in a SunFire column (5 µm, 4.6×250 mm; Waters, Milford, MA, USA), using an isocratic elution with acetonitrile and 0.1 % trifluoroacetic acid in water (10:90) at 1 ml/min. Peaks were detected at 318 nm. For HPLC-MS analysis, an Alliance chromatographic system coupled to a ZQ4000 mass spectrometer and an Atlantis T3 column (3 µm, 2.1×150 mm; Waters, Milford) was used. Samples (10 µl) were injected and eluted with 0.1 % formic acid in water during 4 min, followed by a linear gradient from 0 to 40 % acetonitrile over 16 min at 0.2 ml/min. MS analysis were done by electrospray ionization in the negative mode, with a capillary voltage of 3 kV and a cone voltage of 20 V. Clavulanic acid was detected by selected ion recording at *m/z* 198. Pure clavulanic acid (Antibióticos SA, León, Spain) was used as standard.

Table 1 *Streptomyces* strains used in this work

Strain	Origin	Characteristics of the strain
<i>S. clavuligerus</i> ATCC 27064	ATCC	Wild-type strain
<i>S. clavuligerus</i> $\Delta ccaR::tsr$	Alexander and Jensen 1998	Clavulanic acid and cephamycin C non producer. Thiostrepton resistant
<i>S. clavuligerus</i> ($\Delta ccaR::tsr$):: [P _{fur} -ccaR _F]	This work	Clavulanic acid and cephamycin C non producer. Thiostrepton resistant. It carries, integrated in the genome, the <i>ccaR_F</i> gene expressed from the P _{fur} promoter
<i>S. flavogriseus</i> ATCC 33331	ATCC	Wild-type strain
<i>S. flavogriseus</i> ::[P _{fur} -ccaR _C]	This work	Clavulanic acid non producer. It carries the <i>ccaR_C</i> gene expressed from the P _{fur} promoter of <i>S. coelicolor</i> , integrated in the genome. Hygromycin B resistant
<i>S. flavogriseus</i> ::[SCos-CA]	This work	Clavulanic acid producer. It carries the [SCos-AC] containing the clavulanic acid gene cluster of <i>S. clavuligerus</i> integrated in the genome. Kanamycin and tetracycline resistant
<i>S. flavogriseus</i> ::[P _{fur} -ccaR _C]:: [SCos-CA]	This work	Clavulanic acid producer. It carries integrated in the genome [SCos-AC] and the <i>ccaR_C</i> gene expressed from the P _{fur} promoter. Kanamycin, tetracycline, and hygromycin B resistant
<i>S. coelicolor</i> M1146	Gomez-Escribano and Bibb 2011	Strain for expression of heterologous gene clusters

Nucleic acid manipulation

Oligonucleotides

Oligonucleotides used in this work (Laboratorios Conda, Madrid, Spain) are shown in Table S1. The oligonucleotides designed to discriminate orthologous genes of *S. clavuligerus* ATCC 27064 and *S. flavogriseus* ATCC 33331 were tested in both strains to ensure the specific amplification of the analyzed gene.

Isolation of nucleic acid

DNA was obtained by the modified Kirby method as described by Kieser et al. (2000). RNA was obtained using the RNeasy kit (Qiagen). Samples to extract RNA were taken at 24 and 48 h of culture. The RNA was quantified in a NanoDrop spectrophotometer, the integrity analyzed using a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies), and the chips included in the RNA 6000 Nano LabChip® kit (Agilent).

Construction of plasmids [P_{fur}-ccaR_F] and [P_{fur}-ccaR_C]

Using the DNA of *S. flavogriseus* and the oligonucleotides Sfla_0552-D and Sfla_0552-R (Table S1), an 854-bp DNA fragment was amplified containing NcoI and HindIII digestion sites at the ends. This DNA fragment, containing the *ccaR_F* gene (Sfla_0552 gene, orthologous to *ccaR_C*) was ligated to plasmid pUFurReg digested with the same enzymes to introduce *ccaR_F* in phase downstream of the constitutive promoter P_{fur} (Ortiz de Orue Lucana et al. 2003) to avoid the regulation by sigma-antisigma factors of *ccaR* (Bignell et al. 2005). The *ccaR_F*-containing fragment was isolated with BamHI-HindIII, filled with Klenow and subcloned in the EcoRV site of the integrative vector pMS82 (Matthew et al. 2003). The resulting plasmid [P_{fur}-ccaR_F] was transformed in *E. coli* ET125-67[pUZ8002], which was later conjugated with *S. clavuligerus* Δ*ccaR::tsr* to give *S. clavuligerus* (Δ*ccaR::tsr*):[P_{fur}-ccaR_F]. To construct [P_{fur}-ccaR_C], the *S. clavuligerus* *ccaR_C* gene was amplified by PCR using oligonucleoties SCLAV_ccaR-D and SCLAV_ccaR-R which carry at the ends an NcoI and a HindIII site, respectively. The following steps were carried out in parallel with those described for [P_{fur}-ccaR_F].

Location and analysis of the [SCos-CA] cosmid

Two DNA fragments from the clavulanic acid gene cluster were amplified. They corresponded to (1) a 502-bp DNA fragment internal to *ceaS2* which was amplified with oligonucleotides *ceaS2_D* and *ceaS2_R* and (2) a 516-bp DNA fragment containing the intergenic region and part of the *orf18* and *gcaS* genes, which was amplified with oligonucleotides *orf18-gcaS_D* and *orf18-gcaS_R*. The amplified regions were used to

scan a SuperCos gene library of *S. clavuligerus* DNA (Robles-Reglero and Liras, unpublished results). One cosmid giving positive hybridization with both probes, analyzed by restriction digestion, PCR of internal zones, and partial sequencing, was found to carry the whole CA gene cluster. This cosmid, which will be named [SCos-CA], carries an insert including genes from *ceaS2* to *gcaS* but not carry the *ccaR* gene.

Vector pFL1272, a pIJ787-derived plasmid (Eustáquio et al. 2005), was digested with XbaI, and the integration cassette (containing the *int* and *tet^R* genes, and the *att* site of φC31) was isolated and filled with Klenow in the presence of thymines and cytosines. Cosmid [SCos-CA] was digested at a single site with HindIII, the ends were filled with Klenow in the presence of adenines and guanines, and the linear fragment was ligated to the pFL1272 integration cassette. The resulting construction was transformed in *E. coli* DH5α and colonies resistant to both kanamycin and tetracycline were isolated. After the confirmation of the correct construction, the cosmid was introduced in *E. coli* ET12567[pUZ8002] which was conjugated with spores of *S. flavogriseus*. Exconjugants resistant to kanamycin were tested by PCR for the presence of the [SCos-CA] cosmid. Ninety percent of the exconjugants tested showed amplification by PCR of a 1,700-bp DNA fragment containing *oppA2* which was not amplified when DNA from *S. flavogriseus* ATCC 33331 was used.

RT-PCR

The one-step reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) mixture contained in a 20-μl volume RNA template (200 ng), reaction mixture 1X, oligonucleotides 0.5 mM each, DMSO (5 %), *SuperScriptTM II* reverse transcriptase, and *Platinum[®] Taq 2 U* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Control reactions contained *Platinum[®] Taq* DNA polymerase but no reverse transcriptase. The reaction to synthesize cDNA was carried out at 55 °C for 30 min. Amplification by PCR of the cDNA (30 or 35 cycles) was as follows: 95 °C/30 s; 60 °C/30 s; 72 °C/40 s, and a final extension of 72 °C/10 min. Controls (not shown) to test the *S. clavuligerus* CA gene expression in the different media were always included using oligonucleotides already tested for *S. clavuligerus* CA gene amplification (Santamarta et al. 2011; López-García et al. 2010).

RT-qPCR

Gene expression analysis by reverse-transcriptase quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was performed as previously described (Kurt et al. 2013). The quantification of gene expression was performed by the 2^{-ΔCt} method (Livak and Schmittgen 2001; Schmittgen and Zakrajsek 2000), using the gene *hrdB* as internal control (Aigle et al. 2000).

Results

Genes for clavulanic acid biosynthesis occur in other actinomycetes different from *S. clavuligerus*

The complete clavulanic acid gene cluster occurs infrequently in the genome of actinomycetes. This cluster is located side by side to the cephamycin C gene cluster in *S. clavuligerus*, *Streptomyces jumonjinensis*, and *Streptomyces katsuharamanus* (Ward and Hodgson 1993), but no information on the CA gene cluster sequence of the last two species is available. *Streptomyces antibioticus* Tü1718, a clavam producer (Nobary and Jensen 2012; Janc et al. 1995), contains a complete *ceaS-bls-pah-cas* cluster for the early genes of CA biosynthesis but lacks the genes for the late steps of the CA pathway. A complete CA cluster is present in *S. flavogriseus* ATCC 33331 (Sfla_0539 to Sfla_0558) (Fig. 1B), previously unknown to be a clavulanic acid producer, and in *Sac. viridis* DSM 43017 (Svir_33300 to Svir_33490); this is an actinomycete, member of the *Pseudonocardiaceae* family, with Gram-negative staining properties (Pati et al. 2009) and a circular chromosome different to *Streptomyces* species which have a linear chromosome. In addition, some genes of the CA cluster are present in the Gram-positive bacterium *Anoxybacillus flavithermus* WK1.

The clusters in *S. flavogriseus* ATCC 33331 and *Sac. viridis* DSM 43017 contain all the CA genes and show a strong conservation of several blocks of genes of the known CA cluster but with important differences between them. All the CA proteins of *S. flavogriseus* show a similar length and higher percentage of amino acid identity with those of *S. clavuligerus* (ranging from 88 % for OppA1 to 61 % for ClaR) than with those of *Sac. viridis* (Table 2). In *Sac. viridis*, the *claR* gene, encoding the LysR-type regulator of the late steps of the pathway, has a poor identity (31 %) with respect to *S. clavuligerus claR* (as compared to the 61 % of *S. flavogriseus claR*), but the identity is spread throughout the whole gene what excludes frameshift mutations.

The GcaS protein encoded using *S. flavogriseus* and *Sac. viridis* supports the annotation of a short version for *S. clavuligerus* GcaS as suggested by Arulanantham et al. (2006). Also, the putative membrane protein encoded by *orf13* of *S. clavuligerus* has a stretch of 26 amino acids at the C-terminal end (amino acids 433 to 458) which are not present in the other orthologous proteins. However, the *orf12*-encoded putative lipoprotein of *S. clavuligerus* contains several internal amino acid stretches (amino acids 1–18, 49–55, 75–80, 146–155, 198–226, 346–358, 380–388, and 433–458) that are not present in the *S. flavogriseus* and *Sac. viridis* orthologous.

Organization of the clavulanic acid gene cluster in *S. flavogriseus* and *Sac. viridis*

All the genes described in the CA cluster of *S. clavuligerus* are present in *S. flavogriseus* with the exception of *pbpA*. This

gene encodes a penicillin G binding protein (Ishida et al. 2006) but its involvement in CA biosynthesis is not clear (Liras et al. 2011). Genes with 79 and 39 % identity to the orthologous *S. clavuligerus pbpA* are 3.25 Mb and 3.2 kb away, respectively, from the CA cluster in *S. flavogriseus* and *Sac. viridis*.

Three blocks of genes (Fig. 1b) are almost identical in the CA cluster of the three strains and in the clavam producer *S. antibioticus*:

Block A

Block A (Fig. 1b) includes the genes for the early steps of CA biosynthesis (*ceaS2-bls2-pah2-cas2*) which are co-transcribed in *S. clavuligerus* (Santamarta et al. 2011), next to *oat2*, a non-essential gene related to arginine utilization, which is in the opposite orientation in *S. flavogriseus* and *Sac. viridis*. These genes are in the same order in *S. clavuligerus*, *S. flavogriseus*, and *S. antibioticus* (Nobary and Jensen 2012), but genes in block A are in the opposite orientation with respect to block B in *S. flavogriseus* (Fig. 1b).

Block B

A large set of genes (block B in Fig. 1b) in *S. clavuligerus* carries *oppA1-claR-car-cyp-fd-orf12-orf13-orf14-oppA2-orf16-gcaS* and includes late biosynthetic, regulatory, and signal transport genes. This block is fully conserved in *S. flavogriseus* and has the opposite orientation in relation to block A in *S. flavogriseus* and *Sac. viridis* as compared to *S. clavuligerus*. It is interesting that in *Sac. viridis*, block B lacks the *claR*, *oppA1*, and *gcaS* genes, which are located elsewhere in the cluster. In *Sac. viridis*, block A contains in addition, inserted between *bls2* and *pah2*, the *gcaS* gene which in *S. clavuligerus* and *S. flavogriseus* is located in block B.

The regulatory gene *ccaR* of *S. flavogriseus* is located inside the CA cluster at a different location than in *S. clavuligerus*

Block C

The third block (Fig. 1b) includes only the regulatory gene *ccaR*. This gene encodes the SARP-type regulatory protein CcaR that, in *S. clavuligerus*, binds heptameric sequences upstream of *ceaS2* and *claR* and activates expression of these genes and of those located downstream of *ceaS2* (Santamarta et al. 2011). The *ccaR* gene in *S. clavuligerus* is located at 21.5 kb away from the CA cluster, central to the cephamycin C gene cluster (Pérez-Llarena et al. 1997a). *S. flavogriseus* lacks a cephamycin C biosynthesis cluster, and in this species, *ccaR* is located downstream of Sfla_0553, in the middle of the CA cluster.

Table 2 Comparative analysis of clavulanic acid biosynthesis genes in *S. clavuligerus* ATCC 27064, *S. flavogriseus* ATCC 33331, and *Sac. viridis* DSM 43017

<i>S. clavuligerus</i> ATCC 27064	Gene	Product	Size (aa) ^a	<i>S. flavogriseus</i> ATCC 33331	Size (aa) ^a	Identity/ similarity (%) ^b	<i>Sac. viridis</i> DSM 43017	Size (aa) ^a	Identity/ similarity (%) ^b
SCLAV_4197	<i>ceaS2</i>	Carboxyethylarginine synthase 2	586	Sfla_0555	571	84/90	Svir_33370	556	68/79
SCLAV_4196	<i>bls2</i>	CEA beta-lactam-synthase 2	513	Sfla_0556	509	67/76	Svir_33380	512	51/63
SCLAV_4195	<i>pah2</i>	Proclavamate amidohydrolyase 2	313	Sfla_0557	316	84/92	Svir_33400	343	68/78
SCLAV_4194	<i>cas2</i>	Clavamate synthase 2	325	Sfla_0558	324	78/85	Svir_33410	323	63/75
SCLAV_4193	<i>oat2</i>	Glutamate N-acetyltransferase 2	399	Sfla_0554	392	80/86	Svir_33310	385	70/79
SCLAV_4192	<i>oppA1</i>	ABC-type dipeptide transport system	564	Sfla_0549	553	88/92	Svir_33360	549	83/90
SCLAV_4191	<i>claR</i>	Transcriptional activator	432	Sfla_0548	488	61/73	Svir_33320	468	31/48
SCLAV_4190	<i>car</i>	Clavalddehyde reductase	248	Sfla_0547	247	67/80	Svir_33490	247	68/79
SCLAV_4189	<i>cyp</i>	Cytochrome P450-SU2	408	Sfla_0546	410	77/87	Svir_33380	406	71/83
SCLAV_4188	<i>fd</i>	Ferredoxin	71	Sfla_0545	70	69/80	Svir_33470	68	60/69
SCLAV_4187	<i>orf12</i>	Beta-lactamase-like protein	458	Sfla_0544	432	61/67	Svir_33460	424	52/66
SCLAV_4186	<i>orf13</i>	Integral membrane protein	340	Sfla_0543	327	62/73	Svir_33450	314	63/75
SCLAV_4185	<i>orf14</i>	Acetyltransferase GNAT family protein	339	Sfla_0542	343	62/72	Svir_33440	331	62/72
SCLAV_4183	<i>oppA2</i>	ABC-type dipeptide transport system	562	Sfla_0541	567	81/88	Svir_33430	562	76/84
SCLAV_4182	<i>orf16</i>	DUF482 domain-containing protein	401	Sfla_0540	391	70/80	Svir_33420	384	68/78
SCLAV_4181	<i>gcas</i>	Biotin carboxylase	529	Sfla_0539	429	85/89	Svir_33390	428	76/85
SCLAV_4180	<i>pbpA</i>	Penicillin-binding protein	529	Sfla_3620	494	79/89	Svir_00380	488	39/56
SCLAV_4204	<i>ccaR</i>	SARP-type regulator	262	Sfla_0552	262	45/63	–	–	–
SCLAV_4202	<i>blp</i>	β-lactamase inhibitory protein	182	Sfla_0521	186	44/56	–	–	–

^a Number of amino acids in the protein

^b Amino acid identity/similarity to the orthologous *S. clavuligerus* protein

Surprisingly, no *ccaR* gene is present in the CA cluster of *Sac. viridis*; the gene with highest similarity to *ccaR* is Svir_28940 (32 % amino acid identity), located about 40 kb away from the CA cluster.

Heterogeneous genes inserted in the CA cluster of *S. flavogriseus* and *Sac. viridis*

Three genes, unrelated to the *S. clavuligerus* CA gene cluster, are inserted into the CA cluster of *S. flavogriseus*. One gene, Sfla_0550, encodes a protein with 53 % identity to NocE, a protein with a SGNH hydrolase-type esterase domain encoded by SCLAV_5162 in *S. clavuligerus* but outside the CA cluster. In *Nocardia uniformis*, NocE is a protein of unknown function encoded by a gene (*nocE*) located in the nocardicin cluster (Gunsinor et al. 2004). The second gene, Sfla_0551, encodes a small protein (93 amino acids) annotated as a transport-related protein but with no correspondence to any protein required for clavulanic acid biosynthesis. The third gene inserted in the cluster, Sfla_0553, encodes a 335 amino acid protein 51 % identical to SCLAV_4203, a protein of unknown function encoded by *orf11* which in *S. clavuligerus* is located in the cephamycin C gene cluster. It is unclear if the presence of these genes affects CA production in *S. flavogriseus* and the elucidation will require studies using deleted mutants.

Three CA biosynthesis-unrelated genes, Svir_33330, Svir_33340, and Svir_33350, are inserted in the CA cluster of *Sac. viridis* (Fig. 1b); they encode, respectively, a 625-amino acid penicillin-binding protein with putative transpeptidase activity, a 1,414-amino acid hypothetical protein with some similarity to NocE, and an 88-amino acid hypothetical protein.

Expression of the CA gene cluster and clavulanic acid production using cultures of *S. flavogriseus*

Due to the lack of a regulatory *ccaR* gene in *Sac. viridis* genome and since initial tests showed that *Sac. viridis* grows poorly in our standard media and growth conditions, we decided to focus in *S. flavogriseus* to study clavulanic gene expression.

Both *S. clavuligerus* and *S. flavogriseus* were grown in parallel cultures in nine different media, the complex YEME, MS, R5, MEY, TBO, ISP4, and TSB media and the defined MG and SA media under the normal growth conditions used for *S. clavuligerus*. While *S. clavuligerus* produced CA with different yields in all the media, no detectable production of CA by *S. flavogriseus* was observed at any time using bioassays or by HPLC analysis of broth of the liquid cultures. Supplementation of the *S. flavogriseus* cultures with the CA precursors glycerol 0 (2 % v/v), arginine (5 or 10 mM), or both did not result in CA production (data not shown).

To test whether the lack of CA production was due to the absence of transcription, RNA was purified from *S. flavogriseus* cultures after incubation in YEME, R5, TSB, and SA media for 24 and 48 h, and RT-PCR analyses were performed for the biosynthetic genes and some other genes essential for CA production using oligonucleotides specific for *S. flavogriseus* genes (see Table S1). Positive and negative PCR controls (not shown) confirmed that the sets of oligonucleotides used were effective in amplification and discriminate between *S. clavuligerus* and *S. flavogriseus* CA orthologous genes.

The results of the *S. flavogriseus* RT-PCR reactions are shown in Fig. 2. A clear expression of the *ccaR* and *claR* regulatory genes was observed, especially in YEME, R5, and SA media that suggested that the genes for the early and late steps of the pathway activated using these regulators might be also expressed. However, the expression of *orf12*, *orf14*, and *orf16* in *S. flavogriseus* was low or undetectable in all the tested media, and the expression of *cyp*, *car*, and *cas2* was low (data not shown), even after 35 amplification cycles. The low expression of some biosynthesis genes and the undetectable levels of others could explain the lack of CA production using *S. flavogriseus* in the culture conditions tested.

The *ccaR_F* gene of *S. flavogriseus* and the *ccaR_C* of *S. clavuligerus* are not functional in the heterologous strains

Although the endogenous *ccaR* gene (named *ccaR_F* thereafter) was expressed in *S. flavogriseus* ATCC 33331, as shown by RT-PCR (see Fig. 2), the protein might be present at low levels or might not be functional what could explain the silent nature of *S. flavogriseus* CA cluster. To eliminate these hypotheses,

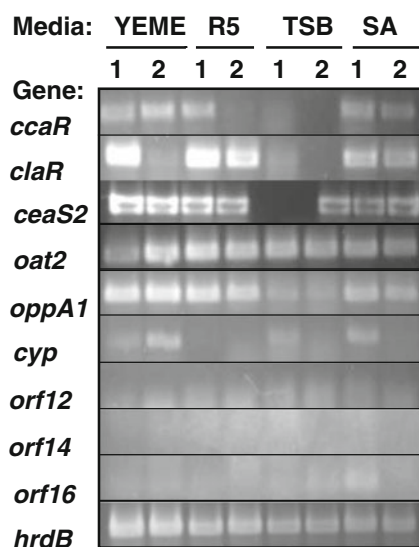


Fig. 2 Expression of the CA biosynthesis genes as detected by RT-PCR. Isolated RNA from *S. flavogriseus* cultures grown in YEME, R5, TSB, and SA media for 24 h (1) and 48 h (2) was submitted to 35 cycles of amplification for the genes indicated at the left side of the figure. The *hrdB* gene is used as external control

we introduced the *S. clavuligerus ccaR* gene (that will be named *ccaR_C*) expressed from the P_{fur} promoter in *S. flavogriseus* ATCC 33331 by conjugation. The strain obtained, *S. flavogriseus::[P_{fur}-ccaR_C]*, expressed *ccaR_C* as detected by RT-PCR but did not produce clavulanic acid in any media (data not shown), suggesting that *ccaR_C* is not functional in *S. flavogriseus*, perhaps due to the lack of conserved heptameric CcaR-binding sequences in the putative target promoters.

To determine whether the *S. flavogriseus ccaR_F* was able to complement *ccaR_C* in the disrupted mutant *S. clavuligerus ΔccaR::tsr*, unable to produce clavulanic acid or cephamycin C, *ccaR_F* (under the P_{fur} promoter) was introduced in *S. clavuligerus ΔccaR::tsr*. Seven exconjugants of *S. clavuligerus (ΔccaR::tsr)::[P_{fur}-ccaR_F]* were grown in solid and liquid TSB, MEY, and TBO media for up to 60 h. However, neither cephamycin C nor clavulanic acid was detected in any conditions in spite of the positive expression of *ccaR_F*, as detected by RT-PCR. This result suggests that the CcaR_F protein is unable to complement the lack of CcaR_C in the *S. clavuligerus* disrupted mutant, perhaps because CcaR_F does not recognize promoters essential for clavulanic acid biosynthesis located in the CA gene cluster of *S. clavuligerus*. Positive controls complementing the $\Delta ccaR$ *S. clavuligerus* strain with *ccaR_C* proved that the homologous regulatory protein complements the CA production as reported previously (Pérez-Llarena et al. 1997a, 1997b)

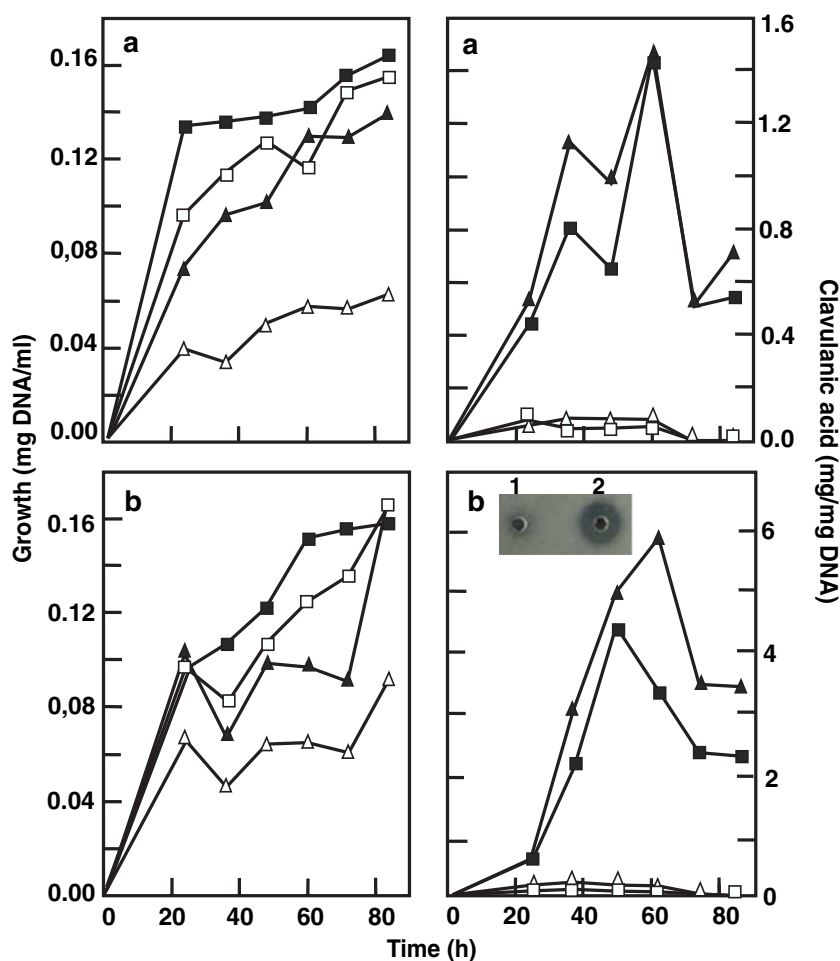
Heterologous expression of *S. clavuligerus* clavulanic acid cluster in *S. flavogriseus* ATCC 33331 and *S. coelicolor* M1146

Since the endogenous CA cluster of *S. flavogriseus* was not functional and *ccaR_C* did not improve CA production, we decided to study the heterologous expression of the complete *S. clavuligerus* CA cluster (except the *ccaR* gene that is in the cephamycin C cluster) in *S. flavogriseus* ATCC 33331 and in the model organism *S. coelicolor* M1146 to analyze the influence of the genetic background of these strains on the CA cluster expression. The whole cluster for clavulanic acid, present in cosmid [SCos-CA], was introduced by conjugation in these strains and in derived strains carrying the *ccaR_C* gene expressed from the P_{fur} promoter; the strains obtained were named *S. flavogriseus::[SCos-CA]*, *S. flavogriseus::[P_{fur}-ccaR_C]:[SCos-CA]*, and *S. coelicolor::[P_{fur}-ccaR_C]:[SCos-CA]*.

These strains and their controls lacking [SCos-CA], were tested in the nine solid media previously described. No production of CA was ever detected in the *S. coelicolor* exconjugants (data not shown). However, a clear inhibition zone produced by CA was observed in plugs of *S. flavogriseus::[SCos-CA]* and *S. flavogriseus::[P_{fur}-ccaR_C]:[SCos-CA]* (Fig. 3 inset) but not in the control *S. flavogriseus* grown in MS, ISP4, and particularly in MEY and TBO media.

To validate these results, two exconjugants of *S. flavogriseus::[SCos-CA]* and *S. flavogriseus::[P_{fur}-ccaR_C]:[SCos-*

Fig. 3 Heterologous clavulanic acid production using exconjugants of *S. flavogriseus*. Growth (left panels) and clavulanic acid production (right panels) in MEY (a) and TBO medium (b) of *S. flavogriseus* ATCC 33331 (open triangles), *S. flavogriseus*::[P_{fur}-ccaR_C] (open squares), *S. flavogriseus*::[SCos-CA] (black triangles), and *S. flavogriseus*::[P_{fur}-ccaR_C]:[SCos-CA] (black squares). Inset in the lower-right panel: bioassays of broth samples from *S. flavogriseus* ATCC 33331 (1) and *S. flavogriseus*::[SCos-CA] (2) cultures grown in TBO medium for 48 h



CA] were separately grown in MEY and TBO liquid cultures using cultures of *S. clavuligerus* ATCC 27064 and *S. flavogriseus* ATCC 33331 as controls (Fig. 3). The growth of the strains was relatively similar with the exception of *S. flavogriseus* ATCC 33331 that grew more slowly. The MEY medium supported a faster growth with top growth values at 45 h of cultivation, while in TBO, the maximum growth value was reached at 70 h. Production of clavulanic acid was particularly high in TBO medium with values of 4.5 to 6 μg CA/mg DNA (0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$) at 45 h, about four- to fivefold higher than in MEY medium. These values were, however, lower than those of *S. clavuligerus* ATCC 27064 grown in the same medium and conditions (not shown) which reached maximal values of 87 and 750 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DNA (28.5 and 164.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in MEY and TBO media, respectively. The inhibition zone on penicillin-resistant *Klebsiella* bioassays produced using broths of the cultures is shown in the inset of Fig. 3.

Taken together, these results indicate that the *S. clavuligerus* CA genes (except *ccaR*) are functional in *S. flavogriseus*. Therefore, the lack of CA production in *S. flavogriseus* is due to lack of CA biosynthesis enzymes.

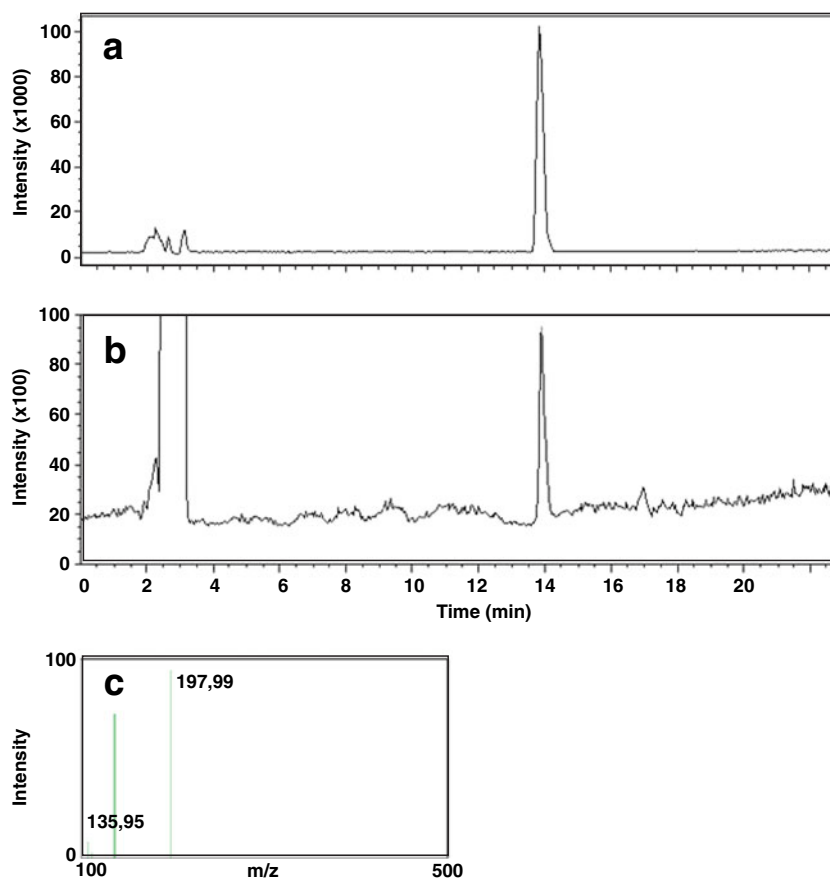
Confirmation by HPLC-MS that the product is clavulanic acid

To further confirm that the product responsible for the inhibition zones was clavulanic acid, the broth of cultures of two *S. flavogriseus*::[SCos-CA] exconjugants was analyzed by HPLC. A small peak was detected with the same retention time as authentic clavulanic acid (not shown). These broths were also analyzed by HPLC-MS. By electrospray ionization in the negative mode and selected ion recording at m/z 198, a peak eluting at 14 min was detected in both the standard and the cultures of two exconjugants (Fig. 4A,B). In both cases, mass spectra of that peak showed a negative ion, $[\text{M}-\text{H}]^-$, with an m/z value of 198, as expected for clavulanic acid (Fig. 4C).

Expression of the endogenous and heterologous clavulanic acid gene clusters in *S. flavogriseus* as determined by RT-qPCR

To further investigate the lack of clavulanic acid formation in *S. flavogriseus* ATCC 33331, we compared by RT-qPCR the expression of the clavulanic acid genes of *S. flavogriseus* ATCC 33331 and *S. clavuligerus* ATCC 27064. In addition,

Fig. 4 Mass chromatography obtained by selected ion recording at m/z 198. **a** Clavulanic acid standards (0.1 μg); **b** broth (10 μl) from a 60-h culture of *S. flavogriseus*::[SCos-CA] grown in TBO medium. **c** Mass spectra of the clavulanic acid peak at chromatogram B detected in negative mode (M-H)



expression of both the endogenous and the heterologous CA gene clusters were studied (using specific sets of oligonucleotides) in *S. flavogriseus*::[SCos-CA] which carries the CA cluster of *S. clavuligerus*. The studies were done at 48 h of growth in liquid TBO medium which support high CA formation using all the strains.

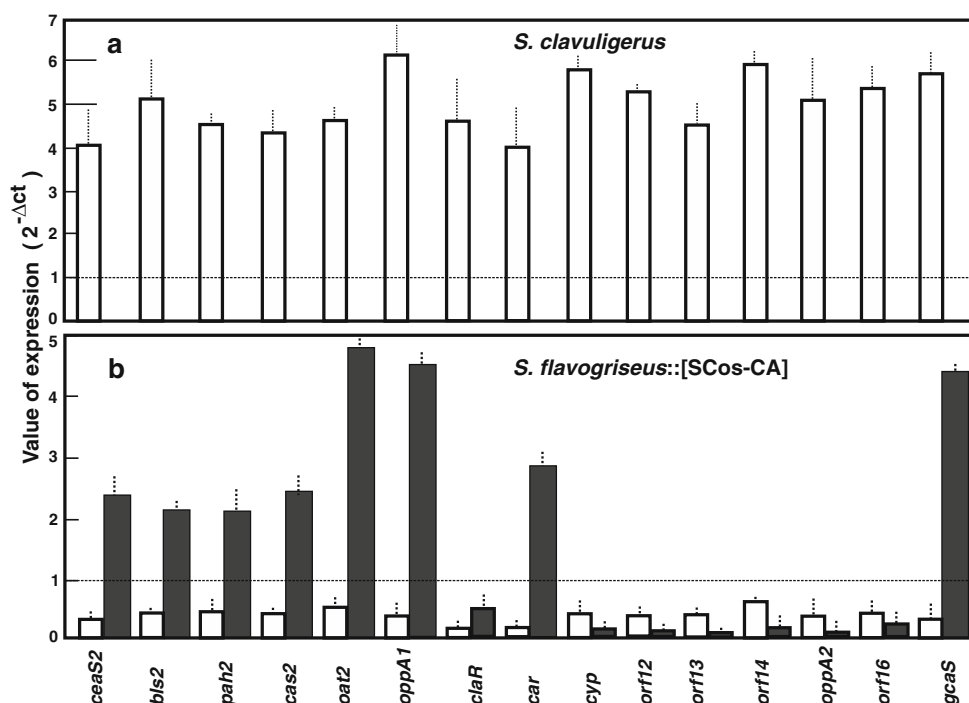
All the CA genes were well expressed in control *S. clavuligerus* ATCC 27064 (Fig. 5A) with expression values between 4 (*ceaS*, *car*) and 6 (*oppA1*). Interestingly, several genes of the endogenous CA cluster of *S. flavogriseus* ATCC 33331 (not shown) and *S. flavogriseus*::[SCos-CA] (Fig. 5B, black bars) were expressed with a similar pattern but at lower intensities in both *S. flavogriseus* strains. All the endogenous genes for the early steps of the pathway (*ceaS2* to *cas2*) were expressed in *S. flavogriseus*::[SCos-CA] with expression values of about 2 to 2.3, while *oat2*, *oppA1*, and *gcaS* reached values of 4 to 4.6. These expression values, even though lower than those of *S. clavuligerus* (Fig. 5A), should be high enough to support CA formation in *S. flavogriseus*. However, endogenous genes essential for CA formation as *cyp*, *orf12*, *orf13*, *orf14*, or *oppA2* were barely or not expressed (expression values around 0.01) in *S. flavogriseus* or *S. flavogriseus*::[SCos-CA]. The low expression of these genes, which might have an accumulative negative effect, is the most plausible explanation of the lack of

clavulanic acid production in this strain. All *S. clavuligerus* original genes are poorly expressed in the recombinant *S. flavogriseus*::[SCos-CA] (without the *S. clavuligerus ccaR* gene) (Fig. 5B, white bars) with average values of expression of 0.3 to 0.4, which was about 11- to 14-fold lower than in their *S. clavuligerus* natural host; however, there was an expression of the exogenous *cyp*, *orf12*, *orf13*, or *oppA2* genes that although small, still was three- to fourfold higher than in *S. flavogriseus* ATCC 33331. This expression of the heterologous genes explains the formation of CA by the recombinant *S. flavogriseus*::[SCos-CA] which in TBO reaches 0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ compared to the 164.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ produced by *S. clavuligerus* in the same medium. The absence of heterologous expression in *S. coelicolor* and the low expression in *S. flavogriseus* illustrate the important role of the rest of the genes (i.e., the genetic background) on the expression of the CA cluster.

Discussion

Streptomyces species are prolific producers of antibiotics and other related secondary metabolites (Martín et al. 2000; Bérdy 2012). The availability of an increasing number of genome sequences of species of *Streptomyces* (Pati et al. 2009; Ikeda

Fig. 5 Quantitative expression by RT-qPCR of the clavulanic acid biosynthesis genes. **A** *White bars* show the expression of the genes (indicated at the bottom of the figure) in *S. clavuligerus* grown in TBO medium after 48 h of culture. **B** Expression of the clavulanic acid biosynthesis genes in *S. flavoviridis*::[SCos-CA]. Expression of genes of the endogenous *S. flavoviridis* cluster is shown in *black bars*. Heterologous expression of genes of *S. clavuligerus* CA cluster in *S. flavoviridis*::[SCos-CA] is shown in *white bars*



et al. 2003; Bentley et al. 2002; Barreiro et al. 2012, among others) has provided evidence for the presence of about 20 to 30 gene clusters for secondary metabolites in each of the genomes (Bentley et al. 2002; Medema et al. 2010). However, the presence of these gene clusters does not mean that all of them are expressed (Lauretí et al. 2011). Many secondary metabolites gene clusters may be silent or expressed only at very low levels under the culture conditions used in the laboratory (Brakhage and Schroeckh 2011), but they might be expressed in natural environment resulting in an ecological advantage for the strain. An important challenge is to understand why silent clusters are silent and to modify the genes to achieve their expression.

In this work, we report the presence of a complete clavulanic acid gene cluster in two actinomycetes, *S. flavoviridis* and *Sac. viridis*. The organization of CA genes in these genomes shows gene conservation in specific subclusters similar to those of *S. clavuligerus*; however, these subclusters are rearranged in a patchwork-like organization, indicating that reorganization of these blocks has occurred during evolution of the clusters probably associated with horizontal transfer phenomena. We found previously a similar patchwork-like arrangement of the cephamycin C gene clusters in *Amycolatopsis* (formerly *Nocardia*) *lactamdurans* and *S. clavuligerus* (Liras et al. 1998; Enguita et al. 1998). It is very interesting that the genes of block A for the early steps of CA biosynthesis are also required for clavam biosynthesis in *S. antibioticus*, a strain that does not produce clavulanic acid and lacks blocks B and C (Nobary and Jensen 2012). These observations suggest that the full CA pathway has been evolutionarily assembled by combining an early

pathway (up to clavaminic acid formation, block A) common to the biosynthesis of antifungal clavams and the present “late” biosynthesis pathway of CA (block B).

An important difference between the CA cluster in *S. clavuligerus* and *S. flavoviridis* is the presence in the later of the *ccaR* gene, encoding a SARP-type regulator (block C in Fig. 1b) (Pérez-Llarena et al. 1997a). These differences suggest that intense reorganization processes have occurred within the genus *Streptomyces* that cannot be explained by simple rearrangements during vertical inheritance of the CA genes from a common *Streptomyces* ancestor.

S. flavoviridis did not produce CA in eight different culture media, in which *S. clavuligerus* produces high levels, and therefore, the *S. flavoviridis* CA cluster might be considered as silent. Several of the *S. flavoviridis* CA biosynthesis genes analyzed by RT-PCR were found to be expressed at different degrees depending on the media but always at low levels as reflected by the requirement of a high number of PCR cycles needed to detect their expression. RT-qPCR studies allowed to identify which genes of the CA cluster are really silent. They are *cyp*, *orf12*, *orf13*, *orf14*, and *oppA2*, all known to be essential for CA formation in *S. clavuligerus* (Mellado et al. 2002; Li et al. 2000; Lorenzana et al. 2004). Some of these genes are underexpressed in the absence of CcaR (Santamarta et al. 2011). The high expression of the genes for the early steps of the pathway and the poor expression of other genes suggest that *S. flavoviridis* is in an intermediate evolutionary stage and might lose eventually the functionality of the genes for the late steps, leading to a strain similar to *S. antibioticus* (Nobary and Jensen 2012).

Heterologous expression of particular genes to increase antibiotic production is a common strategy. Moreover, the heterologous expression of complete gene clusters is a new approach for novel antibiotic production based on the analysis of gene clusters located in rare actinomycetes (Tong et al. 2013) or in *Streptomyces* with unstable antibiotic gene expression levels. Specific *S. coelicolor* host strains have been constructed with this purpose (Gomez-Escribano and Bibb 2011). In some cases, as that of aminocoumarins or trithiazolopyridine-containing derived compounds, the heterologous expression in genetically modified strains of *S. coelicolor* and *S. lividans* is satisfactory (Eustáquio et al. 2005; Flinspach et al. 2010; Young and Walsh 2011) but other gene clusters, as that of holomycin, are poorly expressed (Huang et al. 2011; Robles-Reglero et al. 2013). When the *S. clavuligerus* CA cluster was introduced in *S. flavogriseus*, the genes were expressed although at very low levels, as detected by RT-qPCR, independently of the presence of the *S. clavuligerus* regulatory activator CcaR_C. Indeed, the introduction of the *S. clavuligerus* regulatory ccaRC gene, expressed from the P_{fur} promoter, does not improve significantly the low production of CA in *S. flavogriseus*.

An interesting question is why some genes of the *S. flavogriseus* CA gene cluster are not expressed since both the *ccaR* and *claR* regulatory activators are well expressed in this species (Fig. 2). The simplest explanation is that the promoter regions of those genes have evolved in *S. flavogriseus* being unable to make stable interactions with the RNA polymerase and the CcaR or ClaR positive regulators. A similar situation has been found with a 19-kb thienamycin-like cluster located 41 kb away from the CA cluster in *S. flavogriseus*. The thienamycin cluster, although apparently complete, is silent in several media (Blanco 2012) although there are no expression studies available.

S. flavogriseus is unable to use the heterologous CcaR_C regulatory protein of *S. clavuligerus* for the expression of its own CA genes when introduced in plasmid pMS82. Moreover, the *S. flavogriseus* CcaR_F protein activates expression of its own (homologous) CA genes in the wild-type *S. flavogriseus* to a lower degree than in *S. clavuligerus*. The lack of effect of CcaR_C on the *S. flavogriseus* CA genes might be explained by the lack of detectable heptameric sequences for CcaR_C binding (Santamarta et al. 2011) in the promoter regions of the *S. flavogriseus* CA biosynthesis genes.

The low degree of activation of the *S. clavuligerus* CA genes by CcaR_C, when the structural genes and the CcaR_C regulator (both from *S. clavuligerus*) are introduced in *S. flavogriseus*, suggests that a molecule required for full CcaR-mediated induction of homologous CA genes is deficient (at least partially) in *S. flavogriseus*. This might be a still-unknown ligand required for full CcaR activity as occur in other *Streptomyces* species (Wang et al. 2009; Xu et al. 2010). Interestingly, the constructions carrying [P_{fur}-ccaR_C] and [SCos-CA] result in heterologous production of clavulanic acid in *S. flavogriseus* but not in *S.*

coelicolor. This might reflect differences in the genetic background in both host microorganisms, with *S. coelicolor* phylogenetically much more distant in relation to *S. clavuligerus* than *S. flavogriseus* (Zhou et al. 2011). We propose that in many cases, heterologous expression may be limited by the lack of appropriate pools of precursors (as a result of different biosynthetic steps) or of unknown ligands or protein modifying systems that may decrease or even prevent the expression of an apparently complete gene cluster. Indeed, the availability of arginine, a well-known precursor of CA (Valentine et al. 1993; Romero et al. 1986), is probably affected by the very different organization of the *arg* gene clusters in *S. clavuligerus* and *S. coelicolor* (Rodríguez-García et al. 1997). Heterologous expression is easier if the host used has a very similar or at least a related pathway providing adequate precursors (e.g., rare amino acid biosynthetic pathways for heterologous expression of a non-ribosomal peptide compounds). This is the case of *S. flavogriseus* as host for the heterologous expression of CA genes when compared with *S. coelicolor*.

Acknowledgments This work was supported by grants BIO2009-09820 and LE046A11-2 from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and the Junta de Castilla y León, respectively. R. Álvarez-Álvarez and Y. Martínez-Burgo received PFU fellowships from the Spanish Ministry of Education, Culture and Sports. We appreciate the collaboration of Dr. T. López-García in the design of oligonucleotides and RT-qPCR experiments and the reception of plasmid pFL1272 from Dr. F. Lombo.

References

- 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
- Aigle B, Wietzorrek A, Takano E, Bibb MJ (2000) A single amino acid substitution in region 1.2 of the principal sigma factor of *Streptomyces coelicolor* A3(2) results in pleiotropic loss of antibiotic production. *Mol Microbiol* 37:995–1004
- Alexander DC, Jensen SE (1998) Investigation of the *Streptomyces clavuligerus* cephamycin C gene cluster and its regulation by the CcaR protein. *J Bacteriol* 180:4068–4079
- Arulanantham H, Kershaw NJ, Hewitson KS, Hughes CE, Thirkettle JE, Schofield CJ (2006) ORF17 from the clavulanic acid biosynthesis gene cluster catalyzes the ATP-dependent formation of *N*-glycyl-clavaminic acid. *J Biol Chem* 281:279–287
- Bachmann BO, Li R, Townsend CA (1998) Beta-Lactam synthetase: a new biosynthetic enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:9082–9086
- Barreiro C, Prieto C, Sola-Landa A, Solera E, Martínez-Castro M, Pérez-Redondo R, García-Estrada C, Aparicio JF, Fernández-Martínez LT, Santos-Aberturas J, Salehi-Najafabadi Z, Rodríguez-García A, Tauch A, Martín JF (2012) Draft genome of *Streptomyces tsukubaensis* NRRL 18488, the producer of the clinically important immunosuppressant Tacrolimus (FK506). *J Bacteriol* 174:3756–3757
- Bentley SD, Chater KF, Cerdeño-Tarraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, Collins M, Cronin A, Fraser A, Goble A, Hidalgo J, Homsby T, Howarth S, Huang CH, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabinowitz E, Rajandream MA,

- Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek A, Woodward J, Barrell BG, Parkhill J, Hopwood DA (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417:141–147
- Bérdy J (2012) Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are. *J Antibiot* 65:385–395
- Bignell DR, Tahlan K, Colvin KR, Jensen SE, Leskiw BK (2005) Expression of *ccaR*, encoding the positive activator of cephamycin C and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*, is dependent on *bldG*. *Antimicrob Agents Chemother* 49:1529–1541
- Blanco G (2012) Comparative analysis of a cryptic thienamycin-like gene cluster identified in *Streptomyces flavogriseus* by genome mining. *Arch Microbiol* 194:549–555
- Brakhage AA, Schroeckh V (2011) Fungal secondary metabolites - strategies to activate silent gene clusters. *Fungal Genet Biol* 48:15–22
- Doull JL, Vining LC (1989) Culture conditions promoting dispersed growth and biphasic production of actinorhodin in shaken cultures of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *FEMS Microbiol Lett* 3:265–268
- Enguita FJ, Coque JJ, Liras P, Martín JF (1998) The nine genes of the *Nocardia lactamdurans* cephamycin cluster are transcribed into large mRNAs from three promoters, two of them located in a bidirectional promoter region. *J Bacteriol* 180:5489–5494
- Eustáquio AS, Gust B, Galm U, Li SM, Chater KF, Heide L (2005) Heterologous expression of novobiocin and clorobiocin biosynthetic gene clusters. *Appl Environ Microbiol* 71:2452–2459
- Flinspach K, Westrich L, Kaysser L, Siebenberg S, Gomez-Escribano JP, 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
- Foulstone M, Reading C (1982) Assay of amoxicillin and clavulanic acid, the components of Augmentin, in biological fluids with high-performance liquid chromatography. *Antimicrob Agents Chemother* 22:753–762
- Gomez-Escribano JP, Bibb MJ (2011) Engineering *Streptomyces coelicolor* for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *Microb Biotechnol* 4:207–215
- Gunsinor M, Breazeale SD, Lind AJ, Ravel J, Janc JW, Townsend CA (2004) The biosynthetic gene cluster for a monocyclic beta-lactam antibiotic, nocardicin A. *Chem Biol* 11:927–938
- Higgins CE, Hamill RL, Sands TH, Hoehn MM, Davis NE, Najarahan R, Boeck LD (1974) The occurrence of desacetoxycephalosporin C in fungi and *Streptomyces*. *J Antibiot* 27:298–300
- Huang S, Yudong Z, Zhiwei Q, Xiaoling W, Mayca O, Chen L, He J, Yu Y, Deng H (2011) Identification and heterologous expression of the biosynthetic gene cluster for holomycin produced by *Streptomyces clavuligerus*. *Process Biochem* 46:811–816
- Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Shinose M, Kikuchi H, Shiba T, Sakaki Y, Hattori M, Omura S (2003) Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol* 21:526–531
- Ishida K, Hung TV, Liou K, Lee HC, Shin CH, Sohng JK (2006) Characterization of *pbpA* and *pbp2* encoding penicillin-binding proteins located on the downstream of clavulanic acid gene cluster in *Streptomyces clavuligerus*. *Biotechnol Lett* 28:409–417
- Janc JW, Egan LA, Townsend CA (1995) Purification and characterization of clavaminase synthase from *Streptomyces antibioticus*. A multifunctional enzyme of clavam biosynthesis. *J Biol Chem* 270:5399–5404
- Khaleeli N, Li R, Townsend CA (1999) Origin of the beta-lactam carbons in clavulanic acid from an usual thiamine pyrophosphate-mediated reaction. *J Am Chem Soc* 121:9223–9224
- Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA (2000) *Practical Streptomyces Genetics*. John Innes Foundation, Norwich
- Kurt A, Álvarez-Alvarez R, Liras P, Özcengiz G (2013) Role of the *cmcH-ccaR* intergenic region and *ccaR* overexpression in cephamycin C biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Applied Microbiol Biotechnol*. doi: 10.1007/s00253-013-4721-4724
- Lauretí L, Song L, Huang S, Corre C, Leblond P, Challis GL, Aigle B (2011) Identification of a bioactive 51-membered macrolide complex by activation of a silent polyketide synthase in *Streptomyces ambofaciens*. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:6258–6263
- Li R, Khaleeli N, Townsend CA (2000) Expansion of the clavulanic acid gene cluster: identification and in vivo functional analysis of three new genes required for biosynthesis of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. *J Bacteriol* 182:4087–4095
- Liras P, Rodríguez-García A, Martín JF (1998) Evolution of the clusters of genes for beta-lactam antibiotics: a model for evolutive combinatorial assembly of new beta-lactams. *Internat Microbiol* 1:271–278
- Liras P, Santamarta I, Pérez-Redondo R (2011) Clavulanic acid and clavams biosynthesis and regulation. In: Dyson P (ed) *Streptomyces Molecular Biology and Biotechnology*. Caister Academic Press, Norfolk, UK, pp 167–178
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2DDCt Method. *Methods* 25:402–408
- López-García MT, Santamarta I, Liras P (2010) Morphological differentiation and clavulanic acid formation are affected in a *Streptomyces clavuligerus* *adpA*-deleted mutant. *Microbiology* 156:2354–2365
- Lorenzana LM, Pérez-Redondo R, Santamarta I, Martín 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. *J Bacteriol* 186:3431–3438
- Marsh EN, Chang MD, Townsend CA (1992) Two isozymes of clavaminase synthase central to clavulanic acid formation: cloning and sequencing of both genes from *Streptomyces clavuligerus*. *Biochemistry* 31:12648–12657
- Martín JF, Liras P (2010) Engineering of Regulatory Cascades and Networks Controlling Antibiotic Biosynthesis in *Streptomyces*. *Current Op in Microbiol* 13:263–273
- Martín JF, Gutiérrez S, Aparicio JF (2000) Secondary metabolites. In: Lederberg J (ed) *Encyclopedia of Microbiology*, vol 4, 2nd edn. Academic Press, San Diego, pp 213–236
- Matthew AG, Till R, Smith MCM (2003) Integration site for *Streptomyces* phage ΦBT1 and development of site-specific integrating vectors. *J Bacteriol* 185:5320–5323
- Medema MH, Trefzer A, Kovalchuk A, van den Berg M, Müller U, Heijne W, Wu L, Alam MT, Ronning CM, Nierman WC, Bovenberg RA, Breitling R, Takano E (2010) The sequence of a 1.8-mb bacterial linear plasmid reveals a rich evolutionary reservoir of secondary metabolic pathways. *Genome Biol Evol* 2:212–224
- Mellado E, Lorenzana LM, Rodríguez-Sáiz M, Díez B, Liras P, Barredo JL (2002) The clavulanic acid biosynthetic cluster of *Streptomyces clavuligerus*: genetic organization of the region upstream of the *car* gene. *Microbiology* 148:1427–1438
- Nicholson NH, Baggaley KH, Cassels R, Davison M, Elson SW, Fulston M, Tyler JW, Woroniecki ST (1994) Evidence that the intermediate biosynthetic precursor of clavulanic acid is its N-aldehyde analogue. *J Chem Soc Chem Commun* 1994:1281–1282
- Nobary GS, Jensen SE (2012) A comparison of the clavam biosynthetic gene clusters in *Streptomyces antibioticus* Tü1718 and *Streptomyces clavuligerus*. *Can J Microbiol* 58:413–425
- Ortiz de Orue Lucana D, Tröller M, Schrepf H (2003) Amino acid residues involved in reversible thiol formation and zinc ion binding in the *Streptomyces reticuli* redox regulator FurS. *Mol Genet Genomics* 268:618–627
- Paradkar AS, Aidoo KA, Jensen SE (1998) A pathway-specific transcriptional activator regulates late steps of clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Mol Microbiol* 27:831–843

- Pati A, Sikorski J, Nolan M, Lapidus A, Copeland A, Glavina del Rio T, Lucas S, Chen F, Tice H, Pitluck S, Cheng JF, Chertkov O, Brettin T, Han C, Detter JC, Kuske C, Bruce D, Goodwin L, Chain P, D'haeseleer P, Chen A, Palaniappan K, Ivanova N, Mavromatis K, Mikhailova N, Rohde M, Tindall BJ, Göker M, Bristow J, Eisen JA, Markowitz V, Hugenholtz P, Kyrpides NC, Klenk HP (2009) Complete genome sequence of *Saccharomonospora viridis* type strain (P101). *Stand Genomic Sci* 1:141–149
- Pérez-Llarena F, Martín JF, Galleni M, Coque JJ, Fuente JL, Frère JM, Liras P (1997a) The *bla* gene of the cephamycin cluster of *Streptomyces clavuligerus* encodes a class A beta-lactamase of low enzymatic activity. *J Bacteriol* 179:6035–6040
- Pérez-Llarena FJ, Liras P, Rodríguez-García A, Martín JF (1997b) A regulatory gene (*ccaR*) required for cephamycin and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*: amplification results in overproduction of both β -lactam compounds. *J Bacteriol* 179:2053–2059
- Pérez-Redondo R, Rodríguez-García A, Martín JF, Liras P (1998) The *clr* 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-Redondo R, Rodríguez-García A, Martín JF, Liras P (1999) Deletion of the *pyc* gene blocks clavulanic acid biosynthesis except in glycerol-containing medium: evidence for two different genes in formation of the C3 unit. *J Bacteriol* 181:6922–6928
- Robles-Reglero V, Santamarta I, Álvarez-Álvarez R, Martín JF, Liras P (2013) Transcriptional analysis and proteomics of the holomycin gene cluster in overproducer mutants of *Streptomyces clavuligerus*. *J Biotechnol* 163(1):69–76
- Rodríguez-García A, Ludovice M, Martín JF, Liras P (1997) Arginine boxes and the *argR* gene in *Streptomyces clavuligerus*: evidence for a clear regulation of the arginine pathway. *Mol Microbiol* 25:219–28
- Romero J, Liras P, Martín JF (1984) Dissociation of cephamycin and clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 20:318–325
- Romero J, Liras P, Martín JF (1986) Utilization of ornithine and arginine as specific precursors of clavulanic acid. *Appl Environ Microbiol* 52:892–897
- Santamarta I, López-García MT, Kurt A, Nárdiz N, Pérez-Redondo R, Álvarez-Álvarez R, Martín JF, Liras P (2011) Characterization of DNA-binding sequences for CcaR in the cephamycin–clavulanic acid supercluster of *Streptomyces clavuligerus*. *Mol Microbiol* 81:968–981
- Schmittgen TD, Zakrajsek BA (2000) Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods* 46:69–81
- Tong L, Yuanyuan D, Qiu C, Jingtao Z, Weiming Z, Kui H, Wenli L (2013) Cloning, characterization and heterologous expression of the indolocarbazole biosynthetic gene cluster from marine-derived *Streptomyces sanyensis* FMA. *Mar Drugs* 11:466–488
- Valentine BP, Bailey CR, Doherty A, Morris J, Elson SW, Baggaley KH, Nicholson NH (1993) Evidence that arginine is a later metabolic intermediate than ornithine in the biosynthesis of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. *J Chem Soc Chem Commun* 1993:1210–1211
- Wang L, Tian X, Wang J, Yang H, Fan K, Xu G, Yang K, Tan H (2009) Autoregulation of antibiotic biosynthesis by binding of the end product to an atypical response regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:8617–8622
- Ward JM, Hodgson JE (1993) The biosynthetic genes for clavulanic acid and cephamycin production occur as a 'super-cluster' in three *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Lett* 110:239–242
- Xu G, Wang J, Wang L, Tian X, Yang H, Fan K, Yang K, Tan H (2010) "Pseudo" gamma-butyrolactone receptors respond to antibiotic signals to coordinate antibiotic biosynthesis. *J Biol Chem* 285:27440–27448
- Young TS, Walsh CT (2011) Identification of the thiazolyl peptide GE37468 gene cluster from *Streptomyces* ATCC 55365 and heterologous expression in *Streptomyces lividans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(32):13053–13058
- Zhou Z, Gu J, Du YL, Li YQ, Wang Y (2011) The -omics Era- a toward a systems-level understanding of *Streptomyces*. *Current Genomics* 12:404–416

A 1.8-Mb-reduced *Streptomyces clavuligerus* genome: relevance for secondary metabolism and differentiation

R. Álvarez-Álvarez · A. Rodríguez-García ·
Y. Martínez-Burgo · V. Robles-Reglero · I. Santamarta ·
R. Pérez-Redondo · J. F. Martín · P. Liras

Received: 18 September 2013 / Revised: 31 October 2013 / Accepted: 2 November 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract A large part (21 %) of the wild-type *Streptomyces clavuligerus* genome is located in a 1.8-Mb megaplasmid that greatly influences secondary metabolites biosynthesis even if the secondary metabolites are chromosomally encoded. The megaplasmid copy number may change depending on the nutritional and environmental conditions. The *S. clavuligerus oppA2::aph* mutant described by Lorenzana et al. (2004) does not form aerial mycelium, spores, and clavulanic acid, but overproduces holomycin. Transcriptomic studies, polymerase chain reactions (PCR), qPCR, and RT-qPCR analysis showed that *S. clavuligerus oppA2::aph* has a drastically reduced number of copies (about 25,000-fold lower than the parental strain) of plasmids pSCL1 (10.5 kb), pSCL2 (149.4 kb), and the megaplasmid pSCL4 (1.8 Mb). To clarify the role of the linear plasmids and the function of OppA2 in *S. clavuligerus oppA2::aph* we constructed *oppA2* mutants which contained: (1) a normal copy number of the linear plasmids, (2) completely lack of the linear plasmids, and (3) a *parA-parB*_{pSCL4} mutant that resulted in lack of pSCL4. In addition, a strain with a functional *oppA2* gene was constructed lacking the megaplasmid pSCL4. The results confirmed that the *oppA2* gene is essential for clavulanic acid production, independently of the presence or absence of linear plasmids, but *oppA2* has little relevance on differentiation. We

demonstrated that the lack of sporulation of *S. clavuligerus oppA2::aph* is due to the absence of linear plasmids (particularly pSCL4) and the holomycin overproduction is largely due to the lack of pSCL4 and is stimulated by the *oppA2* mutation.

Keywords *Streptomyces clavuligerus* · Clavulanic acid · Holomycin · Linear plasmids · pSCL4

Introduction

Streptomyces clavuligerus ATCC 27064 is the producer organism of two important compounds used in clinic, the β -lactam antibiotic cephamycin C and the β -lactamase inhibitor clavulanic acid (CA) (Baggaley et al. 1997; Liras et al. 2011). Genes for the biosynthesis of both compounds are located side by side in the 6.76 Mb *S. clavuligerus* chromosome (Ward and Hodgson 1993) and share a common SARP-type regulatory gene (*ccaR*) (Pérez-Llarena et al. 1997). Also located in the chromosome is the gene cluster for holomycin (Li and Walsh 2010; Robles-Reglero et al. 2013), a dithiolopyrrolone compound, described as RNA polymerase inhibitor (Oliva et al. 2001), with antitumoral properties (Webster et al. 2000; Li et al. 2007). In addition, *S. clavuligerus* has the potential to produce up to 48 putative secondary metabolites (Medema et al. 2010) including polyketides (PK), non-ribosomal peptides (NRP), mixed PK-NRP compounds, and terpenes.

The *S. clavuligerus* genome appears to be dynamic containing several small and one very large linear plasmid that might recombine with the chromosome. Three small linear plasmids, pSCL1 to pSCL3 of 10.5, 149.4, and 444.2 kb, have been described in *S. clavuligerus* ATCC 27064 (Wu and Roy 1993; Netolitzky et al. 1995). However, only the replicons for pSCL1 and pSCL2 have been identified in *S. clavuligerus*

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00253-013-5382-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

R. Álvarez-Álvarez · A. Rodríguez-García · Y. Martínez-Burgo ·
V. Robles-Reglero · J. F. Martín · P. Liras (✉)
Área de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas y
Ambientales, Universidad de León, 24071 León, Spain
e-mail: paloma.liras@unileon.es

R. Álvarez-Álvarez · A. Rodríguez-García · V. Robles-Reglero ·
I. Santamarta · R. Pérez-Redondo · P. Liras
Instituto de Biotecnología de León, INBIOTEC, Parque Científico de
León, Avda. Real nº1, 24006 León, Spain

genome sequence (Medema et al. 2010; Song et al. 2010) while pSCL3 has been only detected by pulse field electrophoresis and might have been integrated in the chromosome. Sequencing of *S. clavuligerus* genome revealed a new large linear plasmid of 1.8 Mb, named pSCL4, packed with 25 gene clusters for secondary metabolites. The pSCL4 megaplasmid does not seem to have genes essential for primary metabolism, it contains a replication origin different from that of the chromosome and is supposed to be dispensable (Medema et al. 2010). However, no studies are available on the effect of complete removal of pSCL4 on growth, morphology, or the production of secondary metabolites encoded by chromosomally located gene clusters.

In previous studies on clavulanic acid biosynthesis we constructed by gene disruption the mutant *S. clavuligerus oppA2::aph* (Lorenzana et al. 2004). The *oppA2* gene is located in the clavulanic acid gene cluster and encodes an oligopeptide permease (Mellado et al. 2002). The OppA2 protein of *S. clavuligerus* has been crystallized and found to bind in vitro arginine and, probably, arginine containing intermediates of the clavulanic acid pathway (Mackenzie et al. 2009). Disruption of *oppA2*, results in lack of production of clavulanic acid but, interestingly, the original mutant overproduces large amounts of holomycin, a compound undetectable in the wild-type strain cultures (de la Fuente et al. 2002); this report was one of the first examples of the awakening of expression of a silent gene cluster in *Streptomyces*. The original *oppA2* mutant shows a bald phenotype (Lorenzana et al. 2004). In the present study we compare the *S. clavuligerus oppA2::aph* mutant with the wild-type strain using transcriptomic and quantitative polymerase chain reactions (qPCR) techniques and we prove that only trace amounts of the plasmids pSCL1, pSCL2, and pSCL4 are present in this mutant. The wild-type *S. clavuligerus* ATCC 27064 and the

original mutant *S. clavuligerus oppA2::aph* have been used to get strains completely devoid of pSCL4 or devoid of the three plasmids. Particularly, *S. clavuligerus* mutants deleted in the pSCL4 *parA-parB* genes (SCLAV_p0885 and SCLAV_p0884) led to the complete loss of this plasmid. The behavior of these linear plasmid-free strains indicates that the linear plasmids have an important role on secondary metabolites biosynthesis and differentiation.

Materials and methods

Culture conditions and strains The origin and characteristics of the *Streptomyces* strains used in this work is shown in Table 1. To start *Streptomyces* seed liquid cultures the strains were grown in 100 ml of tryptic soy broth (TSB) medium at 28 °C and 220 rpm for 24 h. These seed cultures were used to inoculate (5 % v/v) 500 ml baffled flasks containing 100 ml of defined SA medium (starch-asparagine) (Aidoo et al. 1994) and the culture was grown for 84 h under the same conditions. ME medium (Lorenzana et al. 2004) was used to test sporulation and aerial mycelium formation. The strains used in this work are listed in Table 1.

Antibiotics assays Clavulanic acid and cephamycin C were quantified as indicated by Pérez-Redondo et al. (1998). Holomycin was determined by bioassay against *Micrococcus luteus* ATCC 9341 and by HPLC as described by de la Fuente et al. (2002).

***S. clavuligerus oppA2::aph* protoplasts formation and regeneration** *S. clavuligerus oppA2::aph* was grown for 36 h in 100 ml TSB medium at 28 °C and 220 rpm to an optical density (OD_{600nm}) of 7 to 10. Ten milliliters of this

Table 1 Characteristic of the *Streptomyces* strains used in this work

Strain	Origin	Characteristics of the strains
<i>S. clavuligerus</i> ATCC 27064	ATCC	Wild-type strain
<i>S. clavuligerus oppA2::aph</i> (renamed <i>S. clavuligerus oppA2::aph</i> pSCL ^{low})	Lorenzana et al. 2004	Clavulanic acid non-producer, holomycin overproducer strain. Kanamycin resistant. Non-sporulating strain. It carries low copy number of pSCL1, pSCL2 and pSCL4
<i>S. clavuligerus oppA2::aph</i> pSCL ⁻	This work	Clavulanic acid non-producer, holomycin overproducer strain. Kanamycin resistant. Non-sporulating strain. It lacks pSCL1, pSCL2, and pSCL4
<i>S. clavuligerus ΔoppA2::acc</i> pSCL ⁺	This work	Clavulanic acid non-producer, holomycin low producer strain. Apramycin resistant. It carries normal copy number of pSCL1, pSCL2, and pSCL4
<i>S. clavuligerus</i> pSCL4 ⁻	This work	Holomycin producer strain. Non sporulating strain
<i>S. clavuligerus ΔoppA2::acc</i> pSCL4 ⁻	This work	Clavulanic acid non-producer, holomycin overproducer strain. Apramycin resistant. Non-sporulating. It carries normal copy number of pSCL1 and pSCL2. It lacks pSCL4
<i>S. clavuligerus ΔccaR::tsr</i>	Wang et al. 2004	Clavulanic acid, cephamycin C non-producer. Thiostrepton resistant

culture were used to inoculate 50 ml of YEMEG medium (García-Domínguez et al. 1989) supplemented with glycine (8 mg/ml). After 48 h the cells were washed with sucrose (10.3 %), resuspended in 2 ml of “P buffer” containing lysozyme (1 mg) and kept at 30 °C for 30 min. The protoplasts obtained were washed three times with “P buffer”, adequately diluted in “P buffer”, and plated on R2YEG plates (Kieser et al. 2000) in which the glucose was substituted by glycerol, since *S. clavuligerus* is unable to utilize glucose (García-Domínguez et al. 1989).

Construction of plasmid-free and *oppA2* mutants

S. clavuligerus oppA2::aph pSCL⁻ This plasmid-free strain (lacking pSCL1, pSCL2, and pSCL4) derives from the original *S. clavuligerus oppA2::aph pSCL^{low}* and was obtained by protoplasts regeneration. The colonies obtained after protoplasts regeneration were grown in TSA and ME plates. DNA from 24 clones was separately purified and tested for PCR amplification of SCLAV_p1328, SCLAV_p0126, and SCLAV_p1452 genes, located at each end of pSCL4. None of the 24 clones analyzed gave amplification bands after 35 PCR cycles whereas using DNA from the wild-type strain the expected 413, 430, and 421 bp DNA bands corresponding to each gene amplification were observed. The strain was deposited in the University of León culture collection under the number ULCC-701.

S. clavuligerus ΔoppA2::acc pSCL⁺ A SuperCos1 *S. clavuligerus* ATCC 27064 cosmid library was used to locate cosmids containing the clavulanic acid gene cluster using the PCR amplified *orf14-oppA2-orf16* genes as probe. Additional mapping with restriction endonucleases and hybridization with other CA gene internal probes demonstrated that cosmid D11-7 contained the whole CA cluster. Gene deletion of *oppA2* was performed on the wild-type *S. clavuligerus* ATCC 27064 using the Redirect Method (Gust et al. 2002) and the oligonucleotides shown in Table S1. Four exconjugants designed *S. clavuligerus ΔoppA2::acc pSCL⁺* were obtained. Each of them was tested for the adequate antibiotic resistance and confirmed by PCR and Southern hybridization; in addition, all the exconjugants were grown separately in liquid cultures and antibiotic production was studied to prove that they were identical.

S. clavuligerus pSCL⁻, devoid of the megaplasmid The proteins encoded by the *parA-parB* genes of pSCL4 are only 30–40 % identical to those encoded by the *parA-parB* genes of the chromosome suggesting that they are not able to complement each other. Using cosmid D10-10, in which the pSCL4 *parA-parB* genes are centrally located, oligonucleotides parAB-D and parAB-R and the Redirect method we

obtained three *S. clavuligerus* exconjugants apramycin resistant, kanamycin sensitive. The clones (previously tested by PCR to confirm the substitution of the *parA-parB* genes in pSCL4 by the apramycin cassette), were grown in ME medium to allow sporulation. Spores were isolated, and individual clones were tested for growth in the presence and absence of apramycin. Most of the colonies apramycin sensitive showed a smaller size and were candidates as pSCL4-free clones. The lack of pSCL4 was tested as indicated in “Results”. The strain was deposited in the University of León culture collection under the number ULCC-702.

S. clavuligerus ΔoppA2::acc pSCL⁻ This double deletion strain was obtained as indicated before for *S. clavuligerus ΔoppA2::acc pSCL⁺* but using *S. clavuligerus pSCL⁻*, devoid of pSCL4, instead of the wild-type strain as starter strain.

RNA isolation and purification Samples from the *Streptomyces* cultures were stabilized with two volumes of RNA Protect Bacteria Reagent (Qiagen) for 5 min, then 1 % β-mercaptoethanol was added. After 10 min the samples, in a cryogenic bath, were sonicated with six pulses of 30 s in a XL2020 Sonifier, set at 3.5 volts. The preparation was extracted with one volume of phenol/chloroform-isoamyl alcohol and the aqueous-phase was applied to RNeasy Mini Kit Columns (Qiagen) according to the manufacturer’s instructions. RNA preparations were incubated with DNaseI (Qiagen) to eliminate DNA contamination. Sample quantification was done with a NanoDrop ND-1000 UV–vis spectrophotometer and the integrity of the RNA was determined in a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). Only RNAs with an RNA integrity number above 7.0 were used.

Polymerase chain reactions and RT-PCR analysis Oligonucleotide primers used in this work are shown in Table S1. All PCR reactions were performed in a T-gradient (Biometra) thermocycler using total DNA as template. The PCR reaction, performed as described by Kieser et al. (2000), contained in 30 μl volume: 30 nM DNA template, 0.2 mM dNTP each, 1 mM MgCl₂, 4 % dimethyl sulfoxide (DMSO), and 0.1 unit Go Taq polymerase (Promega). The amplification program was as follows: after a step of 95 °C for 30 s, the annealing temperature was reduced in a one cycle touch-down of 1 °C from 68 to 60 °C; an annealing temperature of 72 °C was used next (between cycles 20 and 35) with an extension step of 10 min at 72 °C. Quantification and purity analysis of all PCR products was determined using a NanoDrop ND-1000 190 Spectrophotometer (Thermo Scientific) and the fidelity of the amplification was confirmed by sequencing. Gene expression was studied by RT-PCR (Santamarta et al. 2007; López-García et al. 2010) using gene-specific primers (Table S1). Negative controls to confirm the absence of contaminating DNA were carried out with each set of primers.

cDNA was prepared using 200 ng RNA as template, oligonucleotides at 4 µg each, Superscript™ One-Step RT-PCR mixed Platinum® Taq (Invitrogen) 0.3 µl and 0.05 % DMSO 1 µl. The retrotranscription reaction was performed at 55 °C for 30 min. The samples were denaturalized at 94 °C for 2 min and then were amplified using 30 PCR cycles as follows: denaturation at 94 °C for 30 s, hybridization for 30 s at the optimal temperature according to the primers, extension 15–30 s at 72 °C, and a final extension of 10 min at 72 °C. Negative controls contained Platinum® Taq (0.18 µl) instead of the Superscript™ One-Step RT-PCR/Platinum® Taq mixture.

Quantitative RT-PCR and qPCR Gene expression analysis by quantitative RT-PCR (qRT-PCR) was performed as previously described (López-García et al. 2010) using RNA obtained as described above. Detection of plasmids pSCL1, pSCL2, and pSCL4 in the strains was performed by qPCR (Lee et al. 2006) using 2 ng of gDNA template.

Labeling and microarray hybridizations *S. clavuligerus* microarrays were obtained from Agilent Technologies, in the format of Agilent 8×15K. They include quadruple probes for about 800 genes and intergenic regions of some clusters involved in secondary metabolism. In addition, they included duplicated probes for 7,728 chromosomal genes (out of 7,825) of *Streptomyces coelicolor* genome. Culture conditions were optimized using SA medium and RNA was extracted at the exponential and early stationary growth phase of the cultures of *S. clavuligerus* ATCC 27064, *S. clavuligerus oppA2::aph*, and *S. clavuligerus ΔccaR::tsr*. Four biological replicates were made for each condition. Labeling reactions were performed according to the recommendations described by BioPrime® Array CGH Genomic Labeling Systems (Life Technologies). Total RNA was labeled with Cy3-dCTP (Amersham) using random primers and SuperScript™ II reverse transcriptase (Invitrogen). gDNA was labeled with Cy5-dCTP (Amersham) from random primers extended with the Klenow fragment of DNA polymerase (Roche). The final products were purified with MinElute columns (Qiagen) and labeling efficiencies were quantified spectrophotometrically. Cy3-cDNA (300 ng) and Cy5-labeled gDNA (10 pmol) were mixed, vacuum dried, resuspended in 32 µl of hybridization solution (Agilent), and applied on the microarray surface. Hybridizations were carried out at 55 °C and extended to 60 h to improve the quality of the results (Sartor et al. 2004). Washing, scanning with an Agilent DNA Microarray Scanner G2565BA, and image quantification were carried out as reported previously (Rodríguez-García et al. 2007).

Identification of differentially transcribed genes and transcription profile classification Microarray data were normalized with the Bioconductor package limma (Smyth and Speed 2003; Smyth 2004). Weighted median was applied within

arrays. Weights were assigned as follows: 1, probes corresponding to *S. coelicolor* genes showing a raw Cy3 intensity value higher than 2,000; 0.25, probes corresponding to *S. clavuligerus* genes; 0, the rest of probes. The normalized log₂ of Cy3/Cy5 intensities is referred as the Mg value, which is proportional to the abundance of transcripts for a particular gene (Mehra et al. 2006). The information from within-array spot duplicates (Smyth et al. 2005) and empirical array weights (Ritchie et al. 2006) were taken into account in the linear models (Smyth 2004).

The transcription results of the six experimental conditions were compared using four contrasts. For each contrast *p* values and *Mc* values (log measure of the differential transcription between a specific mutant and the wild strain) were calculated. False-discovery rate (FDR) correction for multiple testing was applied. For each contrast or comparison between two experimental conditions, a result was considered as statistically significant if the FDR-corrected *p* value was <0.05. *Mc* positive values indicates a downregulation, and *Mc* negative values indicates up regulation. The microarrays data have been deposited in NCBI-GEO Database with accession number GSE51435.

Results

Transcriptomic studies in *S. clavuligerus oppA2::aph* revealed that the pSCL4- and pSCL2-located genes are poorly expressed in this strain

A transcriptomic study was made to compare the original mutant *S. clavuligerus oppA2::aph* with the wild type strain, *S. clavuligerus* ATCC 27064. The microarrays used contained 800 genes for secondary metabolites biosynthesis, nitrogen and carbon utilization, arginine biosynthesis and all those genes known previously to the *S. clavuligerus* genome sequencing project.

Two culture times were chosen for the transcriptomic studies, i.e. exponential phase (t1) and stationary phase (t2) of growth in SA medium. No significant differences in the transcription of most of the genes for clavulanic acid biosynthesis were found between the wild type strain and the original *oppA2*-disrupted mutant (not shown). Forty seven of the 800 *S. clavuligerus* genes studied in the microarray (Table 2) are located in plasmid pSCL2, and forty genes belong to the megaplasmid pSCL4 (Table 3) but it lacks genes of pSCL1. Strikingly, all the genes located in either of these linear plasmids showed significant changes and 99 % of them were underexpressed. The average *Mc* values for genes located in pSCL2 was −2.35 and −2.34 at the exponential and stationary phase of growth, and those located in pSCL4 showed average *Mc* values of −2.57 and −3.17 at these two times. These results indicate a decrease in expression of the plasmid-

Table 2 Expression of genes located in pSCL2 in mutants *S. clavuligerus oppA2::aph* pSCL^{low} and *S. clavuligerus ΔccaR::tsr* in relation to the control strain

Gene	Product	Exponential phase				Stationary phase			
		<i>S. clavuligerus oppA2::aph</i> pSCL ^{low}		<i>S. clavuligerus ΔccaR::tsr</i>		<i>S. clavuligerus oppA2::aph</i> pSCL ^{low}		<i>S. clavuligerus ΔccaR::tsr</i>	
		Mc	FDR	Mc	FDR	Mc	FDR	Mc	FDR
SclaA2_010100027605	Helicase	-1.40	1.68E-05	1.02	3.06E-03	-1.70	1.03E-07	-0.11	7.59E-01
SclaA2_010100027610	Hypothetical protein	-1.33	7.21E-08	0.91	3.35E-04	-1.71	8.21E-12	0.14	6.04E-01
SclaA2_010100027615	Hypothetical protein	-1.87	1.51E-06	0.53	2.99E-01	-2.29	3.43E-09	0.32	4.27E-01
SclaA2_010100027620	Hypothetical protein	-2.23	9.63E-03	0.97	3.92E-01	-1.85	2.28E-02	1.24	1.29E-01
SclaA2_010100027625	Hypothetical protein	-2.55	9.15E-28	0.91	4.42E-06	-2.00	1.59E-20	1.27	1.14E-10
SclaA2_010100027675	Secreted protein	-3.08	6.21E-31	-0.11	7.72E-01	-2.75	2.76E-27	-0.18	4.09E-01
SclaA2_010100027680	Hypothetical protein	-1.07	1.71E-03	0.28	5.91E-01	-1.61	9.01E-07	-0.82	1.07E-02
SclaA2_010100027690	Hypothetical protein	-3.88	6.37E-33	0.57	4.89E-02	-2.91	1.80E-23	1.50	3.23E-09
SclaA2_010100027700	Hypothetical protein	-2.13	1.84E-04	0.39	6.71E-01	-2.03	2.07E-04	-0.54	3.52E-01
SclaA2_010100027705	Ribonuclease H	-0.28	8.55E-01	0.29	8.59E-01	-1.28	1.57E-01	-1.09	2.32E-01
SclaA2_010100027710	Hypothetical protein	-1.99	3.31E-06	0.24	7.40E-01	-1.65	6.25E-05	0.57	1.77E-01
SclaA2_010100027715	Partitioning protein	-3.21	8.68E-19	0.66	8.42E-02	-2.89	2.66E-16	1.19	1.71E-04
SclaA2_010100027720	parB-like partition protein	-3.88	3.87E-15	0.61	3.15E-01	-3.61	7.97E-14	0.96	3.12E-02
SclaA2_010100027905	Hypothetical protein	-0.75	1.27E-01	0.69	2.07E-01	-1.61	1.30E-04	-0.71	9.72E-02
SclaA2_010100027910	Hypothetical protein	-2.93	1.55E-06	1.30	6.38E-02	-2.81	2.21E-06	1.27	3.05E-02
SclaA2_010100027915	ATP/GTP binding protein	-3.01	1.66E-08	1.02	1.01E-01	-2.79	8.41E-08	1.19	1.89E-02
SclaA2_010100027920	Transposase	-1.40	8.60E-07	1.00	7.48E-04	-1.75	8.16E-10	0.11	7.16E-01
SclaA2_010100027925	Acetyltransferase	-1.31	3.99E-02	1.16	9.58E-02	-1.73	2.65E-03	0.06	9.29E-01
SclaA2_010100027930	Hypothetical protein	-2.80	8.73E-18	2.15	5.01E-12	-2.98	1.56E-19	1.27	1.21E-05
SclaA2_010100027935	Hypothetical protein	-2.51	1.12E-11	1.07	4.80E-03	-2.77	9.81E-14	0.86	1.27E-02
SclaA2_010100027950	Hypothetical protein	-2.27	1.58E-06	0.98	7.36E-02	-2.43	1.67E-07	0.68	1.42E-01
SclaA2_010100027955	GntR-family regulatory protein	-2.06	2.80E-08	0.85	3.89E-02	-2.25	1.12E-09	0.69	5.42E-02
SclaA2_010100027965	Hypothetical protein	-1.96	1.38E-07	0.69	1.10E-01	-2.12	7.09E-09	0.03	9.40E-01
SclaA2_010100027970	Hypothetical protein	-2.32	8.94E-06	0.50	5.07E-01	-2.48	1.13E-06	0.54	3.03E-01
SclaA2_010100027975	Hypothetical protein	-3.10	1.08E-33	0.50	2.02E-02	-3.25	1.43E-35	0.96	7.27E-07
SclaA2_010100027980	Serine/threonine-protein Kinase	-3.58	7.02E-47	0.20	3.55E-01	-3.15	1.19E-41	1.52	1.21E-17
SclaA2_010100027980	Hypothetical protein	-3.49	2.80E-11	0.38	6.53E-01	-2.90	9.86E-09	1.14	2.05E-02
SclaA2_010100027985	Hypothetical protein	-2.34	2.14E-10	0.21	7.40E-01	-2.08	7.09E-09	-0.18	6.39E-01
SclaA2_010100027990	Hypothetical protein	-1.90	7.48E-14	0.70	6.76E-03	-2.04	1.57E-15	0.11	6.74E-01
SclaA2_010100027995	Hypothetical protein	-1.70	4.74E-04	0.73	2.35E-01	-1.76	1.51E-04	0.11	8.23E-01
SclaA2_010100028005	Regulatory protein	-1.35	1.71E-04	0.60	1.65E-01	-1.48	2.01E-05	-0.22	5.71E-01
SclaA2_010100028010	Hypothetical protein	-1.23	2.79E-01	0.57	7.19E-01	-1.40	1.28E-01	-0.37	7.07E-01
SclaA2_010100028015	Phosphatase	-1.85	5.27E-09	0.88	8.96E-03	-1.98	3.30E-10	-0.16	6.20E-01
SclaA2_010100028020	Hypothetical protein	-2.65	2.77E-16	1.64	8.91E-08	-2.50	3.59E-15	1.18	5.15E-05
SclaA2_010100028030	Hypothetical protein	-1.46	2.82E-03	0.47	4.98E-01	-1.79	1.17E-04	-0.48	3.27E-01
SclaA2_010100028035	RNA polymerase sigma factor	-1.91	1.44E-06	0.58	2.51E-01	-2.14	3.96E-08	-0.23	5.84E-01
SclaA2_010100028185	Hypothetical protein	-3.40	3.47E-10	0.94	1.38E-01	-3.51	6.45E-11	0.75	1.53E-01
SclaA2_010100028210	Hypothetical protein	-2.35	1.82E-10	0.33	5.33E-01	-2.66	7.77E-13	0.42	2.42E-01
SclaA2_010100028325	Hypothetical protein	-2.42	3.90E-14	1.85	2.91E-09	-2.19	2.04E-12	0.42	1.64E-01
SclaA2_010100028330	Hypothetical protein	-1.56	2.06E-03	2.71	8.91E-08	-1.74	2.78E-04	0.98	4.07E-02
SclaA2_010100028335	Transferase	-1.99	1.12E-05	2.97	1.84E-10	-2.03	3.91E-06	1.82	3.19E-05
SclaA2_010100028340	Putative regulatory protein	-2.89	2.17E-12	1.15	6.58E-03	-3.15	2.55E-14	0.27	5.12E-01
SclaA2_010100028340	Telomere-associated protein	-2.75	3.33E-17	0.79	1.61E-02	-3.33	2.26E-22	0.02	9.56E-01
SclaA2_010100028345	Terminal protein	-1.84	2.33E-02	0.57	6.53E-01	-2.42	1.11E-03	-0.14	8.67E-01

Table 2 (continued)

Gene	Product	Exponential phase				Stationary phase			
		<i>S. clavuligerus</i> <i>oppA2::aph</i> pSCL ^{low}		<i>S. clavuligerus</i> Δ <i>ccaR::tsr</i>		<i>S. clavuligerus</i> <i>oppA2::aph</i> pSCL ^{low}		<i>S. clavuligerus</i> Δ <i>ccaR::tsr</i>	
		Mc	FDR	Mc	FDR	Mc	FDR	Mc	FDR
SclaA2_010100028350	Hypothetical protein	-1.41	2.19E-08	0.73	6.58E-03	-2.08	2.98E-15	-0.29	2.42E-01
SclaA2_010100028355	Hypothetical protein	-2.44	4.82E-02	0.72	7.11E-01	-2.13	5.97E-02	0.78	5.19E-01
SclaA2_010100028360	Hypothetical protein	-1.23	1.04E-04	0.75	3.28E-02	-1.60	2.43E-07	0.10	7.66E-01

encoded genes in *S. clavuligerus oppA2::aph* ranging from 5.06-fold (Mc -2.34) to 9-fold (Mc -3.17).

To validate the transcriptomic results 11 genes strategically separated in the megaplasmid pSCL4 were tested by RT-PCR (Fig. 1a) using RNA extracted at the exponential phase of growth. The genes chosen have diverse functions including regulators, ferredoxin-related proteins, sigma factors, a GlnT-like protein or a SAM-dependent methyltransferase (Fig. 1b). As shown in Fig. 1a all these genes, with the exception of SCLAV_p1328 showed a good amplification in the wild type strain. In contrast none of the RNAs obtained from *S. clavuligerus oppA2::aph* at both culture times gave amplification. These results confirmed the previous transcriptomic analysis and demonstrated that in the *oppA2* mutant the megaplasmid pSCL4-encoded genes are expressed at very low levels or not expressed at all.

These lower values of expression of the plasmid genes in the original *oppA2* mutant may be explained by an unknown general mechanism of regulation of all the genes in the plasmids or, alternatively, might be due to lower plasmids copy number and therefore, reduced levels of the mRNA's encoded in the *oppA2::aph* disrupted strain.

Plasmids pSCL1, pSCL2 and pSCL4 are present in very low copy number in *S. clavuligerus oppA2::aph*

The presence of the plasmids pSCL4 and pSCL2 in the *oppA2* mutant was also tested by PCR (Figs. 1c and 2a) with the oligonucleotides used for the qRT-PCR experiment. No amplification of the 11 genes located in pSCL4 was observed after 20 cycles of PCR amplification in *S. clavuligerus oppA2::aph*, while clear bands were detected in the wild type strain (Fig. 2a) and also in the control strain *S. clavuligerus* Δ *ccaR::tsr* (not shown). However, when the number of PCR cycles was increased to 35 cycles, clear amplification bands were found also in the *oppA2*-disrupted mutant (Fig. 2a). Three of the bands were sequenced and found to correspond to the expected genes. This amplification after a large number of cycles suggests that the multicellular hyphae of *S. clavuligerus oppA2::aph* contained a very low copy number

of the megaplasmid pSCL4, but is not completely devoid of it. To confirm this hypothesis, qPCR analysis of genes located in these plasmids was made as described by Lee et al. (2006). qPCR quantification efficiency curves were obtained for genes of pSCL2 (*parA*_{pSCL2}, SclaA2_010100027930, SclaA2_010100028210, SclaA2_010100027690), genes of pSCL4 involved in plasmid stability (*parB*_{pSCL4}, *traA*) and in regulation of antibiotic production (*brp*; Fig. 2b and c) and for two genes located in pSCL1 (SclaA2_010100027590 and SclaA2_010100027570). No genes have been ascribed so far to plasmid pSCL3 which has only been detected by pulse field electrophoresis (Netolitzky et al. 1995) and whose identity is unclear. As control for the qPCR the chromosomal genes *adpA* and *hrdB* (not shown) were used. Amplification of *parA*_{pSCL2}, located in pSCL2, was 25,000-fold lower in *S. clavuligerus oppA2::aph* than in the wild-type strain and other genes tested were in the order of 10,000-fold lower. Similarly, as shown by qPCR, *brp*, *traA*, and *parB*_{pSCL4}, located in the megaplasmid pSCL4, were present only in trace amounts (10⁴ lower concentration than in the parental strain) as occurs with the genes located in pSCL1. In contrast, in the control strain *S. clavuligerus* Δ *ccaR::tsr* (lacking the specific SARP regulator CcaR), all the genes tested were present in a number of copies similar to those of the wild-type strain (Fig. 2c). Consequently, the strain *S. clavuligerus oppA2::aph* was renamed *S. clavuligerus oppA2::aph* pSCL^{low} because it contains a very low number of copies of all plasmids.

Characteristics of *S. clavuligerus*-derived strains constructed to discriminate the effects due to *oppA2* and to the lack of plasmids

In order to discriminate between the effects produced by the *oppA2* mutation and the lack of plasmids in *S. clavuligerus* we constructed the strains indicated in Table 1. The three strains indicated below knocked-out in *oppA2* were unable to produce clavulanic acid, although they are different in other characteristics as follows:

Table 3 Expression of genes located in pSCL4 in *S. clavuligerus* *oppA2::aph* pSCL^{low} and *S. clavuligerus* Δ *ccaR* in relation to the wild-type strain

Gene	Product	Exponential phase				Stationary phase			
		<i>S.clavuligerus</i> <i>oppA2::aph</i> pSCL ^{low}		<i>S.clavuligerus</i> Δ <i>ccaR::tsr</i>		<i>S.clavuligerus</i> <i>oppA2::aph</i> pSCL ^{low}		<i>S.clavuligerus</i> Δ <i>ccaR::tsr</i>	
		Mc	FDR	Mc	FDR	Mc	FDR	Mc	FDR
SCLAV_p0032	MMPL domain precursor	0.08	9.88E-01	0.02	9.90E-01	-0.45	8.02E-01	-0.21	9.11E-01
SCLAV_p0126	Hypothetical protein	-3.55	6.98E-26	0.28	4.96E-01	-3.67	5.12E-27	-0.15	6.20E-01
SCLAV_p0353	Acetyltransferase	-0.81	8.42E-05	-0.26	3.33E-01	-0.83	2.29E-02	0.05	9.07E-01
SCLAV_p0528	Putative lysR-family transcriptional regulator	-1.68	9.63E-03	-0.15	9.07E-01	-2.26	1.97E-04	-1.22	4.45E-02
SCLAV_p0713	Ferredoxin 2[4Fe-4S]-related protein	-1.41	2.96E-04	0.86	5.16E-02	-2.14	2.40E-08	0.46	2.36E-01
SCLAV_p0715	Putative membrane protein	-3.71	9.09E-16	0.59	2.90E-01	-3.09	2.76E-12	0.31	4.90E-01
SCLAV_p0763	Amidohydrolase:Amidohydrolase-like precursor	-6.52	4.90E-39	-0.84	3.63E-02	-5.56	2.48E-33	-0.10	7.94E-01
SCLAV_p0786	Hypothetical protein	-3.23	7.30E-14	-0.70	1.61E-01	-5.02	2.10E-25	-1.91	2.04E-06
SCLAV_p0787	Hypothetical protein	-2.21	5.20E-03	-1.57	8.02E-02	-4.14	5.75E-08	-3.02	5.27E-05
SCLAV_p0808	Putative transcriptional regulatory protein	-1.49	5.28E-03	-0.43	5.90E-01	-1.80	3.34E-04	-0.70	1.77E-01
SCLAV_p0826	Putative AraC-family transcriptional regulator	-4.16	1.40E-43	0.88	2.87E-05	-4.59	1.30E-47	-0.05	8.17E-01
SCLAV_p0828	Oxygenase-reductase PgaM	-3.79	9.56E-23	-0.42	3.42E-01	-4.04	8.13E-25	-1.24	1.36E-04
SCLAV_p0853	AfsR-like protein	-1.05	9.57E-04	0.42	3.15E-01	-1.74	2.43E-08	-1.65	1.13E-07
SCLAV_p0930	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase	-4.36	9.11E-09	0.02	9.93E-01	-4.29	8.56E-09	-0.75	3.19E-01
SCLAV_p0935	Putative enoyl-CoA hydratase/isomerase	-1.88	1.51E-02	-0.15	9.19E-01	-5.37	2.09E-12	-3.08	2.02E-05
SCLAV_p0939	Putative methylmalonic acid semialdehyde DH	-1.52	2.32E-02	-0.02	9.93E-01	-5.42	9.26E-16	-3.32	1.19E-07
SCLAV_p0969	Putative 6-phosphogluconolactonase	-2.35	3.79E-19	-1.35	2.55E-08	-2.38	1.31E-19	-1.13	1.17E-06
SCLAV_p0975	Ribulose-phosphate 3-epimerase	-1.77	2.08E-10	-1.25	6.44E-06	-2.01	7.82E-13	-1.36	4.01E-07
SCLAV_p1007	CddY- <i>Rhodococcus ruber</i>	-7.43	2.42E-71	-1.16	1.46E-08	-7.70	4.92E-73	-0.54	4.59E-03
SCLAV_p1088	Alpha-L-fucosidase precursor	-2.46	6.35E-11	-0.10	8.82E-01	-2.79	2.18E-13	-1.74	1.33E-06
SCLAV_p1090	Putative RNA polymerase sigma factor	-1.09	9.20E-03	0.22	8.36E-01	-1.28	2.54E-02	-1.16	4.15E-02
SCLAV_p1122	Transcriptional activator	-0.60	4.44E-01	1.11	1.08E-01	-1.58	5.53E-03	0.36	5.68E-01
SCLAV_p1123	Putative methyltransferase	-2.79	8.86E-11	3.26	1.36E-13	-2.55	1.30E-09	3.44	7.86E-15
SCLAV_p1142	SclavP3 Predicted orf	-1.11	5.36E-07	-1.01	8.10E-06	-1.88	1.15E-15	-1.77	1.97E-14
SCLAV_p1152	ATP-binding region. ATPase-like:Histidine kinase	-1.98	2.27E-05	-0.52	4.12E-01	-2.54	3.85E-08	-1.19	8.19E-03
SCLAV_p1153	Transcriptional regulatory protein cutR	-2.16	5.10E-03	-0.52	6.71E-01	-3.04	2.91E-05	-1.33	6.92E-02
SCLAV_p1158	Hypothetical protein	-2.00	4.48E-03	-0.31	8.03E-01	-3.09	3.76E-06	-1.26	5.70E-02
SCLAV_p1203	Putative response regulator	-2.47	1.56E-09	-0.76	1.08E-01	-3.19	3.35E-14	-1.83	3.24E-06
SCLAV_p1217	Amino acid permease-associated region	-2.90	4.97E-11	-0.94	5.39E-02	-3.63	1.52E-15	-1.34	1.17E-03
SCLAV_p1235	Transcriptional regulator protein	-1.74	7.85E-05	-0.89	8.32E-02	-2.44	2.13E-08	0	1.00E-05
SCLAV_p1250	Regulatory protein	-1.15	5.35E-02	-0.53	5.04E-01	-1.88	4.13E-04	-2.17	4.95E-05
SCLAV_p1276	ABC transporter ATP-binding protein	-2.85	2.34E-09	-0.77	1.86E-01	-2.35	3.39E-07	-0.89	5.13E-02
SCLAV_p1292	Putative glutamate dehydrogenase	-1.27	3.70E-07	-0.25	4.81E-01	-1.37	2.41E-08	-1.40	1.60E-08
SCLAV_p1319	ThiJ/pfpI family protein	-6.25	8.76E-30	-1.72	1.75E-04	-7.20	5.66E-35	-1.10	1.03E-02
SCLAV_p1328	SAM-dependent O-methyltransferase	-2.03	3.43E-03	-0.44	7.79E-01	-2.84	1.07E-03	-1.70	5.13E-02
SCLAV_p1452	GlnT-like protein	-3.39	3.70E-28	-0.60	3.33E-02	-4.50	2.24E-38	-1.54	1.60E-09
SCLAV_p1461	Response regulator:transcriptional regulatory protein	-1.06	5.81E-04	0.11	8.41E-01	-1.80	3.23E-09	-0.94	1.32E-03
SCLAV_p1498	Gll2891 protein	-0.62	1.25E-02	0.15	7.06E-01	-1.14	1.07E-06	-1.17	6.50E-07
SCLAV_p1539	Related to folylpolyglutamate synthase	-3.01	1.25E-14	-0.48	3.17E-01	-4.70	8.86E-27	-2.38	1.76E-10
SCLAV_p1582	Putative DNA-binding protein	-1.02	6.22E-05	-0.03	9.62E-01	-1.88	7.88E-13	-1.01	4.12E-05

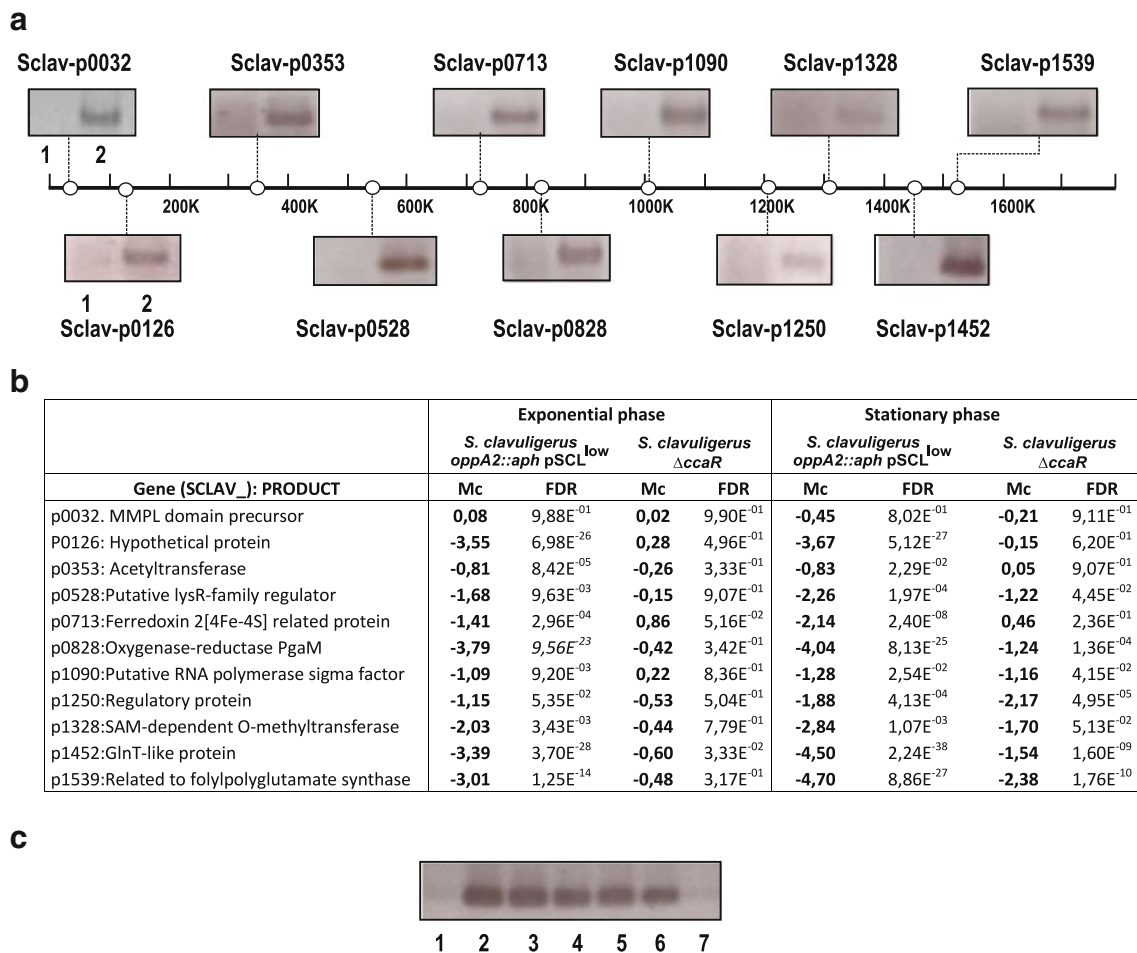


Fig. 1 Expression of genes located in the megaplasmid pSCL4 of *S. clavuligerus*. **a** Map of pSCL4. In each case the location and name of the gene studied by RT-PCR is indicated. The RT-PCR analysis corresponds to 24-h cultures in SA medium of *S. clavuligerus* oppA2::aph pSCL^{low} (2) and *S. clavuligerus* ATCC 27064 (3). **b** Microarrays expression

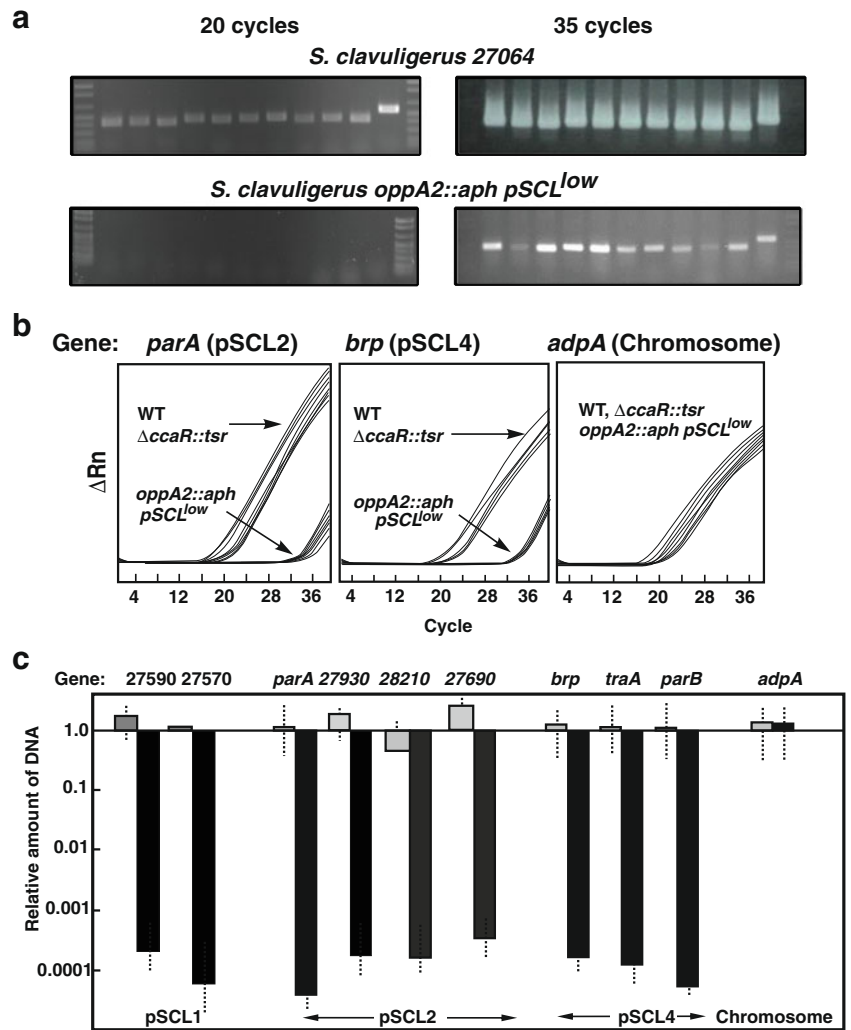
values of the 11 genes tested in pSCL4 in *S. clavuligerus* oppA2::aph pSCL^{low} and *S. clavuligerus* ΔccaR. **c** PCR amplification of the *parA*_{pSCL2} gene in: (1) *S. clavuligerus* oppA2::aph pSCL^{low} (1), *S. clavuligerus* ATCC 27064 (2), *S. clavuligerus* ΔoppA2::acc pSCL⁺ (3, 4), *S. clavuligerus* ΔccaR (5, 6). Negative control without DNA (7)

S. clavuligerus ΔoppA2::acc pSCL⁺ obtained from the wild-type strain *S. clavuligerus* ATCC 27064 by deletion of *oppA2*, contains a copy number of plasmids pSCL1, pSCL2, and pSCL4 identical to that of the wild type strain (as determined by qPCR, not shown). It has a growth pattern similar to that of the wild type strain, and produced aerial mycelium and spores in ME plates. It has a growth pattern similar to that of the wild-type strain. This strain lacks a functional *oppA2* gene but has two important phenotypic differences with respect to the original *oppA2* mutant, i.e. the normal ability to sporulate (Fig. 3) and a weak yellow color (lower holomycin production) of the colonies in SA medium. These results indicate that the *oppA2* mutation of the original *S. clavuligerus* oppA2::aph pSCL^{low} is not responsible for the high production of holomycin.

S. clavuligerus oppA2::aph pSCL⁻ obtained by protoplast regeneration of the original *S. clavuligerus* oppA2::aph pSCL^{low}, it completely lacks pSCL1, pSCL2, and pSCL4 as determined by qRT-PCR of genes internal to these plasmids. This strain does not sporulate (Fig. 3).

S. clavuligerus pSCL4⁻ Colonies with reduced growth, obtained by deletion of the *parA-parB*_{pSCL4} genes, as indicated in “Materials and methods”, were shown to lack the megaplasmid pSCL4. Plasmid genes *brp*, *traA*, and *parB*_{pSCL4} and the chromosomal *adpA* and *hrdB* genes, as control, were amplified. While PCR amplification of the chromosomal genes was in the same level than in the wild-type strain (Fig. 4), amplification of nine genes located in pSCL4 did not give amplification after 35 cycles of PCR. However,

Fig. 2 Quantification of *S. clavuligerus* plasmids by PCR and qPCR. **a** PCR amplification of the 11 genes studied in Fig. 2 (in the same order) after 20 PCR cycles (left panel) and 35 cycles (right panel) of amplification using total DNA from *S. clavuligerus* ATCC 27064 (upper panels) or *S. clavuligerus oppA2::aph pSCL^{low}* (lower panels). **b** Amplification curves of the qPCR for the *parA*_{pSCL2} gene, located in pSCL2, *brp* gene, located at pSCL4 and the chromosomal *adpA* gene in the three strains studied. **c** Relative amount of DNA for pSCL1 gene (SclaA2_010100027590 and SclaA2_010100027570), pSCL2 gene (*parA*_{pSCL2}, SclaA2_010100027930, SclaA2_010100028210, and SclaA2_010100027690), *brp*, *traA*, and *parB* (all in pSCL4) and the chromosomal *adpA* gene in *S. clavuligerus* Δ *ccaR* (gray bars), and *S. clavuligerus oppA2::aph pSCL^{low}* (black bars)



plasmids pSCL1 and pSCL2 were present in this strain, as shown by the normal amplification of pSCL1 genes (SclaA2_010100027590 and SclaA2_010100027579) and pSCL2 genes (*parA*_{pSCL2} and SclaA2_010100028210). Therefore, the strain obtained was named *S. clavuligerus* pSCL4⁻ (Fig. 4). These results indicate that the different linear plasmids have distinct *parA-parB* genes.

S. clavuligerus Δ *oppA2::acc pSCL4⁻* was obtained from *S. clavuligerus* pSCL4⁻ by deletion of the *oppA2* gene.

These two last strains, which lack the megaplasmid pSCL4, did not sporulate and showed a poor aerial mycelium formation ability (Fig. 3). Since the only common characteristic of the three strains, and the only difference with plasmid-containing *S. clavuligerus* Δ *oppA2::acc pSCL⁺*, is the lack of pSCL4, we conclude that plasmid pSCL4 carries genes involved in the control of aerial mycelium formation and genes essential for sporulation.

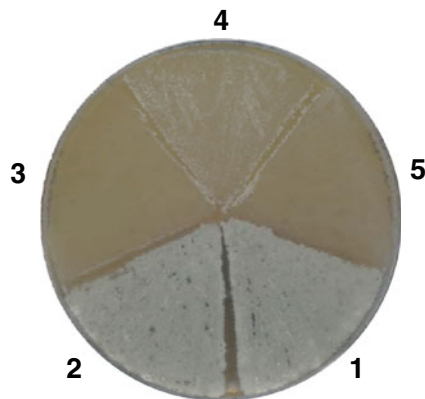


Fig. 3 Effect of the presence of plasmids on the morphologic differentiation of *S. clavuligerus* strains. The strains were grown in ME plates. 1) *S. clavuligerus* ATCC 27064, 2) *S. clavuligerus* Δ *oppA2::acc pSCL⁺*, 3) *S. clavuligerus* Δ *oppA2::acc pSCL⁻*, 4) *S. clavuligerus* pSCL4⁻, and 5) *S. clavuligerus oppA2::aph pSCL⁻*

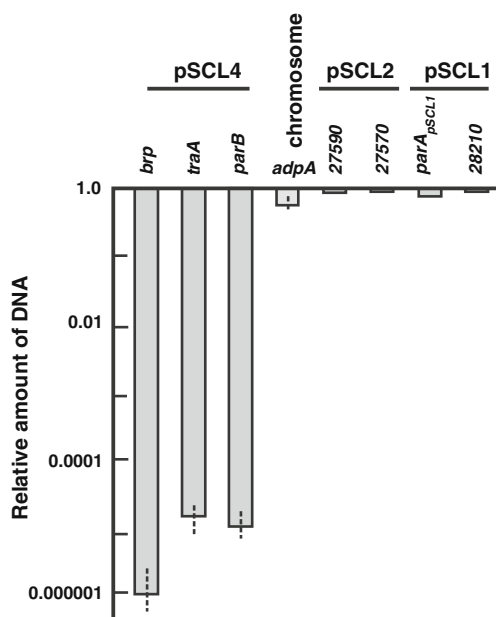


Fig. 4 Linear plasmids present in *S. clavuligerus* pSCL4⁻. Study of genes located in pSCL4, pSCL1, pSCL2, and in the chromosome as shown by qPCR. The location of the tested genes is indicated above

The growth pattern in defined SA liquid medium was also different. Growth of *S. clavuligerus* $\Delta oppA2::acc$ pSCL⁺ was slower than that of the wild-type strain and the DNA content of the mycelium (as a measure of the growth) was in the order of 80 % of that in the wild type. Growth of *S. clavuligerus* $\Delta oppA2::acc$ pSCL4⁻ was even lower showing average DNA content in the order of 60 % of that in the wild-type strain. Therefore, the lack of plasmids is correlated with a slow growth of the strains. The plasmid carry genetic information required for optimal growth.

Antibiotic production by plasmid-less strains and *oppA2*-deleted mutants carrying a normal plasmid copy number

Production of cephamycin C and clavulanic acid Production of cephamycin and CA by the strains constructed above was tested in liquid defined SA medium. In general, cephamycin C production was not significantly affected by the absence of plasmids in the strains (Fig. 5, right panels).

Clavulanic acid production was slightly reduced (20–30 %) by the lack of the pSCL4 megaplasmid with respect to the wild-type strain (Fig. 5, upper left panel). However, the disruption or deletion of *oppA2* resulted in a complete lack of clavulanic acid production which is not restored by the presence of all the plasmids in *S. clavuligerus* $\Delta oppA2::acc$ pSCL⁺ (Fig. 5, middle left panel). Clavulanic acid biosynthesis only depends on a functional *oppA2* gene as shown by comparing *S. clavuligerus* pSCL4⁻ and *S. clavuligerus* $\Delta oppA2::acc$ pSCL4⁻ (Fig. 5, lower left panel). This result

confirms previous reports indicating that *oppA2* is essential for CA biosynthesis.

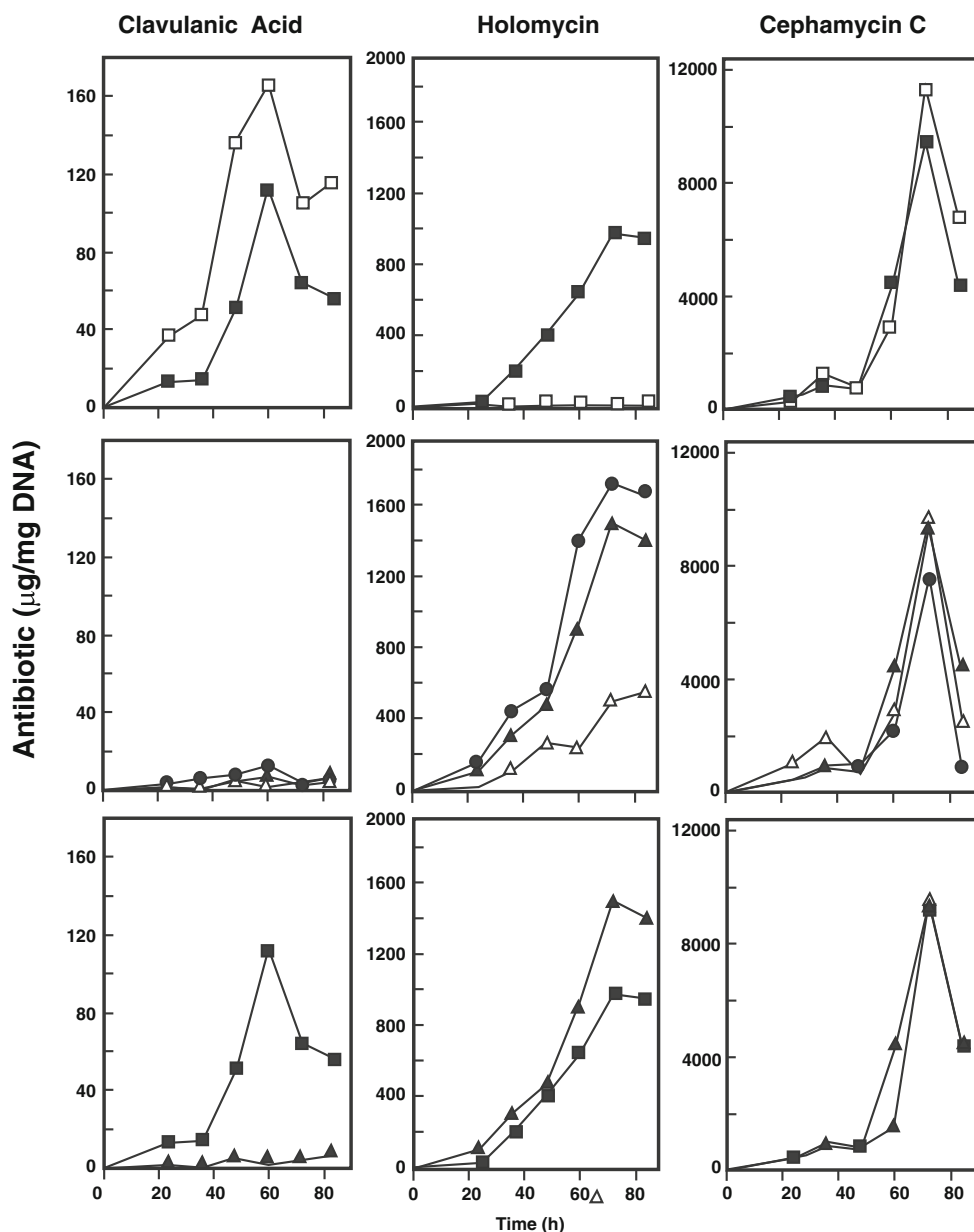
Production of holomycin Holomycin production (Fig. 5, central panels) by the wild-type strain is null; however, when plasmid pSCL4 is eliminated from the wild-type strain holomycin production reach 1,000 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DNA (185.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Fig. 5, upper middle panel). The lack of pSCL4 is sufficient for holomycin production. The lack of pSCL4 in *S. clavuligerus* $\Delta oppA2::acc$ pSCL4⁻ or the lack of all the plasmids in *S. clavuligerus* *oppA2::aph* pSCL⁻ results in holomycin overproduction up to 1,600 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DNA (Fig. 5, central middle panel). The mutation of *oppA2* in *S. clavuligerus* $\Delta oppA2::acc$ pSCL⁺, carrying all the plasmids, results in an holomycin production of 400 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DNA (Fig. 5, central middle panel) what indicates that *OppA2* has some effect on holomycin production. No great differences in holomycin were observed by the lack of the small plasmids pSCL1 and pSCL2. However, the production values of *S. clavuligerus* $\Delta oppA2::acc$ pSCL4⁻ and *S. clavuligerus* *oppA2::aph* pSCL⁻ (which lacks all plasmids) are about 2.5-fold higher than those observed in the strain *S. clavuligerus* $\Delta oppA2::acc$ pSCL⁺ that carries all the plasmids. Therefore, we can conclude that the mutation in *oppA2* results in production of holomycin but the additional loss of pSCL4 increases drastically the production of this antitumoral agent.

Discussion

Linear mini- and megaplasmids occur in *S. clavuligerus* ATCC 27064 (Medema et al. 2010) and in several other *Streptomyces* species (Kinashi 2011). Deletion of megaplasmids, if they are dispensable, is a valuable strategy to save energy and precursors of secondary metabolites encoded by genes located in the megaplasmid. Although three linear small plasmids pSCL1, pSCL2, and pSCL3 have been described using pulse field electrophoresis (Netolitzky et al. 1995) only pSCL1 and pSCL2 were clearly identified as separate replicons in genome sequencing (Medema et al. 2010; Song et al. 2010). Our results on the loss of pSCL1 and pSCL2 confirm that these plasmids are separate units and not chromosome integrated. The linear megaplasmid pSCL4 (1.8 Mb) is supposed to derive from the chromosome by double crossover with a smaller plasmid or by consecutive recombination events (Medema et al. 2010). The apparent lack of genes for primary metabolism suggested that pSCL4 is a dispensable plasmid and not a small chromosome.

Although the *whi* and *bld* genes, involved in aerial mycelium and spore formation are located in the *S. clavuligerus* chromosome, the pSCL⁻ strains were unable to sporulate indicating that an additional, still unknown gene located in the plasmids is essential for these morphological changes.

Fig. 5 Antibiotic production by *S. clavuligerus* strains with different genetic background. Cephamycin C production (right panels), clavulanic acid production (left panels), and holomycin production (central panels). Strains: *S. clavuligerus* ATCC 27064 (open squares), *S. clavuligerus* pSCL4⁻ (closed squares), *S. clavuligerus* *oppA2::aph* pSCL⁻ (closed circles), *S. clavuligerus* Δ *oppA2::acc* pSCL⁺ (open triangles), and *S. clavuligerus* Δ *oppA2::acc* pSCL4⁻ (closed triangles). The effect of the presence of plasmid pSCL4 in antibiotic production is shown in the upper panels. In the middle panels is shown the influence of plasmids pSCL1 and pSCL2 (closed circles and triangles) on antibiotic production in an *oppA2*-minus genetic background, a strain lacking only pSCL4 (open triangles) is included for comparison. The lower panels show the effect of the *oppA2* mutation (closed triangles) on antibiotic production by two strains lacking plasmid pSCL4



During the study of the original *S. clavuligerus* *oppA2::aph* mutant we observed that this strain (now designated *S. clavuligerus* *oppA2::aph* pSCL^{low}) has a greatly reduced number of copies of plasmids pSCL1, pSCL2, and pSCL4, what is responsible for some of the phenotypical alterations observed in this mutant. The original *oppA2* mutant strain shows very high production of holomycin (Lorenzana et al. 2004; Li and Walsh 2010), complete lack of clavulanic acid formation and was unable to produce aerial mycelium and spores.

The reduced copy number of linear plasmids suggested initially a mutation in the *par* genes or in other genes involved in plasmids replication or segregation. Each of *S. clavuligerus* plasmids has its own set of *par* genes. These genes are not very similar to each other and different from the *par* genes in the chromosome. The *parA-parB*_{pSCL4} genes appear to be relatively

stable and difficult to manipulate as shown by the lack of success of our initial trials to completely delete them. Therefore, the concomitant lower copy number of the three plasmids, pSCL1, pSCL2, and pSCL4, suggests that a gene controlling the copy number of all the plasmids (different from *parA-parB*) appears to be spontaneously altered in *S. clavuligerus* *oppA2::aph* pSCL^{low}.

In this work we constructed plasmid-free strains by protoplasts regeneration of *S. clavuligerus* *oppA2::aph* pSCL^{low} as shown by the lack of amplification of genes located along the whole length of pSCL4 megaplasmid after 35 cycles of PCR and by qPCR studies of genes located in the other plasmids. Strains carrying or lacking the plasmids, allowed to differentiate the role of the *oppA2*-mutation in plasmid-containing and plasmid-free backgrounds and highlighted the role of the lack of linear plasmids in the phenotype of *S. clavuligerus*

oppA2::aph pSCL^{low}. This work confirmed that: (1) the *oppA2* mutation has a role on activating the expression of the silent holomycin gene cluster. The loss of plasmids pSCL1, pSCL2, and pSCL4 causes a large increase of holomycin production by *S. clavuligerus oppA2::aph* pSCL⁻ in relation to *S. clavuligerus ΔoppA2::acc* pSCL⁺. Similar results were observed with *S. clavuligerus ΔoppA2::acc* pSCL4⁻, obtained after deletion of *parA-parB*_{pSCL4}. Therefore, the larger production of holomycin by these strains suggests that, (2) a repressor of the holomycin cluster is located in pSCL4. In fact, Kirby (1978) already associated the production of a yellow pigment (now known to be holomycin) by this strain with the presence of plasmids. The high production of holomycin by the plasmid-less strain is stimulated by the lack of OppA2 protein, although the mutation of the *oppA2* gene is not strictly required for holomycin production as shown by the holomycin production of *S. clavuligerus* pSCL4⁻ which contains a functional *oppA2* gene. Therefore, we can conclude that: (3) the effect of OppA2 and a holomycin putative repressor encoded by pSCL4 are additive.

The linear plasmids in the wild-type *S. clavuligerus* ATCC 27064 are quite stable in the absence of genetic manipulation. The pSCL4 deletion appears to be a random phenomenon; Charusanti et al. (2012) found that only one in 14 clones suffered the reduction in copy number or the loss of pSCL4 when challenged with pathogenic bacteria (Charusanti et al. 2012). As conclusion of our study it should be borne in mind that all the mutant strains obtained from *S. clavuligerus* ATCC 27064 should be checked for the presence of linear plasmids before a clear characterization of the effect of the mutations is done.

Acknowledgments This research was supported by grants BIO2009-09820 and BIO2012-34723 from the Spanish Ministry of Science and Innovation and LE046-A11-2 from the Junta de Castilla y León. R. Álvarez-Álvarez and Y. Martínez-Burgo received FPU fellowships from the Spanish Ministry of Science and Innovation. V. Robles-Reglero received a fellowship from the Junta de Castilla y León.

References

- 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
- Baggaley KH, Brown AG, Schofield CJ (1997) Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and other clavams. *Nat Prod Rep* 14:309–333
- Charusanti P, Fong NL, Nagarajan H, Pereira AR, Li HJ, Abate EA, Su Y, Gerwick WH, Palsson BO (2012) Exploiting adaptive laboratory evolution of *Streptomyces clavuligerus* for antibiotic discovery and overproduction. *PLoS One* 7(3):e33727
- de la Fuente A, Lorenzana LM, Martín JF, Liras P (2002) Mutants of *Streptomyces clavuligerus* disrupted in the late steps of the clavulanic acid pathway show high levels of homomycin synthase activity and synthesize very large amounts of holomycin: possible cross-regulation of two unrelated secondary metabolite pathways. *J Bacteriol* 184:6559–6565
- García-Domínguez M, Martín JF, Liras P (1989) Characterization of sugar uptake in wild-type *Streptomyces clavuligerus*, which is impaired in glucose uptake, and in a glucose-utilizing mutant. *J Bacteriol* 171:6808–6814
- Gust B, Kieser T, Chater KF (2002) REDIRECT technology: PCR-targeting system in *Streptomyces coelicolor*. The John Innes Centre, Norwich, United Kingdom
- Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA (2000) *Practical Streptomyces genetics*. John Innes Foundation, Norwich
- Kinashi H (2011) Giant linear plasmids in *Streptomyces*: a treasure trove of antibiotic biosynthetic clusters. *J Antibiot (Tokyo)* 64(1):19–25
- Kirby R (1978) An unstable genetic element affecting the production of the antibiotic holomycin by *Streptomyces clavuligerus*. *FEMS Microbiol Lett* 3:283–286
- Lee C, Kim J, Shin SG, Hwang S (2006) Absolute and relative qPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 123:273–280
- Li B, Walsh CT (2010) Identification of the gene cluster for the dithiopyrrolone antibiotic holomycin in *Streptomyces clavuligerus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 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. *Bioorg and Med Chem* 15:4601–4608
- Liras P, Santamarta I, Pérez-Redondo R (2011) Clavulanic acid and clavams biosynthesis and regulation. In: Dyson P (ed) *Streptomyces: molecular biology and biotechnology*. Horizon, Norwich, pp 167–178
- López-García MT, Santamarta I, Liras P (2010) Morphological differentiation and clavulanic acid formation are affected in a *Streptomyces clavuligerus* adpA-deleted mutant. *Microbiology* 156:2354–2365
- Lorenzana LM, Pérez-Redondo R, Santamarta I, Martín 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. *J Bacteriol* 186:3431–3438
- Mackenzie AK, Valegård K, Iqbal A, Caines ME, Kershaw NJ, Jensen SE, Schofield CJ, Andersson I (2009) Crystal structures of an oligopeptide-binding protein from the biosynthetic pathway of the beta-lactamase inhibitor clavulanic acid. *J Mol Biol* 396(2):332–344
- Medema MH, Trefzer A, Kovalchuk A, van den Berg M, Müller U, Heijne W, Wu L, Alam MT, Ronning CM, Nierman WC, Bovenberg RA, Breitling R, Takano E (2010) The sequence of a 1.8-Mb bacterial linear plasmid reveals a rich evolutionary reservoir of secondary metabolic pathways. *Genome Biol Evol* 2:212–224
- Mehra S, Lian W, Jayapal KP, Charaniya SP, Sherman DH, Hu W-S (2006) A framework to analyze multiple time series data: a case study with *Streptomyces coelicolor*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33:159–172
- Mellado E, Lorenzana LM, Rodríguez-Sáiz M, Díez B, Liras P, Barredo JL (2002) The clavulanic acid biosynthetic cluster of *Streptomyces clavuligerus*: genetic organization of the region upstream of the car gene. *Microbiology* 148:1427–1438
- Netolitzky DJ, Wu X, Jensen SE, Roy KL (1995) Giant linear plasmids of beta-lactam antibiotic producing *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Lett* 131:27–34
- Oliva B, O'Neill A, Wilson JM, O'Hanlon PJ, Chopra I (2001) Antimicrobial properties and mode of action of the pyrrothine holomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 45:532–539
- Pérez-Llarena FJ, Liras P, Rodríguez-García A, Martín JF (1997) A regulatory gene (*ccaR*) required for cephamycin and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*: amplification results in

- overproduction of both β -lactam compounds. *J Bacteriol* 179:2053–2059
- Pérez-Redondo R, Rodríguez-García A, Martín 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
- Ritchie M, Diyagama D, Neilson J, van Laar R, Dobrovic A, Holloway A, Smyth G (2006) Empirical array quality weights in the analysis of microarray data. *BMC Bioinformatics* 7:261–277
- Robles-Reglero V, Santamarta I, Álvarez-Álvarez R, Martín JF, Liras P (2013) Transcriptional analysis and proteomics of the holomycin gene cluster in overproducer mutants of *Streptomyces clavuligerus*. *J Biotechnol* 163(1):69–76
- Rodríguez-García A, Barreiro C, Santos-Beneit F, Sola-Landa A, Martín JF (2007) Genome-wide transcriptomic and proteomic analysis of the primary response to phosphate limitation in *Streptomyces coelicolor* M145 and in a Δ phoP mutant. *Proteomics* 7:2410–2429
- Santamarta I, López-García MT, Pérez-Redondo R, Koekman B, Martín JF, Liras P (2007) Connecting primary and secondary metabolism: AreB, an IclR-like protein, binds the ARE(*ccaR*) sequence of *S. clavuligerus* and modulates leucine biosynthesis and cephamycin C and clavulanic acid production. *Mol Microbiol* 66:511–524
- Sartor M, Schwanekamp J, Halbleib D, Mohamed I, Karyala S, Medvedovic M, Tomlinson CR (2004) Microarray results improve significantly as hybridization approaches equilibrium. *Biotechniques* 36:790–796
- Smyth GK (2004) Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 3:1544–6115
- Smyth GK, Speed TP (2003) Normalization of cDNA microarray data. *Methods* 31:265–273
- Smyth GK, Michaud J, Scott HS (2005) Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics* 21:2067–2075
- Song JY, Jeong H, Yu DS, Fischbach MA, Park HS, Kim JJ, Seo JS, Jensen SE, Oh TK, Lee KJ, Kim JF (2010) Draft genome sequence of *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585, a producer of diverse secondary metabolites. *J Bacteriol* 192(23):6317–6318
- Wang L, Tahlan K, Kaziuk TL, Alexander DC, Jensen SE (2004) Transcriptional and translational analysis of the *ccaR* gene from *Streptomyces clavuligerus*. *Microbiology* 150:4137–4145
- Ward JM, Hodgson JE (1993) The biosynthetic genes for clavulanic acid and cephamycin production occur as a 'super-cluster' in three *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Lett* 110:239–242
- Webster JM, Li J, Chen G (2000) Anticancer property of dithiopyrrolones. U.S. patent number 6,020,360
- Wu X, Roy KL (1993) Complete nucleotide sequence of a linear plasmid from *Streptomyces clavuligerus* and characterization of its RNA transcripts. *J Bacteriol* 175:37–52

Transcriptomic analysis of *Streptomyces clavuligerus* $\Delta ccaR::tsr$: effects of the cephamycin C-clavulanic acid C cluster regulator CcaR on global regulation

R. Álvarez-Álvarez,^{1,2} A. Rodríguez-García,^{1,2}
I. Santamarta,² R. Pérez-Redondo,²
A. Prieto-Domínguez,¹ Y. Martínez-Burgo¹ and
P. Liras^{1,2*}

¹Área de Microbiología, Departamento de Biología Molecular, Facultad de CC, Biológicas y Ambientales, Universidad de León, León, Spain

²Instituto de Biotecnología de León (INBIOTEC), Parque Científico de León, León, Spain

Summary

Streptomyces clavuligerus ATCC 27064 and *S. clavuligerus* $\Delta ccaR::tsr$ cultures were grown in asparagine-starch medium, and samples were taken in the exponential and stationary growth phases. Transcriptomic analysis showed that the expression of 186 genes was altered in the *ccaR*-deleted mutant. These genes belong to the cephamycin C gene cluster, clavulanic acid gene cluster, clavams, holomycin, differentiation, carbon, nitrogen, amino acids or phosphate metabolism and energy production. All the clavulanic acid biosynthesis genes showed M_c values in the order of -4.23 . The *blip* gene-encoding a β -lactamase inhibitory protein was also controlled by the cephamycin C-clavulanic acid cluster regulator ($M_c -2.54$). The expression of the cephamycin C biosynthesis genes was greatly reduced in the mutant (M_c values up to -7.1), while the genes involved in putative β -lactam resistance were less affected (M_c average -0.88). Genes for holomycin biosynthesis were upregulated. In addition, the lack of clavulanic acid and cephamycin production negatively affected the expression of genes for the clavulanic acid precursor arginine and of miscellaneous genes involved in nitrogen metabolism (*amtB*, *glnB*, *glnA3*, *glnA2*, *glnA1*). The transcriptomic results were validated by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction and luciferase assay of *luxAB*-coupled promoters. Transcriptomic analysis of

the homologous genes of *S. coelicolor* validated the results obtained for *S. clavuligerus* primary metabolism genes.

Introduction

Streptomyces species are the largest group of antibiotic-producing micro-organisms. Antibiotic biosynthesis genes are usually clustered and their expression is regulated in response to nutritional environment, culture time and cell density. Most of the gene clusters for antibiotic biosynthesis contain regulators responding to these parameters (Martín and Liras, 2010). Regulators of LysR- (Pérez-Redondo *et al.*, 1998) or large ATP-binding regulators of the LuxR family (LAL)-type (Wilson *et al.*, 2001; Antón *et al.*, 2004; Tahlan *et al.*, 2007) are present in several clusters, but the most common ones are the activator proteins belonging to the SARP (*Streptomyces* antibiotic regulatory proteins) family. They are present in many antibiotic clusters (Bate *et al.*, 2002; Garg and Parry, 2010; He *et al.*, 2010) and bind specific deoxyribonucleic acid sequences activating expression of antibiotic biosynthesis genes.

Cephamycin C biosynthesis in *Streptomyces cattleya* is controlled by a SARP-type protein encoded by *thnU*, a gene that is not located in the cephamycin C cluster (Rodríguez *et al.*, 2008). In *Streptomyces clavuligerus*, a similar protein, cephamycin C-clavulanic acid cluster regulator (CcaR), encoded by a gene located in the cephamycin C cluster, controls both cephamycin and clavulanic acid (CA) biosynthesis (Pérez-Llarena *et al.*, 1997; Santamarta *et al.*, 2011). The two clusters are located side by side in the chromosome.

Specific sequences for the binding of SARP proteins have been described in antibiotic biosynthesis genes (Wietzorrek and Bibb, 1997). In *S. clavuligerus*, triple heptameric conserved sequences are responsible for CcaR binding and controls the expression of the *lat*, *ceff*, *cefD* and *ccaR* genes in the cephamycin C cluster. In the CA cluster, CcaR binds sequences upstream of *ceaS2*, which encodes the first enzyme of the CA pathway, and of *claR*, for the LysR-type regulator controlling late steps in CA biosynthesis (Santamarta *et al.*, 2011).

At the beginning of this study, the *S. clavuligerus* genome was not published, but many *S. clavuligerus* genes had been deposited in the database and additional genes were available through the DSM (Delft, The

Received 16 October, 2013; revised 20 November, 2013; accepted 25 November, 2013. *For correspondence. E-mail paloma.liras@unileon.es; Tel. (+34) 987291504; Fax (+34) 987291409.
doi:10.1111/1751-7915.12109

Funding Information This work was financed by Grants BIO2012-34723 from the Ministry of Science and Innovation and LE046-A11-2 from the Junta de Castilla y León.

Netherlands) *S. clavuligerus* sequencing project. Therefore, we constructed microarrays containing probes for 800 genes of the *S. clavuligerus* genome as well as for 7728 genes of the *Streptomyces coelicolor* genome in order to compare the housekeeping genes of both strains. This microarray has been used to detect gene expression in different *S. clavuligerus* mutants. In this article, we report the results observed for *S. clavuligerus* $\Delta ccaR::tsr$, a strain lacking the SARP regulator that controls cephamycin C and CA biosynthesis.

Results

Transcriptomic analysis of antibiotic biosynthesis genes in *S. clavuligerus* ATCC 27064 and *S. clavuligerus* $\Delta ccaR::tsr$

Streptomyces clavuligerus ATCC 27064 and *S. clavuligerus* $\Delta ccaR::tsr$ cultures were grown in asparagine-starch (SA) medium, and samples were taken in the exponential and stationary growth phases (Fig. 1) as indicated in Experimental Procedures. The microarrays analysis showed differences in expression in 186 genes of the *ccaR*-negative mutant at one specific sampling time at least (Table 1).

These genes belong to the cephamycin C gene cluster, CA gene cluster, clavams, holomycin, cellular differentiation, carbon, nitrogen, amino acids or phosphate metabolism and energy production.

CA biosynthesis genes. Transcriptomic studies showed that expression of the four genes of the *ceaS2* to *cas2* operon, encoding enzymes for the early steps of CA biosynthesis, dropped in the mutant to an average M_c value of -6.34 in the exponential phase. Expression of *claR*, encoding the regulatory protein ClaR, is under CcaR control (Pérez-Redondo *et al.*, 1998; Santamarta *et al.*, 2011). This gene was underexpressed in the *ccaR*-deleted mutant ($M_c -4.61$) and concomitantly transcription of the genes for the late steps of the pathway *car*, *gcaS* as well as *cyp*, *orf12*, *orf13*, *orf14*, *oppA2*, *oppA1* and *orf16*, of unknown function, dropped an average M_c value of -4.23 , being *oat2*, *orf13* and *car* above this value.

Expression of *orf18* and *orf19*, which encode penicillin-binding proteins, *orf20* for a cytochrome P450 and *pcbR*, tentatively involved in β -lactam resistance, was lower in the mutant than in the wild-type strain. All these genes were expressed at higher M_c values (average $M_c -0.88$) than the biosynthetic genes in the *ccaR*-mutant.

An interesting finding was made in relation to genes encoding β -lactamase proteins. The *blp* gene, encoding a putative β -lactamase inhibitory protein, which is located downstream of *ccaR*, was clearly underexpressed in the mutant ($M_c -6.2$ and -4.8 in the exponential and stationary phases), which might be due to the absence of the

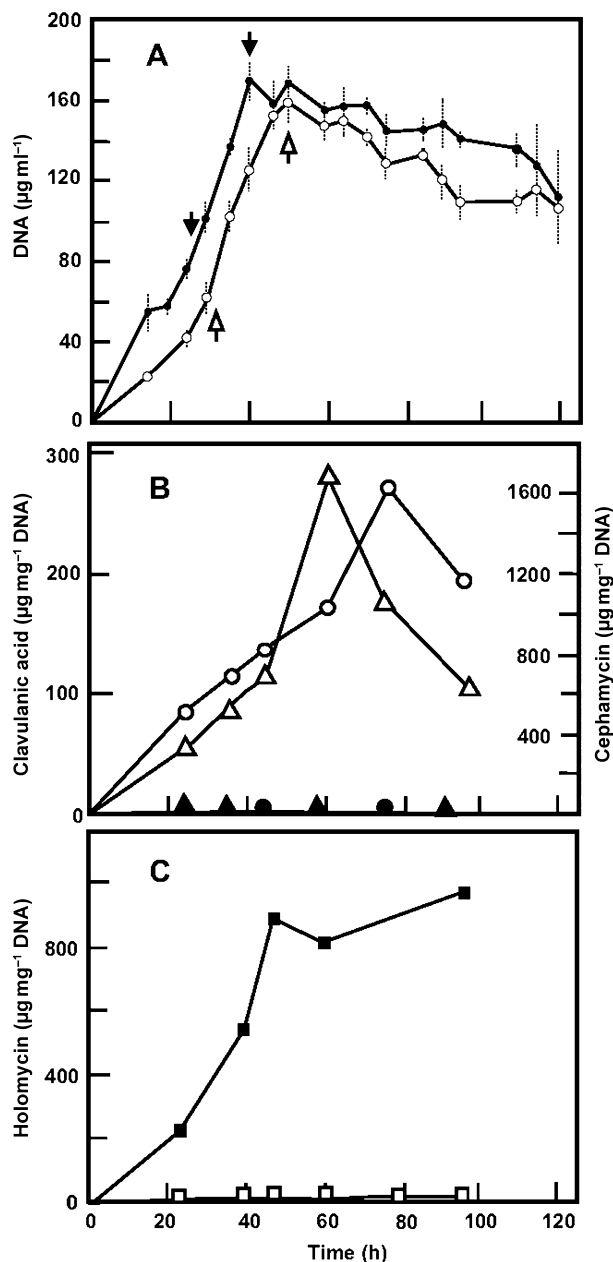


Fig. 1. Growth and antibiotic production in Asparagine-starch medium. Strains used: *S. clavuligerus* ATCC 27064 (open symbols) and *S. clavuligerus* $\Delta ccaR::tsr$ (closed symbols). A. Growth (circles) as measured by the DNA content. B. Cephamycin C (circles) or clavulanic acid (triangles) production. C. Holomycin production (squares).

ccaR promoter in the *ccaR*-mutant. The second gene, *blip*, encoding a well-characterized β -lactamase inhibitory protein (Doran *et al.*, 1990), was also underexpressed in the mutant. This gene, located outside the CA gene cluster, presented M_c values of -2.54 and -2.19 in the exponential and stationary phases, respectively.

A gene external to the CA cluster, *adpA*, encoding a regulatory protein involved in antibiotic biosynthesis

Table 1. *Streptomyces clavuligerus* Δ ccaR::tsr gene expression as compared with *S. clavuligerus* ATCC 27064.

Code	Gene	Product	Exponential phase		Stationary phase	
			Mc	FDR	Mc	FDR
Clavulanic acid biosynthesis						
SCLAV_4189	<i>cyp</i>	Cytochrome P450	-5.34	< 1E ⁻⁰⁶	-5.19	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_4191	<i>claR</i>	Transcriptional regulator	-4.61	< 1E ⁻⁰⁶	-3.99	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_4187	<i>orf12</i>	Beta-lactamase protein-like	-5.09	< 1E ⁻⁰⁶	-4.51	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_4181	<i>gcas</i>	Carboxylase	-5.44	< 1E ⁻⁰⁶	-4.98	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_4186	<i>orf13</i>	Export pump	-3.73	< 1E ⁻⁰⁶	-3.25	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_4185	<i>orf14</i>	Acetyl transferase	-4.77	< 1E ⁻⁰⁶	-3.84	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_4183	<i>oppA2</i>	Oligopeptide-binding protein	-5.28	< 1E ⁻⁰⁶	-4.72	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_4182	<i>orf16</i>	DUF482 domain-containing protein	-5.03	< 1E ⁻⁰⁶	-4.40	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_4180	<i>orf18</i>	Penicillin-binding protein	-0.49	7.48E ⁻⁰⁴	-0.58	2.02E ⁻⁰⁵
SCLAV_4179	<i>orf19</i>	Penicillin-binding protein	-0.61	9.36E ⁻⁰³	-0.65	1.99E ⁻⁰³
SCLAV_4178	<i>orf20</i>	Cytochrome P450	-0.95	3.93E ⁻⁰⁵	-1.68	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_4196	<i>bls2</i>	Beta-lactam synthetase 2	-6.38	< 1E ⁻⁰⁶	-5.36	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_4190	<i>car</i>	Clavaldehyde dehydrogenase	-3.94	< 1E ⁻⁰⁶	-3.03	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_4194	<i>cas2</i>	Clavaminato sintase 2	-6.55	< 1E ⁻⁰⁶	-6.00	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_4197	<i>ceaS2</i>	Carboxyethyl arginine synthetase 1	-5.78	< 1E ⁻⁰⁶	-5.33	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_4193	<i>oat2</i>	Similar to ornithine acetyltransferase	-2.67	< 1E ⁻⁰⁶	-2.81	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_4192	<i>oppA1</i>	Oligopeptide-binding protein	-4.97	< 1E ⁻⁰⁶	-4.44	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_4195	<i>pah2</i>	Proclavaminato amidinohydrolase 2	-6.66	< 1E ⁻⁰⁶	-6.01	< 1E ⁻⁰⁶
Cephamycin C biosynthesis						
SCLAV_4198	<i>pcbR</i>	Beta-lactam antibiotics resistance	-1.02	4.88E ⁻⁰⁵	-0.92	9.76E ⁻⁰⁵
SCLAV_4199	<i>pcbC</i>	Isopenicillin N synthetase	-3.25	< 1E ⁻⁰⁶	-2.82	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_4200	<i>pcbAB</i>	ACV Synthetase	-5.21	< 1E ⁻⁰⁶	-3.85	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_4201	<i>lat</i>	L-lysine epsilon amino transferase	-7.19	< 1E ⁻⁰⁶	-5.87	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_4202	<i>blp</i>	Similar to beta-lactamase inhibitory protein	-6.23	< 1E ⁻⁰⁶	-4.84	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_4203	<i>orf10</i>	Secreted protein	-3.40	< 1E ⁻⁰⁶	-3.20	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_4204	<i>ccaR</i>	Transcriptional regulator	-7.12	< 1E ⁻⁰⁶	-7.48	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_4205	<i>cmcH</i>	Cabamoyl transferase	-5.96	< 1E ⁻⁰⁶	-4.16	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_4206	<i>cefF</i>	Deacetyl cephalosporin C synthetase	-6.83	< 1E ⁻⁰⁶	-5.48	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_4207	<i>cmcJ</i>	Methyl transferase	-7.23	< 1E ⁻⁰⁶	-5.32	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_4208	<i>cmcl</i>	Cephalosporin hydroxylase	-7.48	< 1E ⁻⁰⁶	-6.25	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_4210	<i>cefD</i>	Isopenicillin N epimerase	-6.15	< 1E ⁻⁰⁶	-5.18	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_4211	<i>cefE</i>	Deacetoxycephalosporin C synthetase (DAOCS)	-5.12	< 1E ⁻⁰⁶	-4.45	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_4212	<i>pcd</i>	Piperidine carboxylate dehydrogenase	-3.40	< 1E ⁻⁰⁶	-2.08	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_4213	<i>cmcT</i>	Efflux protein	-3.74	< 1E ⁻⁰⁶	-2.29	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_4214	<i>pbp</i>	Penicillin-binding protein	-0.51	2.25E ⁻⁰³	-0.63	4.27E ⁻⁰⁵
Proteins <i>blip</i>						
SCLAV_4456	<i>atpA</i>	Similar to ABC transporter ATP-binding domain	-1.08	3.95E ⁻⁰²	-1.62	2.88E ⁻⁰⁴
SCLAV_4457	<i>atpA2</i>	Similar to ABC transporter ATP-binding domain	-1.07	< 1E ⁻⁰⁶	-1.65	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_4455	<i>blip</i>	Beta-lactamase inhibitory protein	-2.54	< 1E ⁻⁰⁶	-2.19	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_4452		Putative regulatory protein	-0.71	2.32E ⁻⁰¹	-0.99	2.71E ⁻⁰²
SCLAV_4453		Hypothetical protein	-0.76	1.10E ⁻⁰³	-0.98	< 1E ⁻⁰⁶
Clavams biosynthesis						
SCLAV_p1072	<i>orf8</i>	Serine hydroxymethyltransferase	-2.59	< 1E ⁻⁰⁶	-3.18	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_p1076	<i>pah1</i>	Proclavaminato amidinohydrolase 1	-0.98	3.99E ⁻⁰²	-3.23	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_p1077	<i>oat1</i>	Ornithine acetyltransferase isoenzyme	-1.58	6.48E ⁻⁰⁴	-2.60	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_p1078	<i>cvm6P</i>	Pyridoxal phosphate dependent aminotransferase	-1.04	9.64E ⁻⁰³	-2.28	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_p1079	<i>cvm7P</i>	Transcriptional regulator	-0.90	1.23E ⁻⁰³	-1.97	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_2922	<i>cvm6</i>	Pyridoxal phosphate dependent aminotransferase	-0.61	1.61E ⁻⁰²	-1.98	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_2923	<i>cvm5</i>	Flavin-dependent oxidoreductase	-1.51	2.27E ⁻⁰⁵	-2.88	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_2924	<i>cvm4</i>	Deacetylcephalosporin C acetyltransferase	-1.69	7.88E ⁻⁰³	-2.56	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_2925	<i>cas1</i>	Clavaminato synthase 1	-3.32	2.79E ⁻⁰²	-4.29	1.01E ⁻⁰³
SCLAV_2926	<i>cvm1</i>	Aldo/keto reductase family 2	-1.17	1.80E ⁻⁰⁴	-1.99	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_2927	<i>cvm2</i>	Ribulose 5 phosphate epimerase	-1.14	2.09E ⁻⁰⁵	-2.40	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_2928	<i>cvm3</i>	Oxidoreductase	-0.99	1.30E ⁻⁰³	-2.18	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_2932	<i>cvm13</i>	Asparaginase	-0.95	7.30E ⁻⁰⁴	-1.45	< 1E ⁻⁰⁶
Holomycin biosynthesis						
SCLAV_5267	<i>hlmA</i>	Acetyl transferase	5.95	< 1E ⁻⁰⁶	4.41	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_5268	<i>hlmB</i>	Acyl-CoA dehydrogenase	6.03	< 1E ⁻⁰⁶	4.60	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_5269	<i>hlmC</i>	Thioesterase	6.11	< 1E ⁻⁰⁶	4.39	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_5270	<i>hlmD</i>	Probable dehydrogenase	6.11	< 1E ⁻⁰⁶	4.07	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_5272	<i>hlmF</i>	DNA/pantothenate metabolism flavoprotein	5.47	< 1E ⁻⁰⁶	3.83	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_5273	<i>hlmG</i>	Hypothetical protein – <i>Frankia</i> sp. EAN1pec	5.41	< 1E ⁻⁰⁶	3.69	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_5275	<i>hlmI</i>	Putative reductase – <i>S. coelicolor</i>	3.96	< 1E ⁻⁰⁶	4.23	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_5278	<i>hlmM</i>	Putative transcriptional regulator	2.01	2.59E ⁻⁰⁴	1.36	8.01E ⁻⁰³

Table 1. cont.

Code	Gene	Product	Exponential phase		Stationary phase	
			Mc	FDR	Mc	FDR
Arginine biosynthesis						
SCLAV_0799	<i>argB</i>	Acetylglutamate kinase	-2.15	< 1E ⁻⁰⁶	-2.98	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_0801	<i>argC</i>	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	-1.70	3.58E ⁻⁰²	-2.49	3.43E ⁻⁰⁴
SCLAV_0798	<i>argD</i>	Acetonitrile aminotransferase	-1.67	3.19E ⁻⁰³	-2.60	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_0796	<i>argG</i>	Argininosuccinate synthase	-2.39	< 1E ⁻⁰⁶	-2.91	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_0795	<i>argH</i>	Argininosuccinate lyase	-2.37	1.29E ⁻⁰⁵	-2.81	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_0800	<i>argJ</i>	Glutamate N-acetyltransferase	-2.32	2.99E ⁻⁰⁵	-3.32	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_0797	<i>argR</i>	Transcriptional regulator	-1.45	1.30E ⁻⁰⁴	-2.34	< 1E ⁻⁰⁶
Drugs resistance						
SCLAV_0793	<i>epeA</i>	Transmembrane-transport protein	-0.19	8.42E ⁻⁰¹	-1.59	2.42E ⁻⁰³
SCLAV_0794	<i>epeR</i>	TetR-family transcriptional regulator	-0.48	2.76E ⁻⁰¹	-1.93	< 1E ⁻⁰⁶
Strict response						
SCLAV_0744	<i>relA</i>	ppGpp synthetase	1.19	5.69E ⁻⁰⁴	1.22	1.36E ⁻⁰⁴
Cell differentiation						
SCLAV_5713	<i>rarE</i>	Putative cytochrome P450	-0.72	5.18E ⁻⁰³	-1.22	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_1816	<i>rarB</i>	RarB Roadblock/LC7 protein	-0.91	2.60E ⁻⁰⁵	-0.56	6.25E ⁻⁰³
SCLAV_1817	<i>rarC</i>	RarC protein	-0.90	< 1E ⁻⁰⁶	-0.51	4.58E ⁻⁰³
SCLAV_1818	<i>rarD</i>	RarD ATP/GTP-binding protein	-0.82	2.70E ⁻⁰³	-0.74	2.61E ⁻⁰³
Energy						
SCLAV_0790		Putative glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	-0.91	1.16E ⁻⁰³	-1.29	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_1370		Probable cytochrome c oxidase polypeptide IV	-0.82	9.14E ⁻⁰⁵	-0.15	4.78E ⁻⁰¹
SCLAV_1372		Probable cytochrome c oxidase polypeptide II	-0.53	3.40E ⁻⁰²	-0.05	8.30E ⁻⁰¹
SCLAV_1613	<i>aceE</i>	Pyruvate dehydrogenase E1 component	-0.54	1.32E ⁻⁰⁴	-0.95	9.70E ⁻¹²
SCLAV_3564	<i>nuoA1</i>	NADH-quinone oxidoreductase chain	-0.96	< 1E ⁻⁰⁶	-0.48	8.03E ⁻⁰³
SCLAV_3970		Putative succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	-1.83	< 1E ⁻⁰⁶	-0.95	4.30E ⁻⁰⁴
SCLAV_3969		Fumarate reductase iron-sulfur subunit	-1.67	1.82E ⁻⁰⁵	-1.15	1.66E ⁻⁰³
SCLAV_4767		Monophosphatase	-1.86	< 1E ⁻⁰⁶	-0.34	2.16E ⁻⁰¹
Carbon metabolism						
SCLAV_0631	<i>glpF2</i>	Putative glycerol uptake facilitator protein	-1.49	1.12E ⁻⁰⁵	-1.95	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_0632	<i>glpK2</i>	Putative glycerol kinase	-1.13	9.59E ⁻⁰³	-1.82	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_0876	<i>gyIR</i>	Glycerol operon regulatory protein	-0.31	3.62E ⁻⁰¹	-1.34	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_0877	<i>glpF1</i>	Putative glycerol uptake facilitator protein	0.30	6.19E ⁻⁰¹	-0.42	2.76E ⁻⁰¹
SCLAV_0878	<i>glpK1</i>	Glycerol kinase	-0.07	9.08E ⁻⁰¹	-1.19	1.99E ⁻⁰⁵
SCLAV_0879	<i>glpD</i>	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	-0.02	9.35E ⁻⁰¹	-0.94	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_5509	<i>gap2</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2	-2.61	< 1E ⁻⁰⁶	-1.75	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_4529	<i>glcP</i>	Glucose permease	1.79	< 1E ⁻⁰⁶	-0.60	7.97E ⁻⁰²
SCLAV_p0975		Ribulose-phosphate 3-epimerase	-1.25	< 1E ⁻⁰⁶	-1.36	< 1E ⁻⁰⁶
Nitrogen metabolism						
SCLAV_4534	<i>amtB</i>	Ammonium transporter	-4.10	< 1E ⁻⁰⁶	-5.04	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_4535	<i>glnB</i>	Putative nitrogen regulatory protein P-II	-4.39	< 1E ⁻⁰⁶	-5.09	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_p1452	<i>glnIII</i>	Glutamine synthetase III	-0.60	3.33E ⁻⁰²	-1.54	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_1431	<i>glnA3</i>	Glutamine synthetase (Glutamate-ammonia ligase)	-4.67	< 1E ⁻⁰⁶	-5.32	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_1416	<i>glnA2</i>	Glutamine synthetase I (Glutamate-ammonia ligase I)	-3.56	< 1E ⁻⁰⁶	-2.95	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_1473		Glutamine synthetase	-0.88	6.84E ⁻⁰³	-2.35	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_4660	<i>gluD1</i>	Glutamate transporter permease	-0.84	1.62E ⁻⁰²	-1.28	4.14E ⁻⁰⁵
SCLAV_0834	<i>glnA1</i>	Putative glutamine synthetase	-1.77	< 1E ⁻⁰⁶	-2.41	< 1E ⁻⁰⁶
Phosphate metabolism						
SCLAV_1719	<i>phoH</i>	Phosphate starvation-induced protein	1.25	1.37E ⁻⁰⁴	-0.06	8.67E ⁻⁰¹
SCLAV_3166	<i>pstB</i>	PstB protein – Phosphate import ATP-binding	-0.93	1.41E ⁻⁰²	-1.50	1.14E ⁻⁰⁵
SCLAV_3167	<i>pstA</i>	PstA protein – Permease component	-1.12	4.84E ⁻⁰⁵	-1.61	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_3168	<i>pstC</i>	PstC protein – Permease component	-1.11	2.41E ⁻⁰²	-1.77	4.12E ⁻⁰⁵
SCLAV_3169	<i>pstS</i>	PstS protein precursor – Periplasmic component	-0.93	3.10E ⁻⁰²	-1.41	1.66E ⁻⁰⁴
SCLAV_3220	<i>phoU</i>	Putative phosphate transport system regulatory protein	-1.01	3.52E ⁻⁰⁴	-1.23	< 1E ⁻⁰⁶
Lipid metabolism						
SCLAV_4986		Putative acetyl-coenzyme A synthetase	-0.55	4.01E ⁻⁰²	-2.18	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_3406		Putative acetyl/propionyl CoA carboxylase alpha	-1.49	2.87E ⁻⁰³	-2.15	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_3405		Putative acetyl/propionyl CoA carboxylase beta	-1.64	< 1E ⁻⁰⁶	-2.41	< 1E ⁻⁰⁶
Transcriptional and regulatory proteins						
SCLAV_p0826		Putative AraC-family transcriptional regulator	0.88	2.87E ⁻⁰⁵	-0.05	8.17E ⁻⁰¹
SCLAV_p0894	<i>brp</i>	Gamma-butyrolactone receptor protein	0.86	7.97E ⁻⁰⁴	-0.55	1.98E ⁻⁰²
SCLAV_p1319		Putative transcriptional regulator AraC family	-1.72	1.75E ⁻⁰⁴	-1.10	1.03E ⁻⁰²

Table 1. cont.

Code	Gene	Product	Exponential phase		Stationary phase	
			Mc	FDR	Mc	FDR
SCLAV_1096		Transcriptional regulator, GntR-family protein	-0.66	1.20E ⁻⁰⁴	-0.09	6.16E ⁻⁰¹
SCLAV_1433		Putative regulatory protein	-1.18	2.33E ⁻⁰²	-0.60	1.94E ⁻⁰¹
SCLAV_1621		Putative MerR-family transcriptional regulator	0.67	2.33E ⁻⁰²	-0.93	2.92E ⁻⁰⁴
SCLAV_1957	<i>adpA</i>	AraC-family transcriptional regulator	-1.22	5.42E ⁻⁰⁴	-1.43	1.52E ⁻⁰⁵
SCLAV_1958	<i>ornA</i>	Oligoribonuclease	-1.00	< 1E ⁻⁰⁶	-0.97	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_2732		Two-component transcriptional regulator	1.31	2.20E ⁻⁰³	-0.23	6.00E ⁻⁰¹
SCLAV_3001		Putative gntR-family transcriptional regulator	-0.68	8.78E ⁻⁰⁴	-1.51	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_4054		WhiB-family transcriptional regulator	2.62	< 1E ⁻⁰⁶	0.32	3.13E ⁻⁰¹
SCLAV_4937		Putative regulatory protein	1.05	9.79E ⁻⁰⁶	-1.06	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_5278		AmphRI-like transcriptional regulator	2.01	2.59E ⁻⁰⁴	1.36	8.01E ⁻⁰³
Unknown function						
SCLAV_0018		Cytochrome P450 monooxygenase	-1.16	8.47E ⁻⁰³	-1.47	1.77E ⁻⁰⁴
SCLAV_0633		ATP-GTP-binding protein	-0.78	4.44E ⁻⁰²	-0.52	1.19E ⁻⁰¹
SCLAV_0636		Putative large secreted protein	-0.76	1.59E ⁻⁰²	-0.17	5.91E ⁻⁰¹
SCLAV_0646		Putative inhibitor of KinA	-0.93	3.99E ⁻⁰²	0.08	8.53E ⁻⁰¹
SCLAV_0743		Peroxidase	1.46	< 1E ⁻⁰⁶	1.40	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_1335		Two-component system sensor kinase	0.51	3.31E ⁻⁰²	-0.37	7.66E ⁻⁰²
SCLAV_1344		Conserved phosphoesterase	-0.78	1.36E ⁻⁰²	-1.11	8.41E ⁻⁰⁵
SCLAV_1564		Acetyl-CoA acetyltransferase	-2.06	< 1E ⁻⁰⁶	-2.68	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_1565		Cytochrome P450 hydroxylase	-1.26	< 1E ⁻⁰⁶	-2.67	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_1617		Hypothetical protein	1.02	< 1E ⁻⁰⁶	0.03	8.67E ⁻⁰¹
SCLAV_1748		DUF143 domain-containing protein	0.45	1.28E ⁻⁰²	0.14	4.26E ⁻⁰¹
SCLAV_1959		Sensor protein	-0.91	< 1E ⁻⁰⁶	-1.36	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_2623		SclavP3 predicted orf	1.03	1.10E ⁻⁰²	0.05	9.07E ⁻⁰¹
SCLAV_2625		Subtilase-type protease inhibitor precursor	0.96	4.44E ⁻⁰²	-0.04	9.33E ⁻⁰¹
SCLAV_3194		DUF1416 domain-containing protein	-0.77	2.64E ⁻⁰²	0.55	7.31E ⁻⁰²
SCLAV_4131		Metallophosphoesterase	-0.80	3.06E ⁻⁰²	-1.40	1.54E ⁻⁰⁵
SCLAV_4308		Methylmalonyl-CoA epimerase	-0.68	1.77E ⁻⁰⁵	-1.32	1.31E ⁻¹⁵
SCLAV_4352		Integrin-like protein	1.15	7.63E ⁻⁰³	0.42	2.98E ⁻⁰¹
SCLAV_4355		Hypothetical protein	-0.64	2.99E ⁻⁰²	-1.35	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_4359		Metalloendopeptidase	-2.95	1.92E ⁻⁰⁴	-3.36	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_4530		Acetyltransferase	2.52	< 1E ⁻⁰⁶	-0.21	6.30E ⁻⁰¹
SCLAV_4717		Putative hydroxylase	-1.20	6.98E ⁻⁰³	-1.71	2.05E ⁻⁰⁵
SCLAV_5249		Membrane protein	1.31	6.40E ⁻⁰⁴	0.20	6.10E ⁻⁰¹
SCLAV_p0763		Amidohydrolase:Amidohydrolase-like precursor	-0.84	3.63E ⁻⁰²	-0.10	7.94E ⁻⁰¹
SCLAV_p1123		Putative methyltransferase	3.26	< 1E ⁻⁰⁶	3.44	< 1E ⁻⁰⁶
SCLAV_p1142		Rhs family protein	-1.01	< 1E ⁻⁰⁶	-1.77	< 1E ⁻⁰⁶
pSCL2 Plasmid						
SclaA2_010100027605		Helicase	1.02	3.06E ⁻⁰³	-0.11	7.59E ⁻⁰¹
SclaA2_010100027610		Hypothetical protein	0.91	3.35E ⁻⁰⁴	0.14	6.04E ⁻⁰¹
SclaA2_010100027625		Hypothetical protein	0.91	4.42E ⁻⁰⁶	1.27	< 1E ⁻⁰⁶
SclaA2_010100027920		Transposase	1.00	7.48E ⁻⁰⁴	0.11	7.16E ⁻⁰¹
SclaA2_010100027930		Hypothetical protein	2.15	< 1E ⁻⁰⁶	1.27	1.21E ⁻⁰⁵
SclaA2_010100027935		Hypothetical protein	1.07	4.80E ⁻⁰³	0.86	1.27E ⁻⁰²
SclaA2_010100027955		GntR-family regulatory protein	0.85	3.89E ⁻⁰²	0.69	5.42E ⁻⁰²
SclaA2_010100027975		Hypothetical protein	0.50	2.02E ⁻⁰²	0.96	< 1E ⁻⁰⁶
SclaA2_010100027990		Hypothetical protein	0.70	6.76E ⁻⁰³	0.11	6.74E ⁻⁰¹
SclaA2_010100028020		Hypothetical protein	1.64	8.91E ⁻⁰⁸	1.18	5.15E ⁻⁰⁵
SclaA2_010100028015		Phosphatase	0.88	8.96E ⁻⁰³	-0.16	6.20E ⁻⁰¹
SclaA2_010100028325		Hypothetical protein	1.85	< 1E ⁻⁰⁶	0.42	1.64E ⁻⁰¹
SclaA2_010100028330		Hypothetical protein	2.71	< 1E ⁻⁰⁶	0.98	4.07E ⁻⁰²
SclaA2_010100028335		Transferase	2.97	< 1E ⁻⁰⁶	1.82	3.19E ⁻⁰⁵
SclaA2_010100028340		Telomere-associated protein	1.15	6.58E ⁻⁰³	0.27	5.12E ⁻⁰¹
SclaA2_010100028350		Hypothetical protein	0.73	6.58E ⁻⁰³	-0.29	2.42E ⁻⁰¹
SclaA2_010100028360		Hypothetical protein	0.75	3.28E ⁻⁰²	0.10	7.66E ⁻⁰¹
SclaA2_010100028340		Telomere-associated protein	0.79	1.61E ⁻⁰²	0.02	9.56E ⁻⁰¹
pSCL1 Plasmid						
SclaA2_010100027570		Hypothetical protein	1.69	4.80E ⁻⁰³	0.24	6.85E ⁻⁰¹
SclaA2_010100027560		Hypothetical protein	1.95	4.33E ⁻¹³	1.07	1.82E ⁻⁰⁵
SclaA2_010100027550		Hypothetical protein	1.11	1.81E ⁻⁰²	-0.22	6.21E ⁻⁰¹
SclaA2_010100027545		Hypothetical protein	1.11	6.58E ⁻⁰³	-0.51	1.73E ⁻⁰¹

ABC, ATP-binding cassette transporters; ATP, adenosine triphosphate; BLIP, β -lactamase-inhibitory protein; GTP, guanosine triphosphate; NADH, nicotinamide adenine dinucleotide.

(López-García *et al.*, 2010) was also slightly downregulated.

Genes for CA precursors. Clavulanic acid biosynthesis occurs through condensation of arginine and glyceraldehyde-3-phosphate by the carboxyethylarginine-synthase, the first enzyme of the CA pathway. *Streptomyces clavuligerus* and *S. coelicolor* probes of genes for arginine biosynthesis and glycerol utilization were present in the microarrays.

The arginine biosynthesis genes were downregulated in the *ccaR*-deleted mutant. Six genes for arginine biosynthesis, located in three separated locations in the *S. clavuligerus* genome, showed average M_c values of -2.01 and -2.85 in the exponential and stationary phases respectively. These genes are controlled by the *argR*-encoded regulator ArgR, whose expression decreased to -1.45 and -2.34 , at both sampling times.

The co-transcribed genes for glycerol utilization, *glpF1-glpK1-glpD1*, were weakly but significantly affected by the lack of the CcaR regulator, and the same occurred to the *glyR* gene, encoding the glycerol utilization regulatory protein (Baños *et al.*, 2009).

However, a positive effect of CcaR on the second cluster for glycerol utilization might occur, because *glpF2* and *glpK2* were underexpressed in the *ccaR*-deleted strain. The most affected gene in this group was *gap2*, encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ($M_c -2.61$ in the exponential growth phase).

Cephamicin C biosynthesis genes. In relation to cephamicin C biosynthesis, the transcriptomic data fitted well with those previously obtained by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (Santamarta *et al.*, 2011). The M_c values for *lat*, *cmcl*, *cmcJ*, *cefD* and *cefF* genes, either starting transcriptional units or close to the first gene of the operon, showed values ranging from -6.15 to -7.48 in the exponential phase, close to the -7.12 value of *ccaR* (which is deleted in the mutant), indicating a complete lack of transcription of these units. All other genes related to cephamicin biosynthesis showed M_c values between -3.2 and -7.12 in the exponential phase and their expression dropped in the *ccaR*-mutant by an average of 18% in the stationary phase.

The *pbp74* and *bla* genes were barely affected in the exponential phase but were less expressed in the mutant in the stationary phase.

Genes for other antibiotics produced by *S. clavuligerus*. All the holomycin biosynthesis genes tested were overexpressed in the *ccaR*-deleted mutant, with an average M_c value of 5.57 in the exponential phase, while the regulatory gene *hlmM* had a M_c value of 2.01. These results coincide with the formation of holomycin by the

S. clavuligerus ccaR::aph disrupted mutant detected by Fuente and colleagues (2002). A downregulation was observed in the clavams and CA paralogous clusters, especially in the stationary phase. Production of clavams is relatively variable and medium-dependent. However, *cas1* encoding the second clavamate synthase isoenzyme ($M_c -3.32$ and -4.29) and *cvm8*, encoding a serine hydroxymethyltransferase ($M_c -2.59$ and -3.18) were strongly downregulated in the *ccaR*-deleted mutant.

Nitrogen and phosphate metabolism

The lack of CcaR and, therefore, of CA and cephamicin C formation, affected nitrogen metabolism. A strong downregulation was observed in the exponential phase in the expression of the ammonium transporter-encoding gene *amtB* ($M_c -4.1$) and the downstream gene, *glnB* ($M_c -4.39$), which encodes the uridylyltransferase regulatory protein PII. This effect was stronger in the stationary phase ($M_c -5.04$ and -5.09 , for *amtB* and *glnB* respectively). Also genes for glutamine synthetases (*glnA3*, *glnA2*, *glnA1*) were underexpressed in the *ccaR*-deleted mutant ($M_c -4.67$, -3.56 and -1.77) in the exponential phase. A weaker, but clear downregulation also occurred in *gluD1*, encoding a glutamate permease. The homologous probes of *S. coelicolor* (also present in the arrays) for glutamine synthetase (*glnA*, *glnII*, SCO1613) as well of genes for urease (*ureAB*) and an allantoinase (SCO6247) gave a lower signal when hybridized with *S. clavuligerus* $\Delta ccaR::tsr$ messenger ribonucleic acid (mRNA) in relation to *S. clavuligerus* ATCC 27064 mRNA. This might indicate that cephamicin C and CA production requires a strong demand of nitrogen-derived precursors and, therefore, nitrogen metabolism slows down when antibiotic production is blocked.

Some genes involved in phosphate transport (*pstA*, *pstC* and *pstS*) showed a weak but clear underexpression in the *ccaR*-mutant, especially in the stationary phase sampling point.

Miscellaneous genes

Several genes involved in energy production or lipid metabolism were affected in the *ccaR*-deleted strain. This was the case for the genes encoding putative acetyl-CoA synthetases and acetyl-CoA carboxylases (SCLAV_4986, SCLAV_3405, SCLAV_3406) and the same occurred with the acetyltransferase- and methyltransferase-encoding genes (SCLAV_4530 and SCLAV_p1123). A set of genes whose function is unknown (SclaA2_010100027930, SclaA2_010100028330 and SclaA2_010100028335) all located in plasmid pSCL2, showed a clear overexpression in the mutant in the exponential phase of growth.

Effect on regulatory genes. The transcription of 13 genes encoding different types of regulators was affected in the mutant, including *adpA* (see previous discussion). A very strong downregulation was observed for the *whiB*-family transcriptional regulator (M_c 2.62) and for the gene encoding an AmphR1-like regulator (SCLAV_5278) with an M_c value of 2.0 in the exponential phase.

Expression of *S. clavuligerus* genes as detected by transcriptomic analysis of orthologous *S. coelicolor* genes

The whole *S. coelicolor* genome was represented in the microarrays. Therefore, we were able to compare expression of miscellaneous genes by heterologous hybridization of *S. coelicolor* probes present in the microarray with mRNA from *S. clavuligerus*. Heterologous transcriptomic studies confirmed the lower expression of the *glnA*, *glnII*, SCLAV_0834, *ureAB* and *gap2* genes in the $\Delta ccaR$ mutant. Other blocks of underexpressed genes were those encoding succinate dehydrogenases (SCLAV_3969 and SCLAV_3970) and the *nuo* genes (*nuoEFJKLMN*) for different subunits of the nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) dehydrogenase. Genes for membrane proteins or for hypothetical proteins were also found to be underexpressed; but some were overexpressed, including the orthologous aminotransferase encoded by SCLAV_5663 (M_c 2.63) and the methyltransferase encoded by SCLAV_5654 (M_c 2.56) (Supporting Information Table S1).

Validation studies

Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). The validation of many genes differentially expressed in this transcriptomic analysis has already been carried out using proteomics or qRT-PCR (Santamarta *et al.*, 2011). Such is the case for all the downregulated genes of the CA pathway and for the *lat*, *cmcI*, *cefD* or *cmcT* genes in the cephamycin C gene cluster.

Other differentially regulated genes present in Table 1 and Supporting Information Table S1 were validated by qRT-PCR performed on reverse-transcribed RNA samples. A total of 15 genes (*pcbC*, *pcd*, *claR*, *ceaS2*, *blip*, *hlmI*, *hlmA*, *gapA2*, *glnA1*, *glnA2*, SCLAV_4359, SCLAV_3668, *mprA2*, SCLAV_5661 and, as control, *hrdB*) were chosen for analysis (Fig. 2). The Pearson's correlation coefficient ($R^2 = 0.9243$) between M_c values and relative expression values of qRT-PCR indicates a good validation of the results.

Luciferase activity. Promoters of the *argR*, *phoH*, *amtB* and SCLAV_p1123 genes were coupled to the *luxAB* genes and the constructions were introduced in *S.*

clavuligerus ATCC 27064 and *S. clavuligerus* $\Delta ccaR::tsr$. Luciferase activity was lower in *S. clavuligerus* $\Delta ccaR::tsr$ when the *luxAB* genes were expressed from the *argR* and *phoH* promoters (Fig. 2C) and higher when expression was carried out from the *amtB* and SCLAV_p1123 promoters in agreement with the results obtained in the transcriptomic experiments. The correlation index between the data obtained, measuring luciferase activity and the M_c values of the respective genes, was 0.796. Luciferase activity differed slightly from the expected data of the microarrays when the enzyme was formed in the stationary phase using the *phoH* promoter.

Discussion

A transcriptomic study reveals the complete gene expression in a micro-organism, allowing the comparison of over-producing strains and wild-type strains (Medema *et al.*, 2010). However, while this method is convenient for understanding the metabolic flow in industrial strains, these strains have been obtained through heavy mutagenesis and selection programs; therefore, the final results observed might not be targeted at a particular mutation but derive from indirect effects of randomly mutated genes.

In this study, we compared the wild-type strain *S. clavuligerus* ATCC 27064 and a *ccaR*-deleted mutant obtained by molecular methods (Alexander and Jensen, 1998). As expected, the CA and cephamycin C biosynthesis genes are strongly downregulated in the mutant in agreement with the activator effect found previously for CcaR (Pérez-Llarena *et al.*, 1997; Santamarta *et al.*, 2011). These differences are very marked (a 37-fold decrease in the exponential phase) for all the CA biosynthesis genes, or the cephamycin biosynthesis genes (559-fold) but lower (average 1.6 fold) for genes located at the ends of the clusters (*orf18*, *orf19*, *orf20*, *pcbR*, *pbpA*), which are supposed to be involved in β -lactam antibiotic resistance. Interestingly, two genes encoding β -lactamase inhibitory proteins, *blip* and *blp*, are downregulated in the mutant. This is the first description of a relationship between CcaR and *blip* expression, a gene located outside the CA cluster. According to the transcriptomic data, *blip* is expressed as an independent gene. A putative heptameric sequence for CcaR binding is present 104 bp upstream of *blip*, suggesting a direct effect of CcaR on the expression of this gene; however, electrophoretic mobility shift assay analysis has to be performed to confirm this hypothesis. The function of the *blp*-encoded protein has not been clearly elucidated (Thai *et al.*, 2001), but this gene is strongly downregulated in the *ccaR*-mutant, perhaps due to a co-transcription with the *ccaR* gene located upstream.

Medema and colleagues (2010) found several uncharacterized gene clusters, including one for

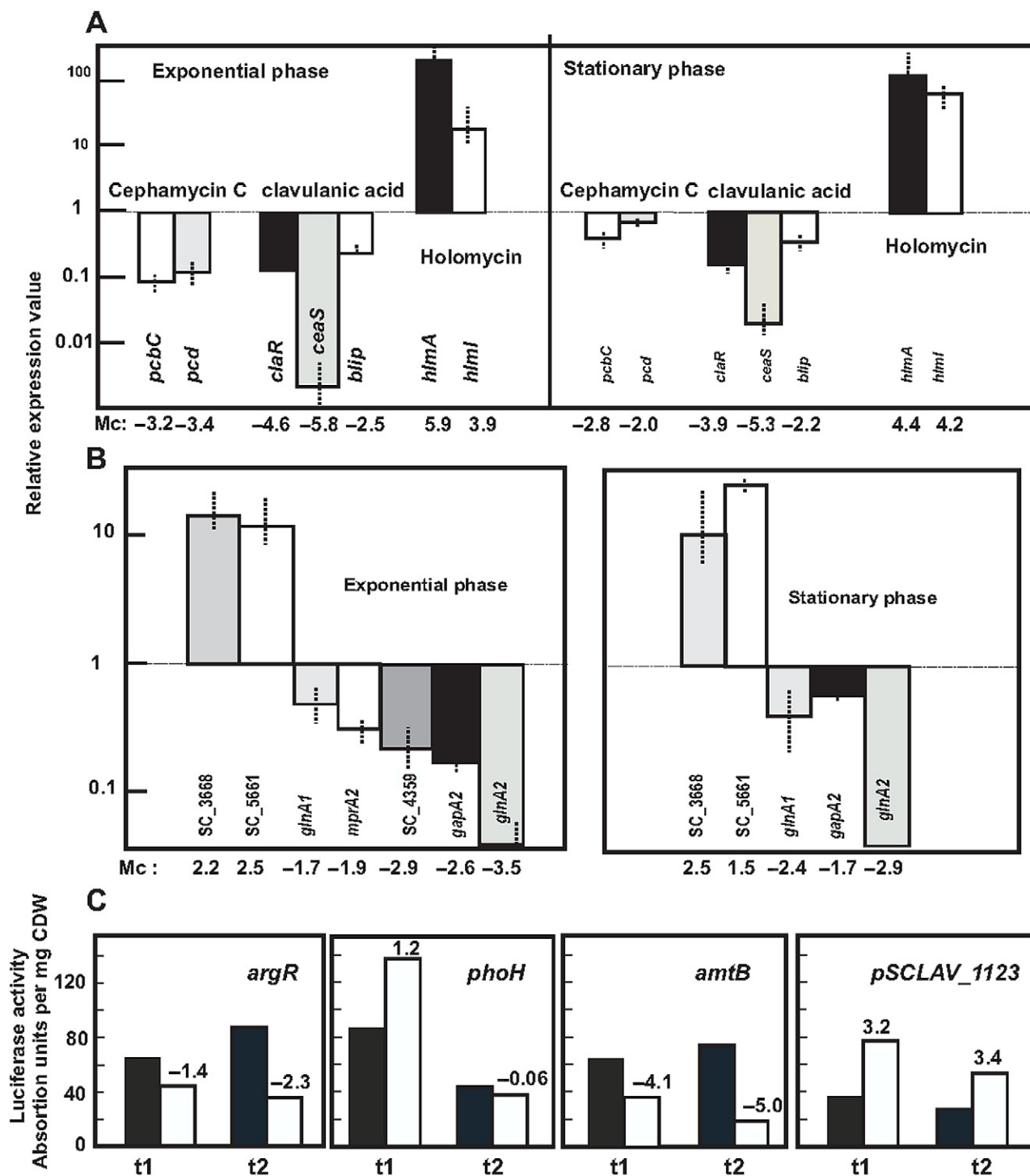


Fig. 2. Validation of the microarray results by qRT-PCR. Quantitative RT-PCR of genes indicated below using the oligonucleotides shown in Supporting Information Table S2. The relative values are referred to 1, assigned relative value for the expression of each gene in *S. clavuligerus* ATCC 27064. Error bars were calculated by measuring the standard deviation among biological replicates of each sample. A. Antibiotic biosynthesis genes. B. Miscellaneous genes indicated below. C. Validation of the microarray data using the luciferase coupled method. *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 (black bars); *S. clavuligerus* $\Delta ccaR::tsr$ (white bars). The numbers indicate for each gene the relative M_c values of *S. clavuligerus* $\Delta ccaR::tsr$ for each gene.

secondary metabolism, that were overexpressed in the high-producing strain. The opposite is found in *S. clavuligerus* Δ ccaR::tsr, in which all the genes for holomycin biosynthesis (*hlmA* to *hlmM*) are overexpressed (average values of 32-fold) confirming that the *ccaR*-knockout mutant produces more holomycin than the wild-type strain (Fuente *et al.*, 2002; Robles-Reglero *et al.*, 2013). These results agree with those of Chen and colleagues (2009) who reported an overexpression of the filipin biosynthesis genes in an *ave1*-disrupted mutant unable to produce avermectin and suggest that precursor and energy flow might be directed to the production of a different secondary metabolite once the most abundant metabolite pathway has been disrupted.

Expression of the clavams biosynthesis cluster or the 'paralogous' CA cluster, including the *cvm7* gene, encoding a LAL regulator, was weakly downregulated except for the *cas1* and *orf8* genes, encoding the clavamate synthetase1 isoenzyme and a serine hydroxymethyltransferase, which were strongly downregulated. This result contrasts with that of Medema and colleagues (2010) who described a significant overexpression of all these genes in the CA overproducing mutant that overexpresses *ccaR*.

The effects of CcaR absence on the transcription of *S. clavuligerus* primary metabolism genes are validated by the parallel transcription results for *S. coelicolor* genes present in the microarray.

Clavulanic acid is formed from arginine and a C3 compound derived from glycerol. All genes for arginine biosynthesis are strongly downregulated in the mutant suggesting that cells detect the lack of arginine requirement for CA biosynthesis in the *ccaR*-deleted mutant and shut down the arginine pathway. Genes for glycerol utilization (*glpF2*, *glpK2*) are expressed in the CA non-producing mutants in the order of 0.4-fold in relation to the control strain, which is a small reduction if compared with the two-fold expression increase observed for these genes by Medema and colleagues (2010) in the high CA-producing strain; however, our result in the *gap2* gene, for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2, indicates that this gene is downregulated (0.16-fold), confirming what was observed by Medema and colleagues (2010) in the high CA-producing strain and the relevance of *gap2*-disruption in increasing the glyceraldehyde-3-phosphate required for CA production (Li and Townsend, 2006).

In summary, our results confirm most of those previously obtained for a CcaR overproducing strain. CcaR binds heptameric sequences in many CA and cephamycin C genes. However, no clear heptameric sequences have been found in nitrogen metabolism genes, genes controlling energy flow or genes for the antibiotic precursors suggesting that the lack of CA and cephamycin C production directly affects the flow of these pathways.

Experimental procedures

Culture conditions

Streptomyces clavuligerus ATCC 27064 and the mutants *S. clavuligerus* Δ ccaR::tsr (Alexander and Jensen, 1998) and *S. clavuligerus* *ccaR*::aph (Pérez-Llarena *et al.*, 1997) were used in this work. Strain *S. clavuligerus* Δ ccaR::tsr was chosen for the transcriptomic experiments because the *ccaR* was deleted. To determine the more homogeneous and repetitive conditions for RNA sampling, the wild-type strain and *S. clavuligerus* Δ ccaR::tsr were grown in SA medium and DNA, cell dry weight and antibiotics production were analyzed. Trypticase soy broth medium (100 ml) was inoculated with 1 ml of frozen mycelia, and the culture was grown to an OD_{600nm} of 6.5. This culture was used to inoculate (5% v/v) 500 ml baffled flasks containing 100 ml of semidefined SA medium (Aidoo *et al.*, 1994). The cultures were maintained at 28°C with 220 r.p.m. shaking. Exponential phase sampling was done when the cultures reached a DNA content of 75 and 80 μ g ml⁻¹ in the wild type and the mutant (24 and 32 h respectively) and 160 and 170 μ g DNA ml⁻¹ in the wild type and the mutant for the early stationary phase (40 and 50 h respectively) (Fig. 1).

RNA isolation and purification

Samples (2 ml) from *S. clavuligerus* ATCC 27064 and *S. clavuligerus* Δ ccaR::tsr in the exponential and stationary growth phase in SA medium were stabilized with two volumes of RNA Protect Bacteria Reagent (Qiagen) for 5 min, then 1% β -mercaptoethanol was added. The samples were treated as indicated by Álvarez-Álvarez and colleagues (2013).

Labelling and microarray hybridizations

Streptomyces clavuligerus microarrays were obtained from Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA), in the Agilent 8 \times 15K format. They include *S. clavuligerus* quadruple probes for about 800 genes and intergenic regions of some clusters involved in secondary metabolism, and also duplicated probes for 7728 chromosomal genes (out of 7825) of the *S. coelicolor* genome. Four biological replicates were made for each condition (two strains and two growth times). Labelling reactions were performed according to the recommendations described by BioPrime Array CGH Genomic Labelling Systems (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Total RNA was labelled with Cy3-dCTP (Amersham, Freiburg, Germany) using random primers and Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Genomic deoxyribonucleic acid (gDNA) was labelled with Cy5-dCTP (Amersham) from random primers extended with the Klenow fragment of DNA polymerase (Roche, Basel, Switzerland). The final products were purified with MinElute columns (Qiagen, Venlo, the Netherlands) and labelling efficiencies were quantified spectrophotometrically. Cy3-cDNA (300 ng) and Cy5-labelled gDNA (10 pmol) were mixed, vacuum dried, resuspended in 32 μ L of hybridization solution (Agilent) and applied on the microarray surface. Hybridizations were carried out at 55°C and extended to 60 h to improve the quality of the results (Sartor *et al.*, 2004). Washing, scanning

with an Agilent DNA Microarray Scanner G2565BA and image quantification were carried out as indicated previously (Rodríguez-García *et al.*, 2007).

Identification of differentially transcribed genes and transcription profile classification

Microarray data were normalized and analyzed with the Bioconductor package *limma* (Smyth and Speed, 2003; Smyth, 2004). Weighted median was applied within arrays. Weights were assigned as follows: 1, probes corresponding to *S. coelicolor* genes showing a raw Cy3 intensity value higher than 2000; 0.25, probes corresponding to *S. clavuligerus* genes; and 0, the remaining probes. The normalized \log_2 of Cy3/Cy5 intensities is referred to as the M_g value, which is proportional to the abundance of transcripts for a particular gene (Mehra *et al.*, 2006). The procedure by Smyth and colleagues (2005) to include the information from within-array replicates was applied to the set of quadruple probes. The M_g transcription values of the four experimental conditions were compared using two contrasts, mutant *versus* wild type, corresponding to the two studied growth phases (exponential and stationary). For each gene, the M_c value is the binary log of the differential transcription between the mutant and the wild strain. A positive M_c value indicates upregulation, and a negative one, downregulation. False discovery rate (FDR) correction for multiple testing was applied. A result was considered as statistically significant if the FDR-corrected *P*-value < 0.05. The microarray data have been deposited in National Center for Biotechnology Information-Gene Expression Omnibus under accession number GSE51435.

qRT-PCR

The oligonucleotide primers used in this work are shown in Table S2 (Supporting Information). All PCR reactions were performed using total DNA of *S. clavuligerus* strains as a template in a T-gradient (Biometra, Goettingen, Germany) thermocycler. The PCR reaction (30 μ l) was performed as described by Kieser and colleagues (2000), and contained 300 ng DNA template, 0.5 mM each oligonucleotide, 28 mM each dGTP and dCTP, 12 mM each dATP and dTTP, 1 mM $MgCl_2$, dimethylsulfoxide 5%, and 0.8 U Taq DNA polymerase. The amplification programme was as follows: after a step of 95°C for 30 s, the annealing temperature was reduced in a touchdown of 1°C from 60°C to 55°C in one cycle, with an annealing time of 30 s; an annealing temperature of 55°C was used in the next 25 cycles with an extension step of 1 min at 72°C. Quantification and purity analysis of all PCR products was determined using a NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

Gene expression analysis by qRT-PCR was performed as previously described (López-García *et al.*, 2010). *Streptomyces clavuligerus* RNA was obtained in the same way as that used for microarray experiments. RNA samples were prepared using RNeasy mini-spin columns. The samples were treated with DNase I (Qiagen) and Turbo DNase (Ambion, Carlsbad, CA, USA) to eliminate DNA. Negative controls on qRT-PCR amplification (to confirm the absence of contaminating DNA) were carried out with each

set of primers. The efficiency of the primers used was measured by serial dilution of genomic DNA as template. Relative quantification of gene expression was performed by the $\Delta\Delta C_t$ method (Livak and Schmittgen, 2001), using the constitutive housekeeping gene *hrdB* as reference (Buttner *et al.*, 1990).

Luciferase assay

For luciferase reporter analysis, promoter regions were amplified with primers containing NdeI and BamHI restriction sites (Supporting Information Table S2) to clone the promoters in the ATG codon of the *luxA* gene in pLUXAR-neo. Cultures of *S. clavuligerus* exconjugants harbouring the promoter-probe constructs were carried out in SA medium. Sample treatment and the luciferase assays were done as described by Pérez-Redondo and colleagues (2012). At least two different cultures from the same strain were analyzed for luminescence production and measured in triplicate.

Acknowledgements

We acknowledge the reception of *S. clavuligerus* $\Delta ccaR::tsr$ from Prof. S. E. Jensen. *Streptomyces clavuligerus* gene sequences were obtained from DSM (The Netherlands). R. Álvarez-Álvarez and Y. Martínez-Burgo received Formación del Profesorado Universitario fellowships from the Ministry of Science and Innovation.

Conflict of interest

There no conflict of interest in this article.

References

- Aidoo, K.A., Wong, A., Alexander, D.C., Rittammer, R.A., and Jensen, S.E. (1994) Cloning, sequencing and disruption of a gene from *Streptomyces clavuligerus* involved in clavulanic acid biosynthesis. *Gene* **147**: 41–46.
- Alexander, D.C., and Jensen, S.E. (1998) Investigation of the *Streptomyces clavuligerus* cephamycin C gene cluster and its regulation by the CcaR protein. *J Bacteriol* **180**: 4068–4079.
- Álvarez-Álvarez, R., Martínez-Burgo, Y., Pérez-Redondo, R., Braña, A.F., Martín, J.F., and Liras, P. (2013) Expression of the endogenous and heterologous clavulanic acid cluster in *Streptomyces flavogriseus*: why a silent cluster is sleeping. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**: 9451–9463.
- Antón, N., Mendes, M.V., Martín, J.F., and Aparicio, J.F. (2004) Identification of PimR as a positive regulator of pimarinin biosynthesis in *Streptomyces natalensis*. *J Bacteriol* **186**: 2567–2575.
- Baños, S., Pérez-Redondo, R., Koekman, B., and Liras, P. (2009) Glycerol utilization gene cluster in *Streptomyces clavuligerus*. *Appl Environ Microbiol* **75**: 2991–2995.
- Bate, N., Stratigopoulos, G., and Cundliffe, E. (2002) Differential roles of two SARP-encoding regulatory genes during tylosin biosynthesis. *Mol Microbiol* **43**: 449–458.
- Buttner, M.J., Chater, K.F., and Bibb, M.J. (1990) Cloning, disruption and transcriptional analysis of three RNA polymerase sigma factor genes of *Streptomyces coelicolor*A3(2). *J Bacteriol* **172**: 3367–3378.

- Chen, L., Chen, J., Jiang, Y., Zhang, W., Jiang, W., and Lu, Y. (2009) Transcriptomics analyses reveal global roles of the regulator Avel in *Streptomyces avermitilis*. *FEMS Microbiol Lett* **298**: 199–207.
- Doran, J.L., Leskiw, B.K., Aippersbach, S., and Jensen, S.E. (1990) Isolation and characterization of a β -lactamase-inhibitory protein from *Streptomyces clavuligerus* and cloning and analysis of the corresponding gene. *J Bacteriol* **172**: 4909–4918.
- Fuente, A., de la Lorenzana, L.M., Martín, J.F., and 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. *J Bacteriol* **184**: 6559–6565.
- Garg, R.P., and Parry, R.J. (2010) Regulation of valanimycin biosynthesis in *Streptomyces viridifaciens*: characterization of Vlm1 as a *Streptomyces antibiotic* regulatory protein (SARP). *Microbiology* **156**: 472–483.
- He, X., Li, R., Pan, Y., Liu, G., and Tan, H. (2010) SanG, a transcriptional activator, controls nikkomycin biosynthesis through binding to the *sanN-sanO* intergenic region in *Streptomyces ansochromogenes*. *Microbiology* **156**: 828–837.
- Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., and Hopwood, D.A. (2000) *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich, UK: John Innes Foundation.
- Li, R., and Townsend, C.A. (2006) Rational strain improvement for enhanced clavulanic acid production by genetic engineering of the glycolytic pathway in *Streptomyces clavuligerus*. *Metabol Eng* **8**: 240–252.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$. *Methods* **25**: 402–408.
- López-García, M.T., Santamarta, I., and Liras, P. (2010) Morphological differentiation and clavulanic acid formation are affected in an *S. clavuligerus* Δ adpA-deleted mutant. *Microbiology* **156**: 2354–2365.
- Martín, J.F., and Liras, P. (2010) Engineering of regulatory cascades and networks controlling antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Curr Opin Microbiol* **13**: 263–273.
- Medema, M.H., Alam, M.T., Heijne, W.H.M., van der Berg, M.A., Müller, U., Trefzer, A., et al. (2010) Genome wide gene expression changes in an industrial clavulanic acid overproduction strain of *Streptomyces clavuligerus*. *Microbial Biotechnol* **4**: 300–305.
- Mehra, S., Lian, W., Jayapal, K.P., Charaniya, S.P., Sherman, D.H., and Hu, W.-S. (2006) A framework to analyze multiple time series data: a case study with *Streptomyces coelicolor*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **33**: 159–172.
- Pérez-Llarena, F.J., Liras, P., Rodríguez-García, A., and Martín, J.F. (1997) A regulatory gene (*ccaR*) required for cephamycin and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*: amplification results in overproduction of both beta-lactam compounds. *J Bacteriol* **170**: 2053–2059.
- Pérez-Redondo, R., Rodríguez-García, A., Martín, J.F., and 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-Redondo, R., Rodríguez-García, A., Botas, A., Santamarta, I., Martín, J.F., and Liras, P. (2012) ArgR of *Streptomyces coelicolor* is a versatile regulator. *PLoS ONE* **7**: e32697.
- Robles-Reglero, V., Santamarta, I., Álvarez-Álvarez, R., Martín, J.F., and Liras, P. (2013) Transcriptional analysis and proteomics of the holomycin gene cluster in overproducer mutants of *Streptomyces clavuligerus*. *J Biotechnol* **163**: 69–76.
- Rodríguez, M., Núñez, L.E., Braña, A.F., Méndez, C., Salas, J.A., and Blanco, G. (2008) Identification of transcriptional activators for thienamycin and cephamycin C biosynthetic genes within the thienamycin gene cluster from *Streptomyces cattleya*. *Mol Microbiol* **69**: 633–645.
- Rodríguez-García, A., Barreiro, C., Santos-Beneit, F., Sola-Landa, A., and Martín, J.F. (2007) Genome-wide transcriptomic and proteomic analysis of the primary response to phosphate limitation in *Streptomyces coelicolor* M145 and in a Δ phoP mutant. *Proteomics* **7**: 2410–2429.
- Santamarta, I., López-García, M.T., Kurt, A., Nárdiz, N., Álvarez-Álvarez, R., Pérez-Redondo, R., et al. (2011) Characterization of DNA-binding sequences for CcaR in the cephamycin-clavulanic acid supercluster of *Streptomyces clavuligerus*. *Mol Microbiol* **81**: 968–981.
- Sartor, M., Schwaneckamp, J., Halbleib, D., Mohamed, I., Karyala, S., Medvedovic, M., et al. (2004) Microarray results improve significantly as hybridization approaches equilibrium. *Biotechniques* **36**: 790–796.
- Smyth, G.K. (2004) Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* **3**: 1544–6115.
- Smyth, G.K., and Speed, T.P. (2003) Normalization of cDNA microarray data. *Methods* **31**: 265–273.
- Smyth, G.K., Michaud, J., and Scott, H.S. (2005) Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics* **21**: 2067–2075.
- Tahlan, K., Anders, C., Wong, A., Mosher, R.H., Beatty, P.H., Brumlik, M.J., et al. (2007) 5S clavam biosynthetic genes are located in both the clavam and paralog gene clusters in *Streptomyces clavuligerus*. *Chem Biol* **14**: 131–142.
- Thai, W., Paradkar, A.S., and Jensen, S.E. (2001) Construction and analysis of ss-lactamase-inhibitory protein (BLIP) non-producer mutants of *Streptomyces clavuligerus*. *Microbiology* **147**: 325–335.
- Wietzorrek, A., and Bibb, M. (1997) A novel family of proteins that regulate antibiotic production in streptomycetes appears to contain an OmpR-like DNA-binding fold. *Mol Microbiol* **25**: 1177–1184.
- Wilson, D.J., Xue, Y., Reynolds, K.E., and Sherman, D.H. (2001) Characterization and analysis of the PikD regulatory factor in the pikromycin biosynthetic pathway of *Streptomyces venezuelae*. *J Bacteriol* **183**: 3468–3475.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

Table S1. Expression of *S. clavuligerus* genes as detected by hybridization in microarrays with *S. coelicolor* probes

Table S2. Oligonucleotides used in this work

