



UNIVERSIDAD DE LEÓN

Departamento de Biología Molecular

Área de Microbiología

**Producción de compuestos bioactivos por
Streptomyces clavuligerus: Análisis
transcriptómico diferencial entre *Streptomyces
clavuligerus* ATCC 27064 y mutantes alterados en
la producción de antibióticos**



Memoria presentada por el Licenciado Rubén Álvarez Álvarez para la obtención del grado de Doctor en Biología por la Universidad de León

León, 2014



universidad
de león

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

(Art. 11.3 del R. D. 56/2005)

La Dra. Dña. Paloma Liras Padín como Directora de la Tesis Doctoral titulada “Producción de compuestos bioactivos por *Streptomyces clavuligerus*: Análisis transcriptómico diferencial entre *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 y mutantes alterados en la producción de antibióticos” realizada por D. Rubén Álvarez Álvarez en el programa de doctorado Biología Molecular y Biotecnología, informa favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, en León a 1 de Septiembre de 2014.

Fdo. Dña. M^a Paloma Liras Padín



universidad
de león

ADMISIÓN A TRÁMITE DE LA TESIS DOCTORAL

(Art. 11.3 del R.D. 56/2005 y norma 7ª de las complementarias de la ULE)

El órgano responsable del programa de doctorado Biología Molecular y Biotecnología en su reunión celebrada el día 3 de Septiembre de 2014 ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada “Producción de compuestos bioactivos por *Streptomyces clavuligerus*: Análisis transcriptómico diferencial entre *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 y mutantes alterados en la producción de antibióticos”, dirigida por el Dra. Dña. Paloma Liras Padín, elaborada por D. Rubén Álvarez Álvarez.

Lo que firmo, en León a 3 de Septiembre de 2014.

Vº Bº

El Director del Departamento/
Presidente de la Comisión Académica,

El Secretario,

Fdo.: D. Carlos Polanco de la Puente

Fdo.: Dña. Honorina Martínez Blanco

Financiación

La presente tesis doctoral presentada por compendio de publicaciones ha sido desarrollada gracias a la concesión al doctorando de una beca del Ministerio de Ciencia e Innovación, del Gobierno de España, para la formación de profesorado universitario entre los años 2009-2013 (AP2008-01409) y de un contrato predoctoral con cargo al proyecto de investigación BIO2012-34723 entre Agosto de 2013 y Diciembre de 2014.

- La primera etapa del trabajo de investigación ha sido llevado a cabo en el ***Instituto de Biotecnología de León (INBIOTEC)***. Esta etapa del trabajo fue financiada mediante:

Proyecto BIO2009-09820: Análisis funcional de las agrupaciones génicas para metabolitos secundarios en *Streptomyces clavuligerus*.

Entidad financiadora: *Ministerio de Ciencia e Innovación. Gobierno de España*

Duración: 28/12/2009-31/12/2012

Investigador principal: Paloma Liras Padín

Número de investigadores participantes: 8

- La segunda etapa de trabajo para el desarrollo de este trabajo de investigación ha sido realizado en el ***Departamento de Biología Molecular (Área de Microbiología)***. Esta etapa del trabajo fue financiada mediante:

Proyecto LE046A11-2: Biosíntesis y genética de la producción de holomicina por *Streptomyces clavuligerus*.

Entidad financiadora: *Junta de Castilla y León. Consejería de Educación*

Duración: 1/01/2011-31/10/2013

Investigador principal: Paloma Liras Padín

Número de investigadores participantes: 8

Proyecto BIO2012-34723: Expresión diferencial de agrupaciones para la biosíntesis de metabolitos secundarios: “*Genome mining*” de *Streptomyces clavuligerus*.

Entidad financiadora: *Ministerio de Educación, Ciencia y Deporte. Gobierno de España*

Duración: 1/01/2013-31/12/2014

Investigador principal: Paloma Liras Padín

Número de investigadores participantes: 6

Agradecimientos

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a todas las personas e instituciones que han hecho posible de alguna manera u otra el desarrollo de esta tesis doctoral.

En primer lugar, agradecer a la Dra. Paloma Liras por la dirección de esta tesis y darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio. Por su confianza puesta en mí desde el principio, por su dedicación incondicional y sus consejos. También quisiera agradecer de forma especial al Dr. Juan Francisco Martín, codirector "no oficial" de esta tesis. Gracias por sus mil y una ideas a la hora de plantear los experimentos y dar explicación a los resultados obtenidos. Ambos son ejemplo de trabajo y constancia: referentes.

Agradecer al Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España la concesión de una beca de Formación de Profesorado Universitario (FPU), sin la cual este trabajo no hubiera sido llevado a término.

A Antonio y Rosma, por todos vuestros valiosos consejos en el arduo mundo de la transcriptómica y genómica. Todo lo poco que sé, en gran parte es gracias a vosotros.

A todos los compañeros de laboratorio, primero en INBIOTEC y después en el Área de Microbiología del Departamento de Biología Molecular. Mil gracias porque entre todos de alguna manera u otra habéis hecho posible esta tesis con vuestros consejos y ayuda, siempre dispuestos a echar un cable. Sobre todo por los buenos momentos que permitieron un excelente clima de trabajo en el duro día a día del laboratorio.

También quisiera agradecer al Dr. Ángel Rumbero de la Universidad Autónoma de Madrid y al Dr. Alfredo F. Braña, por su colaboración en la identificación de la naringenina y del ácido clavulánico, respectivamente. A las áreas de Fisiología Vegetal y Bioquímica, por la utilización de sus equipos de investigación.

No sería de justicia no expresar mi más afectuoso agradecimiento a mis amigos, parte de ellos también compañeros de carrera y doctorado. Ellos saben lo difícil que resulta expresar con palabras el apoyo fundamental que han sido en todo este tiempo. Gracias por los buenos momentos compartidos. Sin duda, el mejor recuerdo de estos años.

A Elizabeth, gracias por tantas cosas. Por tu paciencia infinita, por tu confianza en mí, tu aliento y apoyo incondicional. Por interesarse por las "perrerías" que le hago a "*clavu*", mi otra chica según dices. Por tu cariño y tu amor. Gracias por ser.

Por último, a mi familia. Gracias por tantas cosas. Son pocas las palabras que puedan expresar toda mi gratitud. Por vuestro cariño infinito y desmedida admiración que me mostráis cada día, aún sin entender muy bien las cosas que me traigo entre manos en el laboratorio. El cariño es recíproco. En especial a mis abuelos, Juan, Nati, Darío y Elena, por su ejemplo de esfuerzo y trabajo duro. Por ser mis más valiosos y expertos consejeros desde sus experiencias en una larga vida de sacrificio. Mis referentes desde muy joven.

Mi agradecimiento especial y cariñoso a mis padres, Darío y Nati. Todo lo que soy es gracias a vosotros. Por ser también ejemplo de esfuerzo y trabajo bien hecho para lograr cualquier meta por difícil que se presente. Por vuestra confianza en mí y estímulo constante. Esta tesis es también gracias a vosotros, a quienes es dedicada de forma especial. Gracias de corazón.

*A mi familia,
en especial, a mis padres.*

Índice

Abreviaturas	1
Resumen	3
1. Introducción	7
1.1. Características generales del género <i>Streptomyces</i>	9
1.1.1. Los actinomicetos: taxonomía y filogenia del grupo.....	9
1.1.2. Biología de <i>Streptomyces</i>	12
1.1.2.1. Organización genómica	12
El cromosoma: Estructura y organización	
Elementos extracromosomales	
1.1.2.2. Ciclo de vida de <i>Streptomyces</i>	14
1.1.2.3. Regulación del desarrollo y diferenciación morfológica de <i>Streptomyces</i>	16
1.1.3. Metabolismo secundario	19
1.1.3.1. Regulación del metabolismo secundario	22
1.1.3.1.1. Reguladores específicos de ruta	23
1.1.3.1.2. Reguladores globales o pleiotrópicos	24
1.1.3.2. Agrupaciones biosintéticas críticas de metabolitos secundarios	27
1.2. Características de la especie <i>Streptomyces clavuligerus</i>	30
1.2.1. Organización genómica en <i>S. clavuligerus</i>: agrupaciones biosintéticas de metabolitos secundarios	31
1.2.1.1. Biosíntesis de cefamicina C, ácido clavulánico y clavamas	32
Ruta biosintética de cefamicina C	
Ruta biosintética del ácido clavulánico y clavamas	
Regulación coordinada de la biosíntesis de cefamicina C y ácido clavulánico.	
1.2.1.2. Biosíntesis de holomicina	38
Ruta biosintética de holomicina	
Regulación de la biosíntesis de holomicina	
1.3. Bibliografía.....	42
2. Objetivos.....	65

3. Resultados.....	69
3.1. Capítulo I. Transcriptomic analysis of <i>Streptomyces clavuligerus</i> ΔccaR::tsr: effects of CcaR on global regulation.....	73
3.1.1. Summary	75
3.1.2. Introduction	76
3.1.3. Results	77
3.1.4. Discussion.....	81
3.1.5. Experimental procedures.....	84
3.1.6. Bibliography	87
3.2. Capítulo II. A 1.8 Mb-reduced <i>Streptomyces clavuligerus</i> genome: Relevance for secondary metabolism and differentiation.....	91
3.2.1. Abstract.....	93
3.2.2. Introduction	94
3.2.3. Materials and methods.....	95
3.2.4. Results	100
3.2.5. Discussion.....	108
3.2.6. References.....	110
3.3. Capítulo III. Expression of the endogenous and heterologous clavulanic acid cluster in <i>Streptomyces flavogriseus</i>: Why a silent cluster is sleeping.....	115
3.3.1. Abstract.....	117
3.3.2. Introduction	118
3.3.3. Materials and methods.....	120
3.3.4. Results	123
3.3.5. Discussion.....	131
3.3.6. References.....	134
3.4. Capítulo IV. Molecular genetics of naringenin biosynthesis, a typical plant secondary metabolite produced by <i>Streptomyces clavuligerus</i>	141
3.4.1. Summary	143
3.4.2. Introduction	144
3.4.3. Materials and methods.....	146
3.4.4. Results	148
3.4.5. Discussion.....	155
3.4.6. References.....	159
4. Discusión	165
5. Conclusiones	179
6. Anexos	183

Abreviaturas

A: adenina	Kb: kilopares de bases
aa: aminoácidos	kDa: kilodalton
acc: casete de resistencia a apramicina	LFRFA: Análisis de Fragmentos de Restricción de baja frecuencia, del inglés <i>Low-Frequency Restriction Fragment Analysis</i>
amp: ampicilina	M: molar
aph: kanamicina	Mb: megapares de bases
apra: apramicina	MHz: Megahercio
ATCC: Colección Americana de Cultivos Tipo	MOPS: ácido morfolinopropanosulfónico
ATP: adenosin-5'-trifosfato	mRNA: RNA mensajero
C: citosina	MS: espectrometría de masas
CDA: Antibiótico peptídico dependiente de calcio	nm: nanómetro
CIA: cloroformo-alcohol isoamílico	NMR: resonancia magnética nuclear
Cm: cloranfenicol	ORF: marco de lectura abierto
CoA: coenzima A	PCR: reacción en cadena de la polimerasa
Ct: ciclo umbral, del inglés <i>Threshold Cycle</i>	RFLP: polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
Da: Dalton	RIN: número de integridad del RNA
DMSO: dimetilsulfóxido	rpm: revoluciones por minuto
dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato.	rRNA: RNA ribosómico
DSM: colección alemana de microorganismos	RT-PCR: PCR acoplada a retrotranscripción
EDTA: ácido etilendiaminotetracético	T: timina
G: guanina	Tm: temperatura de hibridación
gDNA : DNA total o genómico	tRNA: RNA transferente
HPLC: cromatografía líquida de alta eficiencia	U: uracilo
Hyg: higromicina	
Kan: Kanamicina	

Resumen

Streptomyces clavuligerus es un actinomiceto productor de una amplia variedad de metabolitos secundarios, como el ácido clavulánico, un inhibidor de β -lactamasas de gran interés industrial, el antibiótico β -lactámico cefamicina C y la holomicina, un antibiótico de amplio espectro de naturaleza pirrotínica descrito como antitumoral.

En el **Capítulo I de Resultados** se realiza un estudio del papel regulador del gen *ccaR*, que controla positivamente la producción de cefamicina C y de ácido clavulánico. Los genes biosintéticos de cefamicina C y de ácido clavulánico se encuentran contiguos en el genoma formando una superagrupación de 60 Kb. En la agrupación de cefamicina C se localiza el gen *ccaR*. El objetivo del trabajo fue el análisis transcriptómico diferencial mediante micromatrices entre la cepa silvestre y un mutante deleciónado en *ccaR*. Los resultados obtenidos muestran niveles de expresión menores en la cepa *S. clavuligerus* Δ *ccaR::tsr* que en la parental de los genes biosintéticos para cefamicina C y ácido clavulánico. En cambio, los genes de biosíntesis de holomicina se encuentran sobrexpresados en la cepa deleciónada en *ccaR*. Globalmente, se observa una menor expresión de los genes de arginina o de los genes implicados en el metabolismo del nitrógeno. Además, existe una expresión diferencial entre ambas cepas en diversos reguladores pleiotrópicos y sistemas de dos componentes.

La secuenciación del genoma de *S. clavuligerus* ha revelado que es un potencial productor de hasta 48 metabolitos secundarios y que posee una compleja organización genómica. Así, además de contar con un cromosoma lineal de 6,7 Mb en el que se localizan las agrupaciones de genes encargadas de la biosíntesis de ácido clavulánico, cefamicina C y holomicina, *S. clavuligerus* posee tres pequeños plásmidos lineales (pSLC1, pSLC2 y pSLC3, de 10.5, 149.4 y 444.2 kb respectivamente) y un megaplásmido lineal (pSCL4 de 1.8 Mb). En pSCL4 se encuentran localizadas 25 de las 48 posibles agrupaciones génicas de metabolitos secundarios descritas.

Estudios transcripcionales mediante micromatrices de la cepa *S. clavuligerus* *oppA2::aph* (Lorenzana y col., 2004) realizados en paralelo con los realizados con la cepa *S. clavuligerus* Δ *ccaR::tsr* revelaron la presencia de un bajo número de copias del meplásmido pSCL1, pSCL2 y pSCL4 en el mutante interrumpido en *oppA2*. En el **Capítulo II de Resultados** de la presente tesis doctoral se construye el mutante *S. clavuligerus* Δ *oppA2::acc* pSCL4⁺, caracterizando el papel del gen *oppA2*. Otro de los objetivos del trabajo realizado fue la eliminación mediante técnicas moleculares del megaplásmido pSCL4 para demostrar si es prescindible y analizar la capacidad de *S. clavuligerus* para crecer en condiciones experimentales con un genoma reducido una cuarta parte. El análisis funcional de esta cepa curada ha aportado valiosa información sobre la influencia de pSCL4 en el crecimiento, morfología y la producción de metabolitos secundarios cuyas agrupaciones génicas se ubican en el resto del genoma. Como resultado inicial, se ha observado que la producción de holomicina aumenta

fuertemente en la cepa curada *S.clavuligerus* pSCL4^r respecto de la cepa parental. Este hecho abre un gran abanico de posibilidades en cuanto a la posible activación de agrupaciones “crípticas” o silenciadas en el cromosoma y la caracterización de los nuevos metabolitos que se produzcan.

La homología de algunas agrupaciones biosintéticas previamente estudiadas en otras especies de *Streptomyces* sugieren que *S. clavuligerus* podrían producir metabolitos secundarios como la estaurosporina, moenomicina o indigoidina. Sin embargo, la mayoría de estos compuestos no han sido detectados en cultivos de *S. clavuligerus*, lo que sugiere que estas agrupaciones están silenciadas y sólo se expresan en respuesta a señales nutricionales o fisiológicas específicas.

El análisis bioinformático de los genomas secuenciados de algunos actinomicetos como *Streptomyces flavogriseus* ATCC 33331 y *Saccharomonospora viridis* DSM 43017 ha revelado la presencia de la agrupación biosintética de ácido clavulánico en el genoma de ambas especies. En el **Capítulo III de Resultados** se analiza la organización de esta agrupación biosintética. En el caso de *S. flavogriseus*, la agrupación de ácido clavulánico es críptica, puesto que esta cepa no produce ácido clavulánico, expresando sólo parte de los genes que componen la agrupación. La utilización de esta cepa como hospedadora ha permitido llevar a cabo la expresión heteróloga de los genes para ácido clavulánico de *S. clavuligerus*, observándose una regulación cruzada por parte del regulador CcaR del propio *S. flavogriseus*.

En el **Capítulo IV de Resultados**, se describe como *S. clavuligerus* es capaz de producir naringenina, un importante flavonoide descrito como antioxidante, anti-inflamatorio e inmunomodulador. La naringenina es producida naturalmente a partir de cítricos, especialmente del pomelo, y el estudio de su biosíntesis ha sido principalmente llevada a cabo en plantas. Sin embargo, la producción de naringenina nunca había sido descrita en procariotas. Una vez confirmada la presencia de naringenina mediante HPLC-MS, se procedió a la identificación de los genes implicados en la biosíntesis en el genoma de *S. clavuligerus*. El análisis funcional de distintas cepas mutantes elaboradas ha confirmado que tres genes que codifican una chalcona sintasa (SCLAV_5492), un citocromo P-450 (SCLAV_5491) y una histidina amonio liasa (SCLAV_5457) están implicados en la biosíntesis de naringenina. Además, se ha realizado una primera aproximación para la optimización de las condiciones de cultivo y la suplementación de precursores biosintéticos en la mejora de la producción de este flavonoide.

1. Introducción

1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GÉNERO *Streptomyces*

1.1.1 LOS ACTINOMICETOS: TAXONOMÍA Y FILOGENIA DEL GRUPO

El género *Streptomyces*, en el que se clasifica la especie que se estudia en la presente tesis doctoral, está incluido taxonómicamente dentro del grupo de los actinomicetos. Este grupo incluye una amplia diversidad de microorganismos Gram-positivos, con un alto contenido en G+C en su genoma. Esta peculiaridad genética puede ser interpretada como una respuesta adaptativa que favorece el uso de codones que resultan extraños para determinados bacteriófagos (Chater y Chandra, 2006). Sin embargo, las importantes diferencias a nivel morfológico, fisiológico y de su ecología lo hacen un grupo extremadamente heterogéneo. Así, podemos encontrar desde especies con una sencilla organización celular como cocos simples (*Micrococcus*) hasta especies con un ciclo biológico con una alta complejidad estructural (*Streptomyces*). La versatilidad de hábitat de los microorganismos de este grupo es notable; existen patógenos de animales y plantas (*Mycobacterium*), microorganismos que habitan en el medio terrestre o acuático (*Streptomyces*), fijadores de nitrógeno en simbiosis con organismos superiores (*Frankia* spp.) o microorganismos que forman parte de la microbiota bacteriana intestinal (*Bifidobacterium* spp.) (Ventura y col., 2007). Más del 80% de los antibióticos y otros metabolitos secundarios descritos han sido aislados a partir de cepas del grupo de los actinomicetos, lo cual justifica su amplio estudio y conocimiento (Hopwood, 2007).

Todas estas diferencias fenotípicas se ven reflejadas en la versatilidad de su organización genómica. El tamaño genómico de las especies secuenciadas oscila en un rango de entre 0,93 Mb (*Trophoery mawhipplei*) y 12 Mb (*Streptomyces bingchenggensis*). Al igual que el tamaño del genoma, la estructura genómica en los actinomicetos también es muy variada, existiendo cromosomas circulares y lineales. Especies de cuatro géneros del grupo presentan cromosomas lineales: *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Gordonibacter* y *Kineococcus* (Gao y Gupta, 2012).

Estudios recientes en los que se comparan los genomas secuenciados de distintos actinomicetos muestran una relación entre el tamaño del genoma, el hábitat y el número de agrupaciones para metabolitos secundarios presentes en su genoma. Así, los microorganismos patógenos presentan genomas más pequeños con un bajo número de agrupaciones para metabolitos en comparación con los microorganismos del suelo, que presentan los genomas de mayor tamaño y un gran número de agrupaciones para metabolismo secundario (Doroghazi y Metcalf, 2013).

A lo largo del tiempo, diferentes herramientas taxonómicas (bioquímica, ecología, morfología, secuenciación de RNA ribosómico, etc) y actualmente la secuenciación completa del genoma, han sido empleadas para clasificar taxonómicamente el gran número de especies del grupo de los actinomicetos.

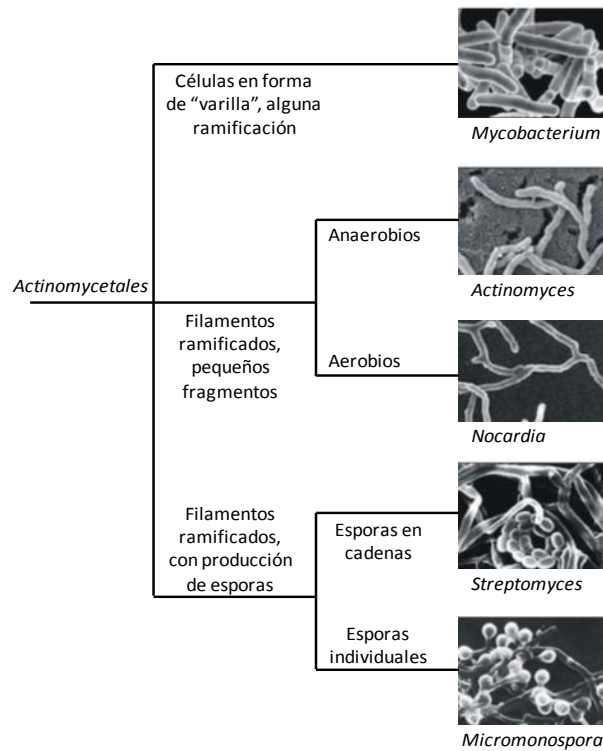


Figura 1.1. Clasificación del grupo de los actinomicetos según Waskman y Henrici basada en caracteres morfológicos (Modificado de Hopwood, 2007).

Waskman y Henrici realizaron una primera aproximación taxonómica a las actinobacterias, nombradas formalmente como actinomicetos (Waskman y Henrici, 1943). Esta clasificación organiza las especies en cinco grupos, basándose principalmente en características morfológicas. (**Figura 1.1**). En la segunda mitad del siglo XX, con el desarrollo de biología molecular y el análisis de los ácidos nucleicos fue posible emplear nuevas herramientas en la sistemática de los actinomicetos, destacando el análisis filogenético basado en las secuencias del RNA ribosómico.

La nueva edición del *Manual de Bergey de Sistemática Bacteriológica*, publicada en 2012, incluye un quinto volumen exclusivamente para los actinomicetos. La secuenciación del RNA ribosomal de las subunidades 16S y 23S y el análisis de la secuenciación completa del genoma de numerosas especies ha permitido la clasificación del taxón en 6 clases, 22 órdenes, 53 familias y 222 géneros (Ludwin W. y col., 2012 a, b) (**Figura 1.2**).

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

Dominio Bacteria,
Filo XXVI. "Actinobacteria"

Clase I. "Actinobacteria"

Orden XIV. "Streptomycetales"

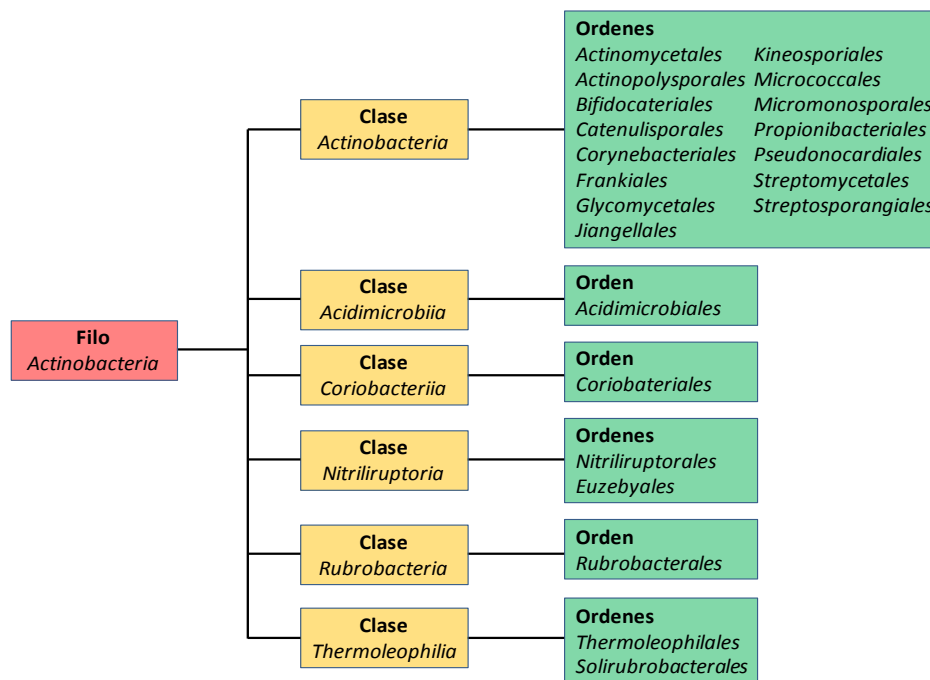
Familia I. *Streptomycetaceae*,Género I. *Streptomyces*

Figura 1.2. Clasificación taxonómica propuesta para los actinomicetos en la nueva edición del *Manual de Bergey de Sistemática Bacteriológica* (MoGao y Gupta, 2012).

Desde que se comenzaron a aislar y caracterizar compuestos con aplicación clínica o industrial en la década de los cuarenta, más de la mitad de las diez mil sustancias conocidas actualmente como compuestos bioactivos son producidos por el género *Streptomyces*, de ahí la importancia de su estudio. Un amplio número de especies pertenecen a este género, identificándose como tales en el *Manual de Bergey de Sistemática Bacteriológica* un total de 533. Sin embargo, la sistemática de *Streptomyces* resulta confusa y compleja, por lo que constantemente aparecen nuevas especies y los árboles filogenéticos son reorganizados en función de nuevos caracteres taxonómicos.

El *International Streptomyces Project* (ISP), creado en 1964, fijó los métodos y las herramientas taxonómicas necesarios para definir las especies del género *Streptomyces*, analizando fundamentalmente la morfología del micelio aéreo y sustrato, la organización de las esporas, y características fisiológicas y metabólicas. Aunque estas pruebas no fueron suficientes para la taxonomía del género, sentaron las bases para los futuros sistemas de clasificación. La aplicación de técnicas moleculares

1. Introducción

en el análisis de los genomas bacterianos han contribuido de forma significativa en la taxonomía de *Streptomyces*. La hibridación DNA-DNA, los patrones de restricción del genoma con enzimas de restricción de corte poco frecuente (RFLP, LFRFA) o el aislamiento y secuenciación de genes o fragmentos de DNA o del RNA ribosómico 16S/23S son algunas de las técnicas moleculares más empleadas (Anderson y Wellington, 2001). Sin embargo, las reconstrucciones filogenéticas basadas en el análisis clásico de la secuencia de un solo gen como el RNA ribosómico 16S no reflejan una adecuada relación filogenética, debido a los procesos de transferencia horizontal. La comparación de genomas completos junto con el análisis comparativo de genes individuales nos han acercado de una forma más fidedigna a la evolución de las distintas especies dentro del género *Streptomyces* (Alam y col., 2010).

1.1.2 BIOLOGÍA DE *Streptomyces*

Debido a la amplia diversidad de metabolismo, el género *Streptomyces* es capaz de colonizar una infinidad de hábitats, empleando una variada gama de fuentes de carbono y nitrógeno. Aunque se han descrito especies que habitan en el medio acuático (*S. maritimus*), especies patógenas de plantas (*S. scabies*) o de humanos (*S. somaliensis*) (Ward y Bora, 2006; Lambert y Loria, 1989b; Faha, 2006), su principal hábitat natural es el suelo, donde juegan un papel crucial en los ciclos de biodegradación. Para ello, durante su crecimiento, una importante variedad de enzimas extracelulares (quitinasas, celulasas, xilanasas o amilasas, principalmente) son secretadas al medio (Schrempf, 2001), de forma que se catabolizan extracelularmente los polímeros de polisacáridos (celulosa, almidón, pectina), las proteínas, los compuestos aromáticos y la lignocelulosa (Chater y col., 2010). Su presencia en el suelo ha sido el resultado de una adaptación evolutiva en cuyo éxito influyen su crecimiento micelial y la capacidad de formación de esporas, las cuales suponen un sistema efectivo de dispersión y una forma de resistencia en periodos de escasez de nutrientes y agua (Ensing, 1978; McCarthy y Williams, 1992).

1.1.2.1 Organización genómica

El cromosoma: Estructura y organización

Las especies del género *Streptomyces* poseen un cromosoma lineal con un tamaño que oscila entre 8 y 12 Mb, siendo los más grandes que se conocen dentro del grupo de las bacterias (Ventura y col., 2007). El primer cromosoma lineal descrito dentro del grupo fue el de *Streptomyces lividans* 66, determinados mediante electroforesis en campo pulsante (PFGE). Otras seis especies, entre ellas *Streptomyces coelicolor* A3(2), fueron analizadas confirmándose la linealidad cromosómica, constituyendo esta peculiaridad una característica del género (Lin y col., 1994). El cromosoma presenta en su zona central un *oriC*, como único punto de comienzo de la replicación bidireccional hacia los telómeros, en cuyos extremos aparecen regiones

invertidas repetidas (TIR; *Terminal Inverted Repeat*) de tamaño variable según la especie (entre 24 y 600 kb) y de alta inestabilidad, como veremos más adelante (Wolff y Altenbuchner, 2000; Huang y col., 1998). Mediante uniones covalentes al extremo 5' de los telómeros se asocian proteínas terminales, denominadas Tpg, altamente conservadas en tamaño y secuencia en todo el género. La función de estas proteínas es asegurar la correcta replicación de los extremos, actuando como cebadores para la síntesis del último fragmento de Okazaki, sin el consecuente acortamiento telomérico (Jakimowicz y col., 1998; Tsai y col., 2011). Además, presentan en su extremo 3' varias secuencias palindrómicas de unas 200 a 300 pb, que forman estructuras secundarias a las que también se asocia la proteína Tap (*telomeric-associated protein*), que evita la actividad degradativa de las nucleasas (Bao y Cohen, 2003).

El primer genoma publicado fue el del microorganismo modelo del género, *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Bentley y col., 2002) y seguidamente *Streptomyces avermitilis* (Ikeda y col., 2003). La secuenciación de ambos microorganismos permitió un conocimiento más amplio de la organización cromosómica, revelando la presencia de una región central o núcleo de aproximadamente 6 Mb y 2 brazos terminales de unos 2 Mb. La mayor parte de los genes esenciales, como 1) los implicados en la división celular, la replicación del DNA, la transcripción, la traducción, 2) genes para el metabolismo primario, como la biosíntesis de aminoácidos y nucleótidos, se encuentran en el núcleo cromosómico. Por el contrario, los dos brazos del cromosoma, de tamaño variable (en *S. coelicolor* 1,5 Mb y 2,3 Mb el izquierdo y derecho, respectivamente) contienen genes no esenciales para la supervivencia en condiciones de laboratorio, como agrupaciones para metabolitos secundarios, enzimas extracelulares hidrolíticas u otros operones conservados relacionados con respuestas adaptativas (Bentley y col., 2002).

La comparación entre cromosomas del género *Streptomyces* y de otros grupos de actinomicetos como *Mycobacterium tuberculosis* muestra una elevada sintenia entre el núcleo cromosómico conservado de *Streptomyces* y el cromosoma circular del micoplasma (Bentley y col., 2002). Este hecho ha permitido hipotetizar sobre el origen evolutivo común de los actinomicetos, todos ellos con un cromosoma circular de aproximadamente 4 Mb. El grupo de los estreptomicetos divergiría desarrollando un cromosoma lineal como resultado de una activa recombinación homóloga, transposición y procesos de translocación con plásmidos (Wolff y Altenbuchner, 2000). Además, varias evidencias indirectas refuerzan el modelo de linealización cromosómica en *Streptomyces*: 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, o la presencia en las zonas teloméricas de alta densidad de elementos transponibles y secuencias con genes funcionales en plásmidos (Chen y col., 2002).

1. Introducción

Elementos extracromosomales

La mayoría de las especies de *Streptomyces* contienen plásmidos lineales o circulares, con un contenido en G+C similar al del cromosoma, y cuyo tamaño oscila entre 10 kb y 1,8 Mb (Kieser y col., 2000; Medema y col., 2010). Estos plásmidos poseen autonomía replicativa, con su propio origen de replicación (*oriC*) que es reconocido por la propia maquinaria de replicación plasmídica, y en la mayoría de los casos presentan mecanismos que les permiten la conjugación intra e interespecífica (Kieser y col., 2000). En el caso de los plásmidos lineales, estos se replican de forma similar al cromosoma asociándose en sus extremos con proteínas análogas a las Tpg cromosómicas, interactuando las de uno y otro extremo del plásmido y confiriéndole una estructura circular superenrollada (Tsai y col., 2010). 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 gran plásmido lineal SCP1 de *Streptomyces coelicolor* (Peng y col., 2013).

Tanto los plásmidos circulares como los lineales son generalmente conjugativos, pero raramente portan genes que confieren resistencia a compuestos tóxicos o cualquier otra ventaja selectiva (Hopwood y Kieser, 1993). Algunos de ellos contienen una o varias agrupaciones de genes para la biosíntesis de metabolitos secundarios, como SCP1 (Kirby y Hopwood., 1977), pSV1 (Aguilar y Hopwood, 1982), pSLA2-L (Mochizuki y col., 2003) o pSCL4 (Medema y col., 2010).

El interés por *Streptomyces* a nivel industrial, unido al desarrollo de potentes herramientas para la secuenciación de genomas como la pirosecuenciación, ha permitido la publicación del genoma completo hasta la actualidad de un alto número de especies del género. Según la base de datos GOLD (*Genomes Online Database*), en 2014 existen aproximadamente unas 122 especies del género *Streptomyces* secuenciadas o en proceso de secuenciación. Un claro ejemplo del interés de la secuenciación de los genomas de las especies con aplicación industrial es el de *Streptomyces clavuligerus*, objeto de estudio en la presente tesis doctoral, cuya secuencia ha sido obtenida y publicada por tres grupos de investigación distintos (*Broad Institute*; Song y col., 2010; Medema y col., 2010).

1.1.2.2 Ciclo de vida de *Streptomyces*

Tradicionalmente, se ha considerado a los *Streptomyces* como microorganismos aerobios estrictos. Sin embargo, la secuenciación completa del genoma del microorganismo modelo del género, *S. coelicolor*, ha revelado que es capaz de codificar proteínas implicadas en la respiración de nitrato (Van Keulen y col., 2005a; Fisher y col., 2010). Experimentalmente ha sido demostrada la respiración de nitrato por algunas especies, e incluso el crecimiento de *S. coelicolor* en condiciones anaerobias (Kumon y col., 2002; Van Keulen y col., 2007). Este hecho puede explicarse

como un fenómeno adaptativo de estas especies a su hábitat en los suelos, donde las condiciones oxigénicas no son constantes, pudiendo desaparecer el oxígeno estacionalmente en las épocas de lluvia por encharcamiento.

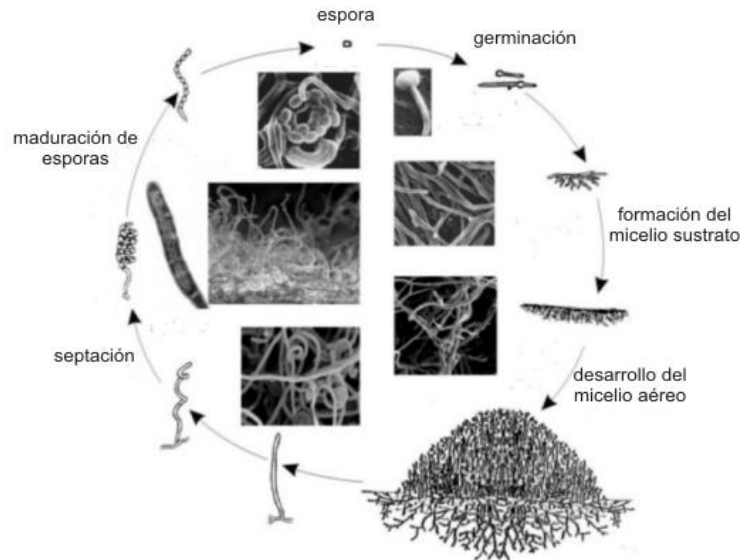


Figura 1.3. Ciclo de vida de *Streptomyces coelicolor*.

Las especies de *Streptomyces* poseen un ciclo de vida complejo, a lo largo del cual se observan estructuras diferenciadas. Este proceso de diferenciación ha sido estudiado ampliamente en medio sólido, debido principalmente a que en cultivos líquidos la mayoría de las cepas no son capaces de esporular (**Figura 1.3**).

Cuando las condiciones del medio son favorables se produce la germinación de la espora. La energía para esta fase inicial se obtiene a partir de la degradación de trehalosa, carbohidrato mayoritario de la espora (Hirsch y Ensing, 1978; Ensing, 1978). El crecimiento del tubo germinativo a partir de la espora da lugar a un entramado de hifas ramificadas multigenómicas y escasamente septadas que penetran en el sustrato de donde obtienen los nutrientes que transforman eficientemente en biomasa micelial. A este entramado de micelio ramificado que crece de forma casi exponencial se denomina micelio sustrato o vegetativo (Allan y Prosser, 1983; Chater y Losick, 1997). Siguiendo a la formación de este micelio sustrato, cuando las condiciones nutricionales son más restrictivas, comienzan a formarse hifas menos ramificadas que crecen elevándose hacia el aire, dando lugar al micelio aéreo o reproductivo. El desarrollo de este micelio aéreo se forma en parte, gracias a los nutrientes procedentes de la lisis del micelio sustrato (Mendez y col., 1985). Una vez que finaliza la elongación del micelio aéreo multinucleado, se desarrollan sincrónicamente septos, creándose compartimentos unigenómicos que dan lugar a las esporas individuales, las cuales están cubiertas de una capa hidrófoba gruesa (Chater and Losick, 1997).

1. Introducción

Estudios en transcriptómica y proteómica en los últimos años han ahondado en el desarrollo del micelio (Manteca y col., 2008; Manteca y Sanchez, 2009). En base a estos trabajos, se sabe que a partir de la germinación de la espора se forma un micelio joven septado, denominado micelio primero (MI), que combina la presencia de células muertas y vivas debido a un proceso de muerte celular programada (Manteca y col., 2007). Los agregados que se forman de este micelio primario comienzan a morir desde el centro y es a partir de las células vivas de la periferia desde las que se genera el micelio no compartimentalizado, denominado micelio segundo (MII), precursor del micelio aéreo. Dos tipos de micelio II se han definido; el temprano con ausencia de capas hidrofóbicas en las hifas aéreas y el tardío, que presenta dicha cubierta. El micelio segundo (MII) desarrolla una segunda ronda de muerte celular programada, generando las esporas (Yagüe y col., 2013).

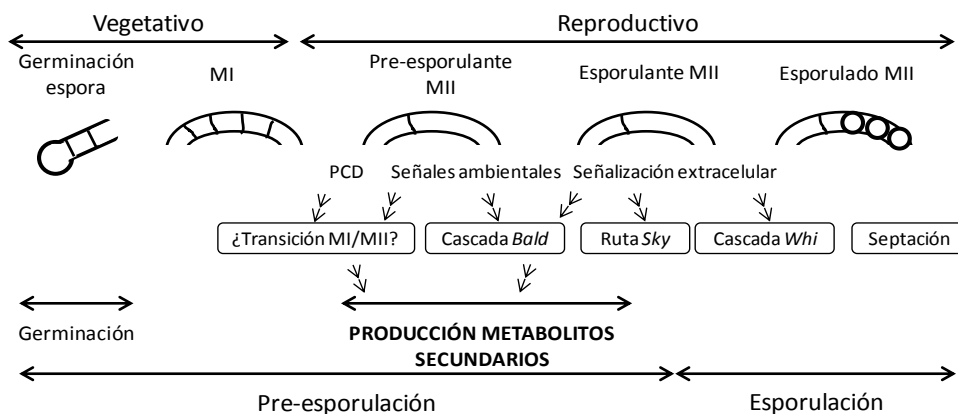


Figura 1.4. Etapas del ciclo de vida de *Streptomyces* propuesto por Manteca y Sanchez, 2009 (Modificado de Yagüe y col, 2013).

1.1.2.3 Regulación del desarrollo y diferenciación morfológica en *Streptomyces*

La diferenciación morfológica en el género *Streptomyces* está relacionada con la biosíntesis de metabolitos secundarios. En este sentido, por norma general aunque con algunas excepciones, el comienzo de la formación de micelio aéreo y la formación de esporas está asociada con la activación del metabolismo secundario. Ambos procesos se hallan gobernados y coordinados bajo un control estricto en el que se comparten importantes mecanismos de regulación (McCormick y Flärdh, 2012).

Existen dos grupos de genes que juegan un papel crucial en la diferenciación morfológica de *Streptomyces*. El primer grupo son los genes *bl*. Los mutantes nulos *bl* (del inglés "bald", calvo) presentan un fenotipo cuya característica principal es la ausencia de micelio aéreo. La expresión de estos genes, la mayoría de los cuales codifican factores sigma o reguladores transcripcionales (Chater y Chandra, 2006), da

lugar a una cascada de señales extracelulares que culmina con la biosíntesis de SapB, un péptido hidrófobo con actividad surfactante que permite la elevación de las hifas en el aire, generando el micelio aéreo (Willey y col., 1993; Willey y col., 2006; Capstick y col., 2007). Además de este pequeño péptido hidrófobo, existen otras proteínas estructurales que confieren hidrofobicidad al micelio aéreo y las esporas, como son las chaplinas (Chp) y las rodlinas (Rdl). La cubierta fibrosa que se genera por el entramado de todas estas proteínas estructurales recuerdan a la que se desarrolla en los hongos filamentosos (Claessen y col., 2006).

El segundo grupo de genes con transcendencia en la diferenciación morfológica son los genes *whi*. Estos genes son proteínas reguladoras de distintas clases con dominios de unión a DNA, que controlan las etapas relacionadas con la formación de las esporas a partir del micelio aéreo. Se denominan así porque se descubrieron en mutantes blancos "*white*", color característico de colonias con micelio aéreo pero no esporuladas (Chater, 2001). Se han identificado al menos ocho genes *whi*, que actúan conjuntamente con otras proteínas. Podemos destacar MreB, que en *S. coelicolor* asegura el correcto ensamblaje de la pared celular de la espora (Flärdh y Buttner, 2009) o SsgA, relacionada con la localización del septo, la síntesis y el engrosamiento de la pared de la espora y su separación autolítica (Traag y Van Wezel, 2008; Xu y col., 2009). El gen *sigF*, codifica el factor sigma σ^F implicado en la esporulación. Así, mutantes *sigF* resultan defectuosos en la maduración de esporas, escasa condensación del material genómico y pigmentación de las esporas (Potúckorá y col., 1995). ParAB y FtsZ juegan un papel crucial en la correcta segregación de los genomas durante la septación del micelio aéreo para formar las esporas unignómicas (Flärdh y Buttner, 2009).

Existen moléculas de señalización química que están implicadas en el proceso de diferenciación morfológica y de la activación del metabolismo secundario: las γ -butirolactonas. Estas moléculas son consideradas como hormonas bacterianas en procesos de *quorum sensing* desempeñando su función a muy baja concentración, uniéndose a receptores específicos que actúan como reguladores transcripcionales (Takano, 2006). La interacción de la butirolactona con su receptor induce un cambio conformacional del mismo, impidiendo su unión a los promotores diana en secuencias consenso denominadas ARE (*autorregulatory elements*) (Natsume y col., 2004; Folcher y col., 2001). Estos receptores son represores transcripcionales, de manera que la presencia de estas butirolactonas permiten la transcripción de los genes cuyas zonas promotoras se encontraban asociadas al represor transcripcional. El factor A de *S. griseus* es la γ -butirolactona mejor conocida hasta el momento desde su descubrimiento en la década de los sesenta (Khokholov y col., 1967), siendo estudiado su efecto pleiotrópico en la diferenciación y producción de antibióticos ampliamente por varios autores (Chater y Horinouchi, 2003; Ohnishi y col., 2005). El factor A se sintetiza y acumula a medida que se produce el crecimiento bacteriano, siendo

1. Introducción

dependiente de la disponibilidad de sus precursores originados en la glucólisis y síntesis de ácidos grasos. Estos procesos dominan durante la fase exponencial de crecimiento, de manera que el aumento en la concentración del factor A es proporcional al incremento de la densidad celular. Cuando esta butirolactona alcanza su concentración crítica (100 nM), se produce su unión al receptor citoplásmico ArpA, impidiendo la represión transcripcional que ArpA ejerce sobre el gen *adpA* (Ohnishi y col., 1999). En este momento el gen *adpA* es transcrito por la RNA polimerasa, lo que a su vez provoca la activación del conjunto de genes controlados por AdpA (**Figura 1.5**).

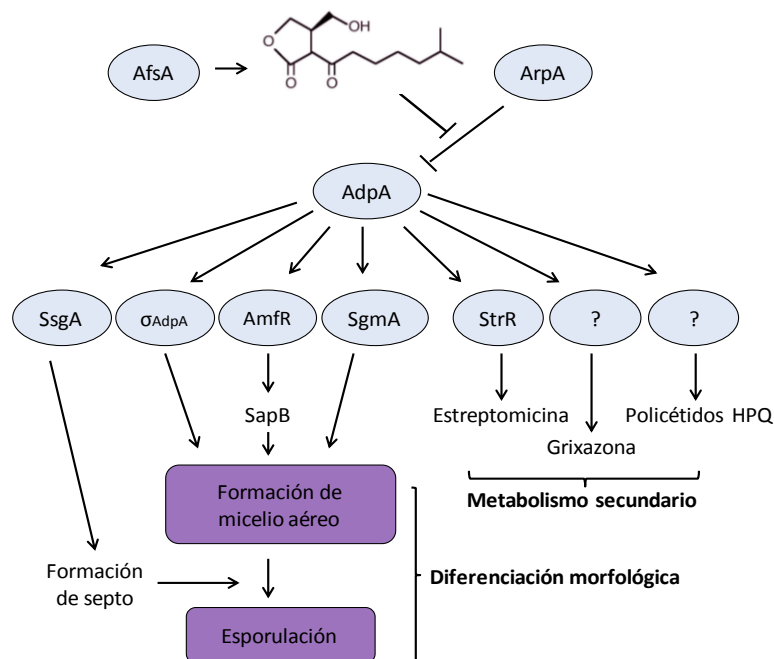


Figura 1.5. Papel de AdpA en la diferenciación morfológica y metabolismo secundario en *Streptomyces griseus* (Modificado de Flärdh y Buttner, 2009).

Por tanto, el factor A induce la expresión de AdpA, un regulador pleiotrópico que actúa como activador transcripcional de un número considerable de genes entre los que destacan genes implicados en la diferenciación morfológica y como veremos más adelante, en la producción de metabolitos secundarios (Hara y col., 2009; Higo y col., 2012). Estudios transcripcionales mediante micromatrices en *Streptomyces lividans* indican que esta regulación puede producirse también sobre el metabolismo primario, mediante la unión directa a las regiones promotoras de los genes sobre los que ejerce su control (Guyet y col., 2014). AdpA activa la expresión de genes implicados en el desarrollo de micelio aéreo, como el factor sigma *adsA* (Yamazaki y col., 2000) o *amfR*, un activador del regulón *amfTSBA*, que codifica la biosíntesis del péptido AmfS, de función similar a la de SapB en *S. coelicolor* (Yamazaki y col., 2003b; Ueda y col., 2005).

También SgmA, una metalopeptidasa extracelular que degrada el micelio sustrato para la reutilización de aminoácidos en la formación del micelio aéreo, es sintetizada por activación de AdpA (Kato y col., 2005a; Tomono y col., 2005b). En cuanto a la formación de esporas, AdpA activa la expresión de *ssgA*, de función anteriormente indicada (Jiang y Kendrick, 2000; Yamazaki y col., 2003a).

Recientemente, Wolanski y colaboradores han demostrado la gran versatilidad del regulador AdpA, el cual está implicado en la regulación de la replicación del cromosoma en *S. coelicolor* en función del balance energético de la célula. Sus estudios confirman la unión de AdpA a cajas específicas en el *oriC* cromosómico, compitiendo en la unión a este sitio con la proteína DnaA, proteína implicada en la activación del inicio de la replicación del DNA. La afinidad por la unión de AdpA o DnaA a *oriC* se basa en una regulación ATP-dependiente. De esta manera, la presencia de ATP en la célula disminuye la afinidad de AdpA por unirse a *oriC*, favoreciendo la unión de DnaA y en consecuencia, la replicación cromosómica. Sin embargo, bajos niveles de ATP aumentan la afinidad de AdpA con *oriC*, anulando el complejo DnaA-*oriC* y disminuyendo la tasa de transcripción (Wolanski y col., 2012; Speck y Messer, 2001; Majka y col., 1999). Estos resultados evidencian la relación del papel modulador de AdpA en la replicación cromosómica con la diferenciación morfológica y el metabolismo secundario. Así, durante el desarrollo del micelio vegetativo, cuando hay disponibilidad de nutrientes y la expresión de *adpA* es nula (Wolanski y col., 2011b), DnaA está asociada a *oriC* dándose una tasa de replicación cromosómica elevada. Sin embargo, cuando las condiciones nutricionales escasean (disminución de ATP intracelular) y aumenta la expresión de *adpA*, comienza a desarrollarse el micelio aéreo y la esporulación. En este momento, la tasa de replicación cromosómica disminuye, por interacción AdpA-*oriC*.

1.1.3 METABOLISMO SECUNDARIO

Durante el ciclo biológico de *Streptomyces* diferenciamos dos tipos de metabolismo, el primario y el secundario. Podemos definir el metabolismo primario como el conjunto de reacciones anabólicas y catabólicas que tienen lugar en la célula para asegurar el mantenimiento de los procesos vitales, y que resulta en el incremento de la biomasa total (Turner, 1973).

El metabolismo secundario se ha definido como el conjunto de reacciones bioquímicas implicadas en la biosíntesis de compuestos que, sin ser imprescindibles para los organismos que los producen en condiciones experimentales, les confieren ventajas ecológicas en su hábitat natural (Challis y Hopwood, 2003). Los metabolitos secundarios, tienen una gran aplicación industrial como antibióticos (antibacterianos y antifúngicos), antivirales, agentes antitumorales, insecticidas, pigmentos, inmunomoduladores, estimuladores del crecimiento vegetal, herbicidas y una gran

1. Introducción

variedad de otros compuestos bioactivos (**Tabla 1.1**) (Davies, 2007; Yim y col., 2007; Demain, 2009). Aunque el efecto antibiótico en clínica y en el laboratorio de gran parte de estos metabolitos no es puesto en duda, en la naturaleza existen pocos casos en los que dicho efecto haya sido demostrado (Turpin y col., 1992). En la naturaleza la concentración de los metabolitos secundarios es baja, pudiendo basar su función en la modulación trascricional o señales interespecíficas dentro de la compleja microbiota del suelo (Linares y col., 2006; Yim y col., 2007).

Metabolito	Microorganismo productor	Mecanismo de acción Diana	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
Bioalafos	<i>S. hygroscopicus</i>	Metabolismo del nitrógeno	Herbicida
Bleomicina	<i>S. verticillus</i>	Replicación DNA	Antitumoral
Candidina	<i>S. griseus</i>	Esteroles de membrana	Antifúngico
Cefamicina C	<i>S. clavuligerus</i>	Pared celular bacteriana	Antibacteriano
Clavulánico, ac	<i>S. clavuligerus</i>	Inhibidor de beta-lactamasas	Antibacteriano
Cloranfenicol	<i>S. venezuelae</i>	Ribosomas bacterianos	Antibacteriano
Estreptomicina	<i>S. griseus</i>	Ribosomas bacterianos	Antibacteriano
Kanamicina	<i>S. kanamyceticus</i>	Ribosomas bacterianos	Antibacteriano
Mitomicina C	<i>S. castiposus</i>	Replicación DNA	Antitumoral
Monensina	<i>S. cinnamomensis</i>	Membranas celulares	Crecimiento de animales
Nistatina	<i>S. noursei</i>	Esteroles de membrana	Antifúngico
Novobiocina	<i>S. niveus</i>	Replicación DNA	Antibacteriano
Pimaricina	<i>S. natalensis</i>	Esteroles de membrana	Antifúngico
Rapamicina	<i>S. hygroscopicus</i>	Linfocitos	Inmunosupresión
Tacrolimus	<i>S. tsukubaensis</i>	Linfocitos	Inmunosupresión
Tetraciclina	<i>S. aureofaciens</i>	Ribosomas bacterianos	Antibacteriano

Tabla 1.1. Metabolitos secundarios producidos por especies del género *Streptomyces*. (Modificada de Hopwood, 2007).

Todos los metabolitos secundarios comparten una serie de características comunes, que permiten considerarlos como tal. Se trata de compuestos que, al menos en condiciones experimentales, no son esenciales para la supervivencia del microorganismo productor, y generalmente son específicos de cada cepa. Presentan una amplia variedad de estructuras químicas como los macrólidos, beta-lactámicos, aminoglicósidos, oligopéptidos, quinonas, oligopéptidos, tetraciclinas, poliéteres o nucleósidos, con mecanismos de acción dispares, y su producción coincide con la entrada en fase estacionaria de crecimiento, empleando para su síntesis metabolitos

primarios o intermediarios de estos, por medio de rutas biosintéticas específicas (Olano y col., 2008; Gunnarsson y col., 2004b).

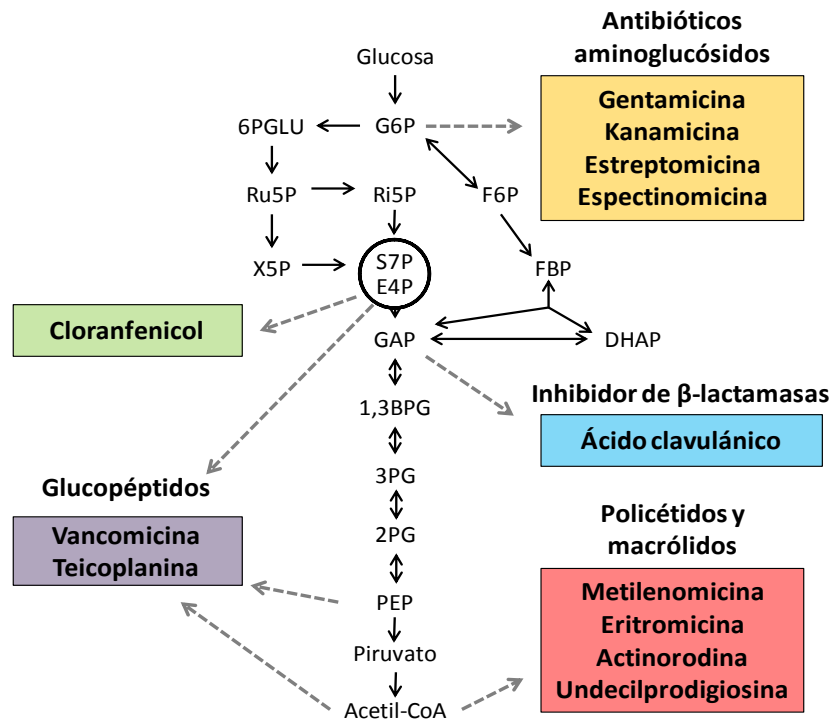


Figura 1.6. Relación entre el metabolismo primario y algunos de los precursores de los antibióticos producidos en *Streptomyces* (Modificado de Dyson, 2011).

Puesto que los precursores de los metabolitos secundarios proceden del metabolismo primario (**Figura 1.6**), no resulta extraño pensar que cambios en el metabolismo primario afecten subsecuentemente a la biosíntesis de estos metabolitos. La interconexión entre metabolismo primario y secundario ha sido descrita con numerosos paradigmas. Entre ellos destacamos la producción de ácido clavulánico en nuestra especie de estudio, *S. clavuligerus*, que puede mejorarse mediante la delección del gen *gap1* (**Figura 1.6**). La gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, codificada por *gap1* cataliza la transformación del gliceraldehído-3-fosfato (GAP) en 1,3 bisfosfoglicerato (1,3BPG). 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 que codifican las enzimas que catalizan la biosíntesis de estos compuestos aparecen contiguos en el genoma formando agrupaciones génicas o

1. Introducción

"clusters". En estas agrupaciones también se localizan frecuentemente genes que codifican proteínas implicadas en el transporte del metabolito, genes de resistencia del microorganismo productor y regulación de la expresión. La expresión de estos genes biosintéticos está sujeta a mecanismos de regulación de carácter general y otros más específicos, coordinados con el metabolismo primario (Martín y Demain, 1980; Challis y Hopwood, 2003; Bibb, 2005).

1.1.3.1 Regulación del metabolismo secundario

Mientras que el metabolismo primario predomina durante la fase exponencial de crecimiento de un microorganismo, el metabolismo secundario es el que toma mayor relevancia durante la fase estacionaria de crecimiento (Granozzi y col., 1990; Novotna y col., 2003), iniciándose la producción de metabolitos secundarios en la transición entre ambas fases (de Sol y col., 2003). En esta etapa de transición comienza la diferenciación morfológica del microorganismo, por lo que los procesos de diferenciación bioquímica y morfológica se encuentran íntimamente relacionados (Martín y Liras, 1989), coordinados por una regulación estrecha por un conjunto de genes que modulan ambos procesos (Chater y Horinouchi, 2003).

En *Streptomyces*, el control de la producción de metabolitos se basa principalmente en una regulación transcripcional, aunque también se conocen mecanismos de regulación traduccional y postraduccional. Cada una de las agrupaciones biosintéticas para metabolitos secundarios están sometidas a una regulación específica, mediante el control de los reguladores específicos de ruta, presentes en la propia agrupación (Bibb, 1996). A su vez, la producción de varios o todos los metabolitos está coordinada por reguladores globales o pleiotrópicos. Estos reguladores a su vez pueden coordinar la producción de metabolitos y la diferenciación morfológica (Huang y col., 2005). El sistema de autorreguladores, como las gamma-butirolactonas, implicadas en la diferenciación morfológica (*ver epígrafe 1.1.2.3*) también juegan un papel importante en la regulación del metabolismo secundario.

Tradicionalmente, la regulación del metabolismo secundario se planteaba como un sistema jerárquico, en el que los reguladores específicos de ruta ocupaban un nivel inferior, controlando exclusivamente al propio metabolito de la agrupación biosintética, y un nivel superior donde los reguladores pleiotrópicos controlan a los primeros. Sin embargo, aunque este principio se mantiene en la mayoría de los casos, dentro de la compleja red reguladora del metabolismo secundario existen un nutrido número de excepciones que nos deben hacer tener cierta cautela en lo relativo a los términos "específico" y "global". Así, a medida se conoce más sobre la compleja regulación en el género, el modelo de red cruzada va tomando más peso que el modelo jerárquico clásico (Sawai y col., 2004; Huang y col., 2001).

1.1.3.1.1. Reguladores específicos de ruta

Como se ha mencionado con anterioridad, en las agrupaciones génicas responsables de la biosíntesis de metabolitos secundarios, es frecuente que se ubiquen uno o varios genes reguladores. Generalmente, estos reguladores de bajo peso molecular (aproximadamente 25 kDa) modulan a nivel transcripcional, activando directamente la expresión de los genes biosintéticos de la agrupación de la que se encuentran formando parte (Bibb, 1996).

La mayoría de estos pequeños reguladores específicos de ruta pertenecen a la familia SARP (del inglés *Streptomyces Antibiotic Regulatory Proteins*). Los reguladores tipo SARP contienen cerca del extremo N-terminal, un dominio de unión al DNA tipo hélice-giro-hélice (H-T-H) (Wietzorrek and Bibb, 1997) y próximo a él, otro dominio de activación transcripcional bacteriano BTAD (del inglés *Bacterial Transcriptional Activation Domain*). En *S. coelicolor*, los reguladores tipo SARP son ActII-ORF4, CdaR y RedD, que regulan la producción de actinorrodina, el antibiótico dependiente de calcio (CDA) y la undecilprodigiosina, respectivamente (Fernández-Moreno y col., 1991; Takano y col., 1992; Chouayekh y Virolle, 2002; Ryding y col., 2002). *S. clavuligerus*, como se explicará más adelante, presenta en la agrupación de cefamicina C el gen *ccaR*, que controla positivamente la producción de este metabolito y la del ácido clavulánico (Pérez-Llanera y col., 1997). Otro regulador tipo SARP, StrR, controla la producción de estreptomicina en *Streptomyces griseus* (Retzlaff y Distler, 1995). Estos son algunos pocos ejemplos de reguladores tipo SARP conocidos hasta el momento, cuya lista continúa incrementándose (Martín y Liras, 2010).

La eliminación de los genes que codifican reguladores específicos de ruta tipo SARP resulta en la disminución completa o parcial del metabolito secundario, consiguiendo restaurar el fenotipo silvestre mediante la complementación con el gen previamente anulado (Martín y Liras, 2012). Mediante análisis EMSA (del inglés *Electrophoretic Mobility Shift Assays*) y transcriptómico, se ha demostrado que los reguladores SARP se unen específicamente a las regiones promotoras de algunos de los operones clave en la agrupación biosintética (Sheldon y col., 2002; Santamarta y col., 2011).

Existen otros grupos de reguladores específicos de ruta, aunque son menos conocidos que los reguladores tipo SARP: son los de la familia LAL (del inglés *Large ATP-binding regulators of the LuxR class*) y los tipo LysR.

Los reguladores LAL son relativamente grandes (872-1159 aminoácidos) en comparación con los reguladores SARP (277-665 aminoácidos) (Martín y Liras, 2012). Las proteínas LAL presentan dos dominios distintos; uno de unión a nucleótidos trifosfato en el extremo amino terminal y otro de unión a DNA en la región carboxilo terminal, típico de las proteínas reguladoras LuxR. Se ha identificado una larga lista de

1. Introducción

estos reguladores implicados en la producción de distintos antibióticos en especies del género *Streptomyces*. Por citar algunos ejemplos, podemos destacar el papel de FkbN de *S. tsukubaensis* en la producción de tacrolimus (Goranovic y col., 2012; Mo y col., 2012), PikD para la pikromicina en *S. venezuelae* (Wilson y col., 2001), RapH para la rapamicina en *S. hygroscopicus* (Aparicio y col., 1996), NysRI/RIII para la nistatina en *S. noursei* (Brautaset y col., 2000) o PimM para la pimarcina en *S. natalensis* (Anton y col., 2004). Dentro de este grupo de reguladores se incluye el regulador Cvm7P de *S. clavuligerus*, que controla la producción de clavamas (Tahlan y col., 2007).

La familia de reguladores transcripcionales tipo LysR son de tamaño intermedio, entre 310-325 aminoácidos, con un dominio carboxilo terminal H-T-H de unión al DNA y un dominio bien conservado de unión a sustrato (Maddocks y Oyston, 2008). Estos reguladores frecuentemente requieren la presencia de una pequeña molécula (co-inductor) para ejercer su papel de activador transcripcional, la cual es reconocida por el dominio de unión al DNA (Henikoff y col., 1988; Schell, 1993). Algunos de los reguladores específicos de ruta de tipo LysR descritos son ClaR, localizado en la agrupación de ácido clavulánico de *S. clavuligerus* (Pérez-Redondo y col., 1998) o FkbR en la agrupación de tacrolimus, en *S. tsukubaensis* (Mo y col., 2012).

1.1.3.1.2. Reguladores globales o pleiotrópicos

Estos reguladores globales responden a una gran variedad de señales de estrés del crecimiento o nutricional, como la limitación de fosfato o nitrógeno, deficiencia de iones, presencia de N-acetilglucosamina en el medio, daño de la pared celular, choque térmico o estrés osmótico, entre otros (Martín y Liras, 2012). Los genes que codifican estos reguladores pleiotrópicos se localizan fuera de las agrupaciones biosintéticas. Su papel modulador se basa en el control sobre los reguladores específicos de ruta, sin ejercer un control directo en la transcripción de los genes biosintéticos de los metabolitos secundarios. Dentro de este grupo, podemos diferenciar entre los reguladores globales exclusivos del metabolismo secundario y aquellos que además de regular el metabolismo secundario, ejercen un papel modulador en múltiples funciones, como la diferenciación morfológica (Anderson y col., 2001). Un ejemplo de este tipo de regulador pleiotrópico implicado en el metabolismo secundario y en la diferenciación morfológica son AdpA o los genes *bld*, anteriormente comentados.

Sistemas de dos componentes

Los sistemas de dos componentes son la vía principal de señalización ambiental y fisiológica para las bacterias, jugando un papel eficaz en la transducción de señales en la célula. Estos sistemas presentan una histidin quinasa (HK, del inglés *Histidine kinase*) presente en la membrana que actúa como proteína sensora percibiendo el estímulo, y un regulador de respuesta (RR) intracelular que recibe la señal de la HK. Esta interacción HK-RR provoca un cambio conformacional en el dominio efector de RR,

permitiendo generalmente su unión a secuencias específicas de DNA, lo que produce la modulación de la expresión génica.

La secuenciación del genoma de *Streptomyces coelicolor* reveló 67 sistemas de dos componentes (HK-RR) completos, más 17 RR desapareados y 13 HK huérfanos (Bentley y col., 2002). La sucesiva secuenciación de especies del género reveló un número similar de sistemas de dos componentes en sus genomas. El porcentaje de sistemas de dos componentes en *S. coelicolor* en relación al resto de genes es aproximadamente del 0,86%, siendo un 25% superior que el resto de bacterias no patógenas de vida libre (Kim y Forst, 2001). Esta elevada proporción pone de manifiesto la capacidad del género para responder a un número grande y variado de estímulos, dado el complejo hábitat en el que se encuentra, como es el suelo (Bentley y col., 2002). Los sistemas dos componentes controlan además de distintas funciones celulares implicadas en el metabolismo primario, la producción de metabolitos secundarios.

En *Streptomyces*, consideramos el **sistema PhoR/PhoP** como modelo de control general del metabolismo primario. Este es uno de los pocos sistemas cuya señal activadora, la deficiencia de fosfato, es conocida (Sola-Landa y col., 2003; Martín, 2004). PhoR es la proteína quinasa de membrana que reconoce la deficiencia en fosfato, mientras que PhoP es el regulador de unión a DNA encargado de transducir la señal (Hutchings y col., 2004). El conjunto de genes que se encuentran bajo control de este sistema se denomina regulón *pho* (Rodríguez-García y col., 2007). Los genes de este regulón son activados o reprimidos transcripcionalmente por unión de PhoP a las cajas PHO (secuencias específicas), localizadas en sus regiones promotoras (Torriani-Gorini, 1994; Hulett, 1996; Sola-Landa y col., 2005). En el caso de los genes biosintéticos de metabolitos secundarios, sus regiones promotoras carecen de dichas cajas PHO, de forma que la regulación de este sistema se basa en un control indirecto mediado por reguladores intermediarios. La biosíntesis de diferentes clases de metabolitos secundarios se halla bajo control por fosfato, de forma que la limitación en la concentración de fosfato inorgánico en el medio activa de forma indirecta la biosíntesis de metabolitos, que a su vez limita el crecimiento bacteriano como mecanismo en cascada (Masuma y col., 1986; Martín, 1989).

El **sistema AbsA1/A2** es uno de los mejor conocidos en *S. coelicolor* (Adamidis y col., 1990). Como excepción, este sistema se encuentra localizado en la agrupación génica del CDA, ejerciendo un control sobre la producción del CDA la actinorrodina, undecilprodigiosina y metilenomicina. Los ensayos de inmunoprecipitación de DNA (ChiP, del inglés *Chromatin Immunoprecipitation*) y geles de retraso (EMSA) confirmaron que AbsA2 interacciona con los promotores de los genes *cdaR*, *redZ* y *actII-ORF4*, regulando su transcripción (Mckenzie y Nodwell, 2007).

1. Introducción

Se han identificado otros sistemas de dos componentes importantes en la regulación de la producción de metabolitos secundarios presentes en *Streptomyces*. El sistema AfsQ1/Q2 que activa la producción de antibióticos como la actinorrodina, undecilprodigiosina y CDA en *S. coelicolor*, además de acelerar la formación del micelio aéreo (Shu y col., 2009), el sistema CutRS que regula negativamente la producción de actinorrodina (Brian y col., 1996) o el sistema EcrA1/A2 que ejerce un control positivo sobre la producción de undecilprodigiosina (Li y col., 2004) son algunos de los muchos ejemplos conocidos en la literatura científica.

Sistemas de serina-treonina quinasas

La transducción de señales en bacterias también se ejecuta por mediación de proteínas típicas eucariotas como las serina-treonina quinasas (Zhang, 1996). El ejemplo mejor conocido es el del sistema AfsK-AfsR-AfsS, presente en todos los estreptomicetos, implicado en la regulación del metabolismo secundario en *S. coelicolor* y *S. lividans* (Matsumoto y col., 1994; Horinouchi, 2003). En el caso concreto de *S. coelicolor*, se ha descrito que este sistema controla positivamente la producción de actinorrodina y undecilprodigiosina, mediante el control del regulador AfsR, un regulador multidominio de 993 aminoácidos con un dominio tipo SARP en su zona N-terminal. AfsK, una de las 34 serina-treonina quinasas que aparecen en el genoma de *S. coelicolor*, es autofosforilado en respuesta a un estímulo, y a su vez afsK fosforila a AfsR (Parker y col., 2010). Seguidamente AfsR, por un mecanismo aún desconocido, activa la biosíntesis de metabolitos secundarios ante situaciones de estrés nutricional. Un ejemplo de la compleja regulación cruzada es la interacción entre los reguladores globales AfsR y PhoP en el control del metabolismo del fosfato. A su vez, el regulador PhoP interacciona modulando la expresión del regulador GlnR, implicado en el metabolismo del nitrógeno (Santos-Beneit y col., 2009; Rodríguez-García, 2009). Estudios en *S. griseus* han demostrado que este sistema también influye en la diferenciación morfológica (Umeyama y col., 2002).

Otros reguladores pleiotrópicos

DasR, es un regulador tipo GntR implicado en la conexión entre el metabolismo primario y secundario en *S. coelicolor* (Rigali y col., 2008). DasR participa principalmente en el metabolismo de la N-acetilglucosamina, un componente esencial de la pared de peptidoglicano que va acumulándose en el medio de cultivo a medida que se produce la lisis celular, siendo esta una molécula señal clave para encaminar la maquinaria celular hacia el crecimiento o la producción de antibióticos en función del crecimiento y las limitaciones nutricionales (Rigali y col., 2006, 2008). La N-acetilglucosamina interacciona una vez dentro de la célula con DasR, que se encuentra unido al DNA ejerciendo un efecto represor sobre diversos reguladores específicos de

ruta. En *S. coelicolor* DasR reprime la expresión de *actII-ORF4* y *redZ*, controlando la producción de actinorrodina y undecilprodigiosina.

1.1.3.2. Agrupaciones biosintéticas crípticas de metabolitos secundarios

Desde los años cuarenta del siglo XX, el número de metabolitos secundarios descubiertos, principalmente antibióticos, ha ido aumentando de forma gradual. El descubrimiento de los mismos se basaba en programas de búsqueda, en los que se aislaban microorganismos a partir de muestras de tierra de distintos ambientes. Los cultivos puros de las nuevas cepas identificadas permitían la extracción e identificación de nuevos compuestos bioactivos. En la década de los años setenta se identificaron la mayor parte de estos compuestos, haciéndose patente el declive en la identificación de nuevos compuestos en la década de los ochenta y noventa. Técnicas más modernas como el "*screening*" *in silico*, la biosíntesis combinatoria (Sánchez y col., 2005; Salas y Méndez., 2009), la biocatálisis combinatoria (Michels y col., 1998) y especialmente la secuenciación de los genomas han permitido la obtención de nuevos compuestos bioactivos usando como base estructural metabolitos naturales ya descritos.

Se estima que el género *Streptomyces* es potencial productor de más de 10.000 compuestos con actividad antimicrobiana, de los cuales sólo se conoce un 3% (Watve y col., 2001). El problema de las resistencias de los microorganismos patógenos a los actuales antimicrobianos hace de imperiosa necesidad el descubrimiento de nuevos fármacos.

La secuenciación completa de genomas ha revelado la presencia de un gran número de agrupaciones génicas para la biosíntesis de metabolitos secundarios en las especies del género *Streptomyces*. Sin embargo, en condiciones experimentales sólo se detecta una pequeña fracción de los potenciales metabolitos que puede expresar cada genoma. Todas estas agrupaciones biosintéticas que en el laboratorio no se expresan y se encuentran silenciadas se denominan agrupaciones "crípticas". Conocer los diversos mecanismos (señales fisiológicas y sistemas de regulación) que permitan la activación de la expresión de estas agrupaciones crípticas es una valiosa herramienta para producir nuevos compuestos (Zerikly y Challis, 2009; Ochi y Hosaka, 2013; Liu y col., 2013). Los métodos y mecanismos para la activación de agrupaciones crípticas son varios:

a) *Condiciones nutricionales y de fermentación*

Tradicionalmente, la modificación en las condiciones de fermentación como la composición del medio de cultivo (niveles de amonio, fosfato y metales), el escalado en fermentador, la temperatura o la aireación han favorecido la producción de nuevos metabolitos. Los medios complejos son más favorables que los definidos a la hora de producir metabolitos secundarios, aunque el exceso de fosfato o nitrógeno puede

1. Introducción

limitar su producción. La utilización de alofán, un hidrogel amorfo que contiene en su composición alúmina y sílice (Wada, 1979) actúa capturando el fosfato inorgánico, incrementando la producción de nanaomicina por *Streptomyces rosa* subsp. *notoensis*. Este efecto ha sido también observado en la producción de vancomicina en *Amycolatopsis orientalis* y de cefamicina en *Amycolatopsis lactamdurans* (Masuda y col., 1986; Leitao y col., 1996). Nuevas condiciones, como la adición de escandio al cultivo ejercen un efecto positivo en la producción de actinorrodina en *S. coelicolor*, actinomicina en *S. antibioticus* o estreptomina en *S. griseus* (Kawai y col., 2007). La utilización de hasta seis diferentes medios de cultivo ha permitido ver variaciones transcripcionales en genes para metabolitos secundarios en *S. flaveolus* (Qu y col., 2011).

b) Co-cultivos con otros organismos

El co-cultivo de microorganismos parece ser una herramienta útil para la activación de metabolitos crípticos. La presencia de otros microorganismos puede ser la señal que active la expresión de agrupaciones génicas crípticas, como ocurre con las complejas interacciones microbianas en los suelos (Fischbach, 2000). Así, el co-cultivo de *Streptomyces endus* con *Tsukamurella pulmonis*, que contiene ácidos micólicos, induce la producción en el primero de un nuevo antibiótico, la alchivemicina A. Cuando el ácido micólico era añadido directamente al cultivo puro de *Streptomyces*, no se observaba efecto en la producción de metabolitos, siendo imprescindible la interacción entre ambos microorganismos (Onaka y col., 2011). Charusanti y colaboradores (2012) demostraron en *S. clavuligerus* la inducción de la producción de holomicina cuando este microorganismo se co-cultivaba tras sucesivos pases con *Staphylococcus aureus* MRS (Methicillin-Resistant Strain).

c) Ingeniería ribosómica y otras estrategias relacionadas

Esta técnica se basa en el hecho de que ciertas mutaciones en los genes *rpsL* o *rpoB*, que codifican respectivamente la proteína ribosomal S12 o la subunidad β , activan la biosíntesis de metabolitos crípticos (Ochi, 2007; Hosaka y col., 2009). Experimentos en los últimos años indican que las mutaciones en *rpoB* provocan incremento en la expresión de diferentes agrupaciones, entre ellas algunas agrupaciones crípticas *Streptomyces lividans*, *Streptomyces griseus*, *S. coelicolor*, *S. mauvecolor* y *Saccharopolyspora erythrea*. Estas mutaciones provocan una mayor afinidad de la RNA polimerasa sobre los promotores de genes silenciados (Ochi and Hosaka, 2013).

d) Uso de moléculas señal o elicitores químicos

La ausencia de moléculas señal específicas como las gamma-butirolactonas puede ser un factor causante del silenciamiento de agrupaciones génicas. Estas moléculas señal, endógenas o exógenas, también conocidas como elicitores promueven a bajas concentraciones en algunos actinomicetos la producción de metabolitos secundarios y la diferenciación morfológica (Liu y col., 2013). Este es el caso de la producción de goadosporina, un péptido de 19 aminoácidos producido por *Streptomyces* sp. TP-A0584, que promueve el metabolismo secundario y la diferenciación morfológica en *Streptomyces* (Onaka y col., 2001). Una amplia gama de compuestos como el butirato sódico, ácido valproico, apicidina o el resveratrol parecen afectar activando o reprimiendo la producción de actinorrodina y undecilprodigiosina en *S. coelicolor* (Moore y col., 2012).

e) Manipulación genética de reguladores

Esta técnica se basa en la activación de agrupaciones génicas crípticas mediante la manipulación genética de los reguladores específicos y/o pleiotrópicos (Aigle y Corre, 2012). La estrategia consiste en la sobreexpresión de los activadores y/o la delección de represores (Hopwood y col., 1995). Así la amplificación del regulador *sanG* incrementa la producción de nikkomicina en *Streptomyces ansochromogenes* o la sobreexpresión de *polR* duplica la producción de polioxina en *Streptomyces cacaoi* subsp. *asoensis* (Liu y col., 2005; Li y col., 2010).

Rigali y col. (2008) demuestran como una mutación en el gen regulador *dasR* activa la expresión de una agrupación silenciosa (genes SCO6273 a SCO6288) que codifican las proteínas implicadas en la síntesis de un nuevo policétido.

f) Expresión heteróloga de agrupaciones biosintéticas

Esta técnica se basa en introducir la agrupación génica biosintética críptica de un microorganismo en una nueva cepa hospedadora, en la que se produce el metabolito. La modulación en la expresión de una agrupación en su cepa nativa puede estar reprimida por mecanismos desconocidos. Sin embargo, la cepa hospedadora puede carecer de tales sistemas de represión, permitiendo la producción del compuesto. Mediante técnicas moleculares, se han construido cepas para expresar estas agrupaciones "silenciosas", como la cepa de *S. coelicolor* M 1146, elaborada por Gómez-Escribano y Bibb (2011) y utilizada en este trabajo (ver **Tabla 3.3.1**).

1. Introducción

1.2 CARACTERÍSTICAS DE LA ESPECIE *Streptomyces clavuligerus*

Esta especie fue aislada de una muestra de suelo en América del Sur. Su nombre específico se debe a la forma de bastón que presentan sus pequeñas ramificaciones 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 (=NRRL 3585; Higgens y Kastner, 1971).

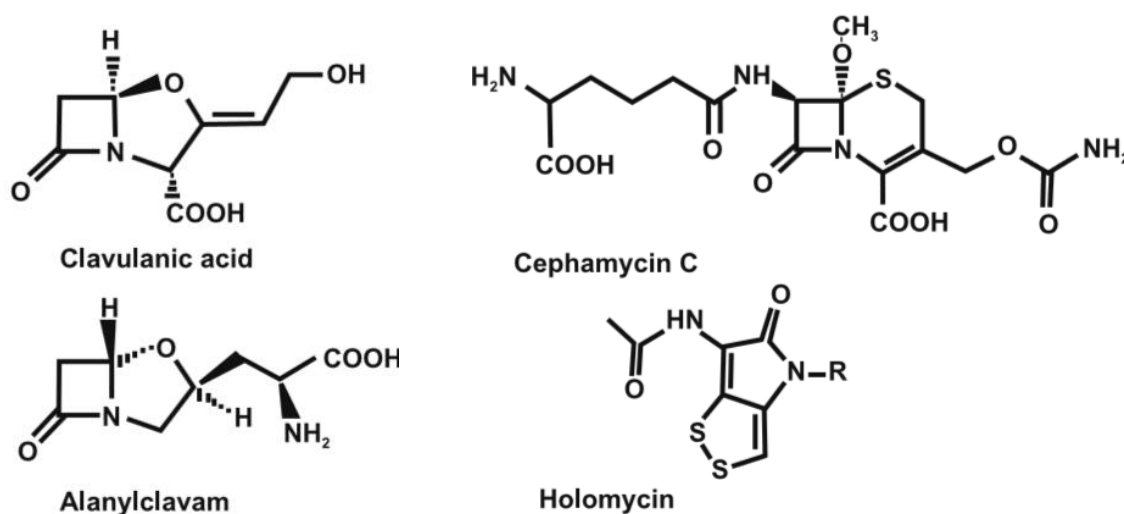


Figura 1.7. Principales metabolitos de interés industrial producidos por *S. clavuligerus* (Modificado de Liras y col., 2008).

El descubrimiento inicial de *S. clavuligerus*, fue como productor de cefamicina C, un antibiótico beta-lactámico que inhibe la biosíntesis de peptidoglicano al interactuar con las transpeptidasas de la pared celular (Nagarajan y col., 1971). Como veremos más adelante, la cefamicina C es una molécula de tipo cefalosporina, cuya biosíntesis comparte las etapas tempranas con la biosíntesis de las penicilinas, y las etapas intermedias con las de las cefalosporinas (*ver epígrafe 1.2.1.1*) (Liras y Demain, 2009). En el año 1976, durante un programa de búsqueda de microorganismos productores de inhibidores de beta-lactamasas, se descubre en la propia cepa de *S. clavuligerus* la producción de ácido clavulánico (Brown y col., 1979). Este compuesto, combinado con antibióticos beta-lactámicos como la amoxicilina (*Augmentine*) son prescritos en la mayoría de los países, de forma que resulta un producto muy rentable en la industria farmacéutica. Además de la cefamicina C y el ácido clavulánico, *S. clavuligerus* produce clavamas, una familia de compuestos con una estructura básica con anillo *clavam* similar a la del ácido clavulánico, pero con una

configuración estereoquímica distinta. Carecen de actividad inhibidora beta-lactamasa, pero algunos poseen actividad antifúngica (Brown y col., 1979) o antibacteriana. Además, se ha descrito a *S. clavuligerus* como productor de compuestos antibióticos no beta-lactámicos como la molécula MM19290, de tipo tunicamicina (Kenig y Reading, 1979).

Algunas cepas mutantes de genes biosintéticos implicados en la producción de ácido clavulánico y cefamicina C han sido descritas como productoras de holomicina, un compuesto de naturaleza pirrotínica que inhibe la síntesis de RNA, descrita como un antibiótico de amplio espectro y potente antitumoral (Kenig y Reading, 1979; Oliva y col., 2001; de la Fuente y col., 2002). La agrupación biosintética ha sido recientemente descrita y caracterizada por varios grupos de investigación, entre ellos nuestro laboratorio (ver epígrafe 1.2.1.2) (Li y Walsh, 2010; Robles-Reglero y col., 2013).

1.2.1 ORGANIZACIÓN GENÓMICA EN *S. clavuligerus*: AGRUPACIONES BIOSINTÉTICAS DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Como se ha indicado anteriormente, el gran interés industrial de *S. clavuligerus* ha hecho que varios grupos de investigación hayan trabajado en la secuenciación de su genoma (*Broad Institute*; Song y col., 2010; Medema y col., 2010). Su secuenciación ha proporcionado información valiosa sobre nuestra especie de estudio.

	<i>S. clavuligerus</i>			<i>S. coelicolor</i>
	Cromosoma	pSCL4	Total	Cromosoma
Tamaño de la secuencia (Mb)	6,76	1,796	8,556	8,668
GC%	72	72	72	72
Operones de rRNA	6	0	6	6
tRNAs	66	7	73	63
tmRNAs	1	0	1	1
ORFs	5700	1581	7281	7825
Agrupaciones metabolitos secundarios	23	25	48	20

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

Inicialmente, se consideraba que *S. clavuligerus* poseía un cromosoma de 6,7 Mb y tres plásmidos lineales: pSCL1 (10,5 kb), pSCL2 (149,4 kb) y pSCL3 (444,2 kb) (Keen y col., 1988; Wu y Roy, 1993; Netolitzky y col., 1995). La secuenciación completa de su genoma por Medema y colaboradores en 2010, ha revelado la existencia de un megaplásmido, pSCL4, con un tamaño de 1.8 Mb aproximadamente. Este megaplásmido, que supone aproximadamente un cuarto del total del genoma, es un gran reservorio de agrupaciones para metabolitos secundarios (**Tabla 1.2**). El estudio

1. Introducción

de su secuencia parece indicar ser dispensable para el crecimiento del microorganismo, al menos en condiciones experimentales, aunque puede conferirle ventajas ecológicas en su hábitat natural (Medema y col., 2010). En el cromosoma se localizan los genes esenciales del metabolismo primario, además de algunas agrupaciones para metabolitos secundarios. En el *capítulo II* de *Resultados* profundizaremos en el papel que juega pSCL4 y su importancia.

1.2.1.1 Biosíntesis de cefamicina C, ácido clavulánico y clavamas.

Las agrupaciones para la biosíntesis de cefamicina C y ácido clavulánico aparecen contiguas en el cromosoma, formando una "superagrupación" de aproximadamente 60 Kb (Ward y Hodgson, 1993) (**Figura 1.8**). Esto mismo ocurre en las especies *S. katsurahamanus* y *S. jumonjinensis*, en las que también se ha descrito la producción de ácido clavulánico y cefamicina C (Brown y col., 1976; Ward y Hodgson, 1993). Además, en el genoma de *S. clavuligerus*, concretamente en el megaplásmido pSCL4, aparece la agrupación de genes parálogos, que contiene los genes duplicados *ceaS1*, *bls1*, *pah1* y *oat1* (Jensen y col., 2004b; Tahlan y col., 2004).

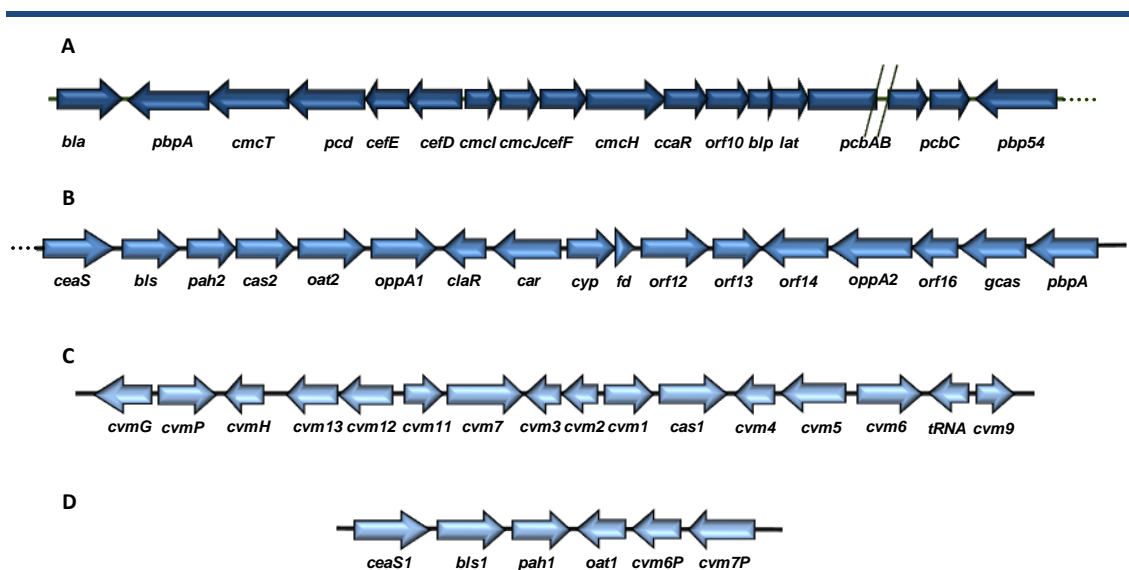


Figura 1.8. Organización de la agrupación de la cefamicina C (A), ácido clavulánico (B), la agrupación de las clavamas (C) y los genes parálogos (D).

Ruta biosintética de cefamicina C

La cefamicina C es una molécula beta-lactámica de tipo cefalosporina, con un anillo beta-lactámico, un anillo dihidrotiazínico, una cadena lateral de ácido α -aminoadípico, un grupo metoxilo en el carbono C-7, y un grupo carbamoilo en C-3 (Whitney y col., 1972) (**Figura 1.7**).

En *Streptomyces clavuligerus*, la ruta de biosíntesis de la cefamicina C consta de diez etapas, de las cuales dos (etapas tempranas) pertenecen a la ruta de biosíntesis de penicilinas, tres etapas (intermedias) son comunes en la biosíntesis de cefalosporina C, y el resto son etapas específicas de la ruta de biosíntesis de cefamicina C. Los genes que codifican estas enzimas se encuentran agrupados formando la agrupación de cefamicina C, donde también se localizan genes implicados en la regulación (*ccaR*, ver más adelante), resistencia (*pcbR*, *pbpA* o *bla*) y el transporte (*cmcT*) de este antibiótico (Liras, 1999). En la primera etapa en la biosíntesis de la cefamicina C se produce la condensación de los tres aminoácidos precursores: el ácido L- α -aminoadípico, la L-cisteína y la L-valina para formar el tripéptido lineal LLD-ACV. Esta reacción está catalizada por la enzima ACV sintetasa, una péptido-sintetasa no ribosomal codificada por el gen *pcbAB* (Yu y col., 1994). El aminoácido no proteínogénico ácido L- α -aminoadípico se obtiene a partir de la L-lisina por acción conjunta de las enzimas lisina aminotransferasa, codificada por *lat*, y piperideína-6-carboxilato deshidrogenasa, codificada por *pcd* (Kern y col., 1980; Madduri y col., 1989; de la Fuente y col., 1997). Tras una ciclación oxidativa, llevada a cabo por la actividad ACV ciclasa (isopenicilina N sintasa) codificada por el gen *pcbC*, el tripéptido lineal se convierte en isopenicilina N, el primer compuesto con núcleo β -lactámico de la vía (Jensen y col., 1990; Schwecke y col., 1992). A continuación, en la primera de las etapas intermedias, la isopenicilina N epimerasa, codificada por el gen *cefD*, modifica la cadena lateral, en configuración D, formándose la penicilina N (Usui y Yu, 1989). El anillo tiazolidínico de cinco miembros de la penicilina N, por la actividad expandasa de la proteína codificada por el gen *cefE*, se expande para formar el anillo dihidrotiazínico de seis miembros. Este anillo es característico de los antibióticos de tipo cefalosporina (Kovacevik y col., 1989; Jensen y col., 1985). La desacetoxicefalosporina C (DAOC) es el producto de esta reacción. Posteriormente, DAOC es hidroxilada en su posición C-3' para dar lugar a la desacetilcefalosporina C. Esta última enzima está codificada por el gen *cefF* (Kovacevik y Miller, 1991; Baker y col., 1991). Las últimas etapas de la ruta de biosíntesis de cefamicina C implican la introducción de un grupo metoxilo en el carbono C-7 y la carbamoilación del carbono C-3, mediante las enzimas codificadas por los genes *cmcH* y *cmcI-cmcJ* (Xiao y col., 1991; Coque y col., 1995; Enguita y col., 1996).

Ruta biosintética del ácido clavulánico y clavamas

El ácido clavulánico y otros compuestos con estructura de clavama se caracterizan por presentar un núcleo común, basado en un anillo beta-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 beta-lactamasas, a diferencia del resto de las clavamas que poseen una estructura 5S, y que carecen de esta propiedad inhibitoria. El resto de las

1. Introducción

clavamas, con estereoquímica 5S presentan en C2 una amplia variedad de cadenas laterales, dando lugar a diferentes compuestos biológicamente activos, algunos de ellos con propiedades antifúngicas (Jensen, 2012). Las cuatro clavamas con estructura 5S producidas por *S. clavuligerus* son: 2-formiloximetilclavama, 2-hidroximetilclavama (2-HMC), alanilclavama y el clavam-2-carboxilato (Kwong y col., 2012).

El ácido clavulánico y las clavamas 5S, dadas sus similares estructurales, comparten en *S. clavuligerus* una ruta biosintética común (etapas tempranas) que da como producto final el ácido clavamínico. Las etapas tardías corresponden a las diferentes rutas biosintéticas que se diversifican desde el último intermediario común para dar el ácido clavulánico o las clavamas 5S (Egan y col., 1997). Sin embargo, todavía no se conocen todos los pasos implicados en la ruta de biosíntesis del ácido clavulánico y otras clavamas.

Etapas tempranas

En la primera etapa de biosíntesis, se produce la condensación de los dos precursores del ácido clavulánico (L-arginina y D-gliceraldehído-3-fosfato, precursores de la unidad C5 y C3 respectivamente), mediante la acción catalítica de la CEA sintasa (Khaleeli *et al.*, 1999), codificada por el gen *ceaS* (Pérez-Redondo y col., 1999). En el siguiente paso, la enzima beta-lactama sintetasa (beta-LS) cierra el anillo beta-lactámico para dar lugar al ácido desoxiguanidino-proclavamínico (DGPC). La beta-LS es codificada por el gen *bls* (Bachmann *et al.*, 1998). Este intermediario sufrirá una serie de modificaciones en sucesivas etapas por acción de la clavaminato sintasa (CAS). Esta enzima es una dioxigenasa dependiente de oxígeno molecular. La primera reacción que cataliza esta enzima es la incorporación de un grupo hidroxilo en la molécula de DGPC (Salowe y col., 1991). Mediante la acción de otra enzima, la clavaminato amidinohidrolasa (PAH), se elimina el grupo guanidino, generando el ácido proclavamínico (Elson y col., 1993). Este compuesto, de nuevo por acción de CAS, origina en dos etapas, el ácido clavamínico. Como ya se indicó anteriormente, el ácido clavamínico es el último compuesto común en la ruta biosintética del ácido clavulánico y de las clavamas 5S.

Etapas tardías

La ruta de biosíntesis del ácido clavulánico continúa mediante la condensación del ácido clavamínico y la glicina por acción de la enzima codificada por *gcas*, da lugar al ácido N-glicilclavamínico (Arulanantham y col., 2006). En etapas sucesivas que aún se desconocen, la molécula de ácido N-glicilclavamínico sufre una serie de modificaciones estereoisómeras, para dar el clavulanato-9-aldehído, que presenta una conformación 3R5R. La conformación 5R de este intermediario ya le confiere la capacidad de inhibir las beta-lactamasas (Nicholson y col., 1994). En la última etapa, el clavulanato-9-aldehído, por acción de la enzima CAR, codificada por el gen *car* (Pérez-

Redondo y col., 1998), se transforma en ácido clavulánico. En la agrupación de ácido clavulánico aparecen otros genes, que sin participar en la ruta biosintética, resultan ser esenciales en la producción de este metabolito como *oppA1* y *oppA2*, que codifican oligopéptidos permeasas de función desconocida (ver en el Capítulo II de Resultados), o *cyp* que codifica un citocromo P-450 (Li y col., 2000).

Los genes específicamente implicados en la biosíntesis de clavamas 5S han sido localizados en dos agrupaciones génicas (**Figura 1.8**). Una, la agrupación génica de las clavamas localizada en el cromosoma, contiene además del gen *cas1*, que codifica para una isoenzima de la clavaminato sintetasa que se encuentra en la agrupación del ácido clavulánico, los genes *cvm1*, *cvm2*, *cvm3*, *cvm4*, *cvm5* y *cvm6* (Mosher y col., 1999). La interrupción de *cvm1* o la doble delección de *cvm4* y *cvm5* anulan la producción de cualquiera de los metabolitos tipo 5S-clavamas pero no afecta a la producción de ácido clavulánico (Mosher y col., 1999). Otra parte de genes implicados en la biosíntesis de las clavamas 5S se localizan agrupados junto a los genes parálogos en pSCL4. Entre ellos destaca el regulador global de las clavamas, codificado por *cvm7P*.

Regulación coordinada de la biosíntesis de cefamicina C y ácido clavulánico

En la agrupación de la cefamicina C, entre los genes biosintéticos se encuentra el gen *ccaR* (*cephamycin C-clavulanic acid Regulator*), que codifica un regulador transcripcional de la familia SARP. Cuando este gen es interrumpido, se anula la producción de cefamicina C y la del ácido clavulánico, mientras que un aumento en el número de copias provoca un aumento en la producción de cefamicina C y de ácido clavulánico (Pérez-Llanera y col., 1997b; Alexander y Jensen, 1998; Kurt y col., 2013). Este regulador, actúa positivamente controlando la transcripción de ciertos genes implicados en la biosíntesis de cefamicina C, tanto en las etapas tempranas, intermedias y tardías, uniéndose específicamente a secuencias heptaméricas de las regiones promotoras de los distintos policistrones de los genes biosintéticos de cefamicina C (ver en el Capítulo I de Resultados) (Santamarta y col., 2011). Además, se ha demostrado que la proteína CcaR se autorregula, de forma que se une a su propia zona promotora, activando su propia transcripción (Santamarta *et al.*, 2002).

En la agrupación del ácido clavulánico se localiza *claR* (*clavulanic acid Regulator*), que codifica la proteína ClaR. Este regulador es un activador transcripcional tipo LysR específico de ruta, que controla las etapas tardías en la producción de ácido clavulánico (Paradkar y col., 1998). Así, ClaR regula positivamente los genes comprendidos entre *car* y *oppA2*, interaccionando probablemente con los promotores de *orf16*, *orf14*, *orf12* y el bidireccional *car-cyp* (MT. López-García, Tesis doctoral). La delección del gen *claR*, además de anular la producción de ácido clavulánico, provoca un aumento en la producción de cefamicina C. Este hecho justifica la regulación coordinada en la producción de ambos metabolitos, equilibrando la producción en

1. Introducción

función de las necesidades fisiológicas de la célula (Pérez-Redondo y col., 1998; Pérez-Redondo y col., 1999). En el trabajo publicado por Santamarta y col. (2011) demostramos el control directo por CcaR mediado por la unión a regiones promotoras del gen *clnR* y otros genes implicados en la biosíntesis del ácido clavulánico, como el policistrón *ceaS2-bls2-pah2-cas2*. Estos resultados confirman los estudios transcriptómicos previos, que muestran en el mutante deletado en *ccaR* la bajada de expresión de *clnR* (Pérez-Redondo y col., 1998; Paradkar y col., 1998) y de los genes biosintéticos de ácido clavulánico *ceaS2* (Tahlan y col., 2004), *car* (Pérez-Redondo y col., 1998; Paradkar y col., 1998), *oat2* (Pérez-Redondo y col., 1998) y *cyp* (Paradkar y col., 1998).

Además de los reguladores específicos de ruta CcaR y ClnR, la implicación de diferentes reguladores pleiotrópicos en la producción de ácido clavulánico y cefamicina C, evidencian la existencia de una compleja red reguladora en *S. clavuligerus*, aún no desentrañada por completo.

El regulador BldG, es un factor anti-anti-sigma necesario para la producción de antibióticos y la diferenciación morfológica en *S. clavuligerus*, al igual que ocurre en *Streptomyces coelicolor* (Bignell y col., 2005). Esta proteína regula positivamente la expresión del gen regulador *ccaR* mediante una cascada de señalización celular, donde BldG se une a un factor anti-sigma impidiendo la unión de este al factor sigma diana, quedando libre la maquinaria de transcripción (Duncan y col., 1996). Se ha identificado tanto en *S. coelicolor* como en *S. clavuligerus* el gen *apgA*, corriente abajo del gen *bldG*, como el responsable de codificar el factor anti-sigma (Parashar y col., 2009).

El sistema de señalización por gamma-butirolactonas indicado en epígrafes anteriores también está implicado en la producción de ácido clavulánico y cefamicina C en *S. clavuligerus* (**Figura 1.9**). Aunque en este microorganismo aún no se ha determinado la estructura y los genes implicados en la biosíntesis de las gamma-butirolactonas, sí que se ha determinado la presencia en su genoma del gen *brp*, que codifica un receptor de butirolactonas (Kim y col., 2004; Santamarta y col., 2005). Esta proteína se encuentra unida a una secuencia consenso para receptores de butirolactonas, denominada ARE, corriente arriba de la región promotora de *ccaR*, reprimiendo su transcripción. Cuando las butirolactonas llegan a una concentración crítica se unen a Brp, cambiando su conformación estructural, liberándose de 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).

Como ya se indicó anteriormente, 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 no es tan claro, siendo dependiente de las condiciones nutricionales (López-García y col., 2010). En este sentido, en medio TBO

(Higgins y col., 1974) el mutante *S. clavuligerus* $\Delta adpA$ presenta un desarrollo deficiente con fenotipo blanco sin capacidad para esporular aunque es formador de escaso micelio blanco, mientras que en medio ME (Sánchez y Braña, 1996) fenotípicamente es 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).

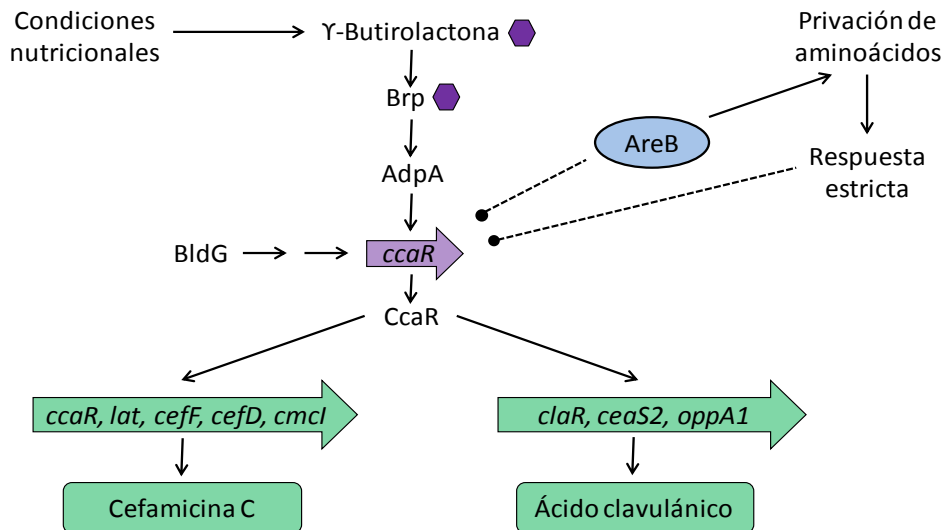


Figura 1.9. Esquema de las cascadas de regulación que controlan la biosíntesis de ácido clavulánico y cefamicina C en *S. clavuligerus*. La producción de ambos compuestos es controlado por CcaR en una cascada que implica a Brp y AdpA (Modificado de Martín y Liras, 2012).

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, observándose una reducción en la expresión de los genes *ccaR* y *claR*. La ausencia de *adpA* provoca en la agrupación del ácido clavulánico, un descenso de la expresión tanto en los genes biosintéticos tempranos como en los tardíos, siendo más drástico dicho descenso en los tempranos (López-García y col., 2010). La interacción de AdpA con reguladores específicos de ruta 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 (Park y col., 2009). La localización bioinformática de dos posibles sitios de unión a AdpA en la región promotora del gen *ccaR*, con secuencias similares a las descritas en *S. griseus*, refuerzan la idea del control directo que AdpA puede ejercer sobre *ccaR* (López-García y col., 2010).

1. Introducción

1.2.1.2 Biosíntesis de holomicina

La holomicina es un metabolito secundario de coloración amarilla perteneciente al grupo de las ditiopirrolonas. Las ditiopirrolonas están formadas por un cromóforo de dos anillos heterocíclicos con un puente de disulfuro y diferentes sustituyentes N-acil. En el caso concreto de la holomicina, esta posee un grupo acetilo unido al grupo amino del cromóforo y un H en el nitrógeno presente en el heterociclo (Liras, 2013). Hasta el momento, se han descrito aproximadamente 30 compuestos de naturaleza ditiopirrotínica, como la holomicina, tiolutina, aureotricina, y más recientemente los tiomarinoles, producidos por bacterias marinas, compuestos de naturaleza híbrida cuyo núcleo cromóforo se asocia mediante un puente amida con ácidos marinólicos (Qin y col., 2013b; Shiozowa y col., 1993; Shiozowa y col., 1995; Shiozowa y col., 1997).

Las ditiopirrolonas son antibióticos de amplio espectro que actúan inhibiendo el crecimiento tanto de bacterias Gram negativas como Gram positivas (Oliva y col., 2001). Además, aunque la holomicina no actúa como antifúngico, otras ditiopirrolonas poseen actividad antibiotica frente a levaduras y hongos filamentosos (Lamari y col., 2002a; Pelechano y Pérez-Ortín, 2008). Jimenez y colaboradores (1973) demuestran que la tiolutina es un potente inhibidor de las RNA polimerasa I, II y III purificadas de *Saccharomyces cerevisiae*. Además, el efecto de este grupo de compuestos como drogas citotóxicas en la inhibición del crecimiento celular ciertas líneas celulares de mamífero, los ha referido como potenciales antitumorales (Webster y col., 2000; Li y col., 2007).

Inicialmente, la producción de holomicina se describió en *Streptomyces griseus* (Ettlinger y col., 1959), más tarde en *Streptomyces* sp. P6621 (Okamura y col., 1977) y mutantes al azar de *Streptomyces clavuligerus* elaborados a partir de esporas sometidas a irradiación ultravioleta (Kenig and Reading, 1979). Posteriormente, otros mutantes de *S. clavuligerus* elaborados mediante métodos del DNA recombinante, resultaron ser productores de holomicina (*ver a continuación*). Recientemente, han sido identificados como productores de holomicina microorganismos de géneros diferentes como *Photobacterium halotolerans* S2753 (Wietz y col., 2010) y *Yersinia ruckeri* ATCC 29743 (Qin y col., 2013a).

En *S. clavuligerus*, la agrupación biosintética de holomicina se localiza en el cromosoma, en el extremo del brazo derecho, ocupando en total de 17,6 Kb aproximadamente (Li y Walsh, 2010; Qin y col., 2013). La agrupación está formada por *hlmE*, que codifica una NRPS (*nonribosomal peptide synthetase*) con tres dominios para la ciclación (Cy), adenilación (A) y tiolación (T), dos genes para tioesterasas (*hlmC* y *hlmK*) y otro gen con un dominio de condensación (*hlmL*). Otros genes que codifican enzimas biosintéticas son *hlmG*, cuyo producto es una globina, *hlmB* que codifica una acil-CoA deshidrogenasa, tres oxidoreductasas flavino-dependientes (*hlmI*, *hlmD* y

hlmF) y *hlmA* que codifica una acetiltransferasa. Dos genes codifican proteínas reguladoras: *hlmJ* y *hlmM*, que codifica un regulador tipo LuxR, y existe un gen para transportador transmembrana, *hlmH*, que completan la agrupación (Liras, 2013) (**Figura 1.9B**). El análisis funcional de algunos de estos genes (Li y Walsh, 2010; Robles-Reglero, datos no publicados) junto con experimentos de expresión heteróloga en la cepa no productora de holomicina *S. coelicolor* M 1146 (Robles-Reglero y col., 2013), confirman este grupo de genes como la agrupación biosintética de holomicina.

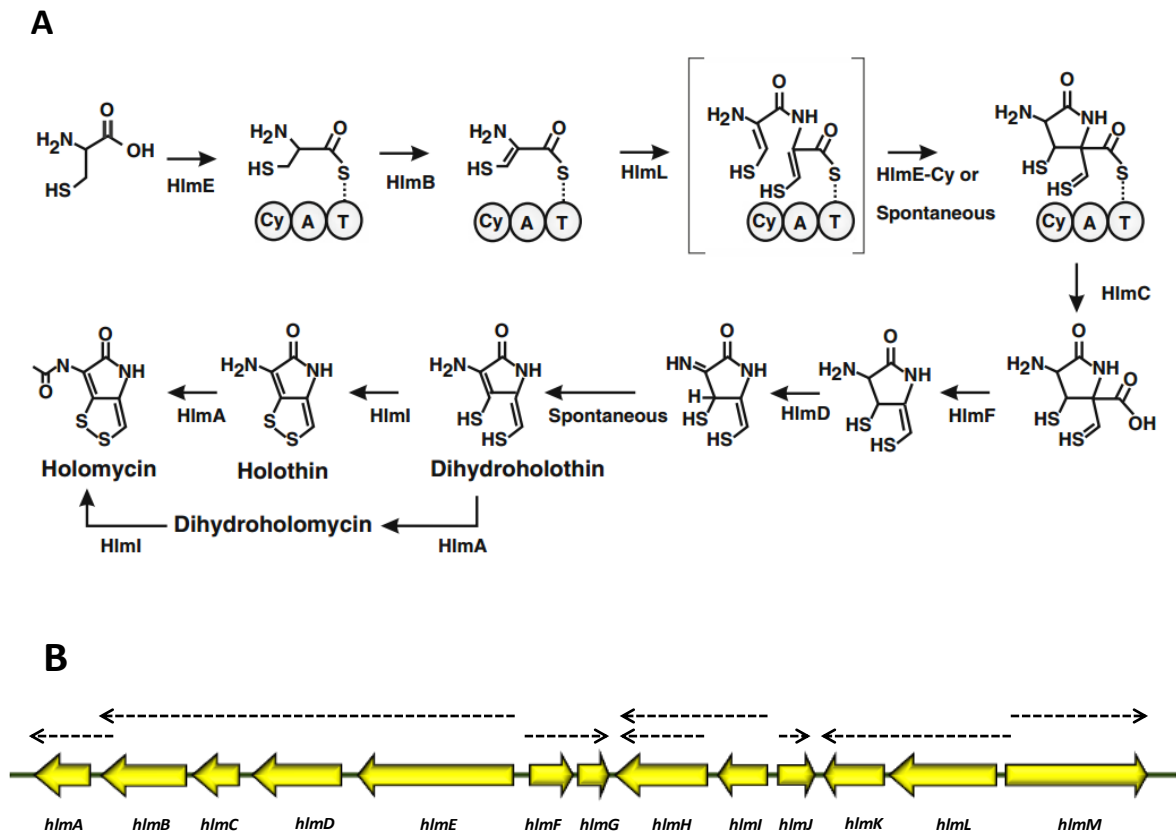


Figura 1.9. Ruta biosintética de holomicina propuesta (A) y agrupación génica de holomicina en *S. clavuligerus*. Las flechas discontinuas indican las unidades transcripcionales descritas (Modificado de Robles-Reglero y col., 2013).

Ruta biosintética de holomicina

La ruta biosintética propuesta por Li y Walsh en 2010, mostrada en la **Figura 1.9A**, se basa principalmente en análisis bioinformático 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.

1. Introducción

Etapas tempranas

La biosíntesis comienza con la unión del precursor L-cisteína al dominio T de la proteína recombinante NRPS codificada por el gen *hlmE*, y el dominio A adenila el aminoácido activándolo como L-cys-AMP. La ausencia de un segundo dominio de activación de aminoácidos para la segunda cisteína necesaria en la NRPS sugiere que HlmE pueda ser una enzima "interactiva", es decir, se mantiene unida al precursor activado mientras otras enzimas de la ruta ejercen su actividad catalítica. De este modo, la acil-CoA deshidrogenasa codificada por *hlmB* elimina dos átomos de hidrógeno de la molécula de L-cisteína y el dominio de condensación de HlmL une la segunda L-cisteína. Una vez unidas ambas moléculas modificadas, se produce la ciclación por parte del dominio Cy de la NRPS formándose el primer anillo de la holomicina. Este último paso parece poder llevarse a cabo de forma espontánea. El dipéptido L-cys-L-cys, que probablemente es liberado de HlmE, se ha detectado en solución durante los análisis enzimáticos realizados con HlmE (Li y Walsh, 2010). Se ha propuesto que la tioesterasa codificada por *hlmC* sea la que libere el dipéptido modificado por la enzima HlmE. Tras la liberación de HlmE, el dipéptido es descarboxilado por acción de la flavoproteína con actividad oxidorreductasa codificada por *hlmF*. Sin embargo, esta reacción todavía no ha sido demostrada experimentalmente. El intermediario descarboxilado se reduce luego por acción de la oxidorreductasa HlmD y espontáneamente se obtiene holotina reducida (también llamada dihidroholotina) (Li y Walsh, 2010).

Etapas tardías

Las etapas tardías de la vía comprenden dos actividades enzimáticas (HlmI y HlmA) por las cuales la dihidroholotina se transforma en holomicina, pudiendo actuar en distinto orden (**Figura 1.9A**). Una tiorredoxina oxidorreductasa codificada por *hlmI*, emplea como sustrato la dihidroholotina o dihidroholomicina para dar holotina u holomicina, respectivamente. La enzima HlmI ha sido purificada mediante métodos recombinantes, requiriendo en su actividad catalítica el cofactor FAD_{red} y O_2 , puesto que solamente es activa en condiciones aerobias. La acción de esta enzima permite el cierre del segundo anillo del cromóforo (Li y Walsh, 2010). Finalmente, la actividad acetil transferasa de la enzima codificada por *hlmA* da lugar a la conversión irreversible de la holotina a holomicina (holomicina sintasa) en presencia de acetil-CoA. Esta actividad fue medida por Fuente y colaboradores (2002) en extractos de células dializadas, donde la actividad específica era proporcional al nivel de holomicina producido por los distintos mutantes de *S. clavuligerus*.

Regulación de la biosíntesis de holomicina

La regulación de la producción de holomicina en *Streptomyces* parece ser compleja. Estudios iniciales indicaban que la cepa *Streptomyces* sp. P6621 productora

de cefamicina C no producía holomicina. Sin embargo, la mutagénesis química en dicha cepa inducía la producción de holomicina, mientras que se reducía drásticamente la producción de cefaminina C (Okamura y col., 1977).

Como ya se indicó anteriormente, la cepa silvestre *S. clavuligerus* ATCC 27064 sólo produce cantidades traza de holomicina, a diferencia de lo que ocurría con el mutante superproductor de holomicina *S. clavuligerus* IT1, generado por irradiación ultravioleta (Kenig and Reading, 1979). La elaboración mediante mutación dirigida en nuestro laboratorio de una serie de cepas mutantes implicadas en las etapas tardías de la producción de ácido clavulánico (*cyp*, *car* y *orf12*) y de los reguladores específicos de ruta (*ccaR* y *claR*), pusieron de manifiesto la producción de holomicina. Destaca *S. clavuligerus oppA2::aph*, mutante interrumpido en la oligopéptido permeasa OppA2 implicada en la producción de ácido clavulánico, como cepa superproductora de holomicina, produciendo más de 1000 µg/mg DNA (Lorenzana y col., 2004; Fuente y col., 2002). Estudios transcripcionales y proteómicos de algunas de estas cepas confirman dicha sobreproducción. Así, los estudios transcripcionales mediante micromatrices de las cepas *S. clavuligerus oppA2::aph*, *S. clavuligerus ΔclaR::aph* y *S. clavuligerus ΔccaR::tsr* mostraron una mayor expresión de algunos de los genes biosintéticos de la agrupación de holomicina en comparación con la cepa parental (*hlmA*, *hlmB*, *hlmC*, *hlmD*, *hlmF*, *hlmG* o *hlmI*). El análisis proteómico de las cepas *S. clavuligerus oppA2::aph* y *S. clavuligerus ΔccaR::tsr* confirmaron la presencia de las proteínas HlmD, HlmF y HlmG, ausentes en la cepa parental (Robles-Reglero y col., 2013).

Se han identificado una serie de genes cuya expresión modula la producción de holomicina. Un ejemplo es el gen *rhIA*, que codifica una proteína de tipo rodanesa con actividad tiosulfato sulfurotransferasa, presente en el proteoma de la cepa superproductora *S. clavuligerus oppA2::aph*. El análisis funcional del doble mutante interrumpido en *oppA2* y deletado en *rhIA* mostró una drástica reducción de los niveles de producción de holomicina, sugiriendo el papel de RhIA en la formación del precursor de cisteína, poseedor de azufre en su estructura (Nardíz y col., 2010).

Los genes *afsR* y *afsS*, que codifican reguladores globales en la producción de antibióticos (ver epígrafe 1.1.3.1.2), parecen estar implicados en la producción de la holomicina y del ácido clavulánico, puesto que la introducción de una copia adicional del operon *afsRS* del propio *S. clavuligerus* en la cepa parental provoca la inducción en la producción de holomicina, e incrementa en cinco veces la producción de ácido clavulánico respecto a la cepa parental (Chen y col., 2012).

En el *Capítulo II de Resultados* de la presente tesis doctoral abordaremos el papel que ejerce el megaplásmido lineal pSCL4 en la producción de holomicina.

1.3. BIBLIOGRAFÍA

Adamidis T, Riggle P, Champness W. (1990). Mutations in a new *Streptomyces coelicolor* locus which globally block antibiotic biosynthesis but not sporulation. *J Bacteriol.* 172(6): 2962-2969.

Aguilar A, Hopwood DA. (1982). Determination of methylenomycin A synthesis by the pSV1 plasmid from *Streptomyces violaceus-ruber* SANK 95570. *J Gen Microbiol.* 128: 1893-1901.

Aigle B, Corre C. (2012). Waking up *Streptomyces* secondary metabolism by constitutive expression of activators or genetic disruption of repressors. *Methods Enzymol.* 517: 343-366.

Alam MT, Merlo ME, Takano E, Breitling R. (2010). Genome-based phylogenetic analysis of *Streptomyces* and its relatives. *Mol Phylogenet Evol.* 54(3): 763-772.

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.

Allan EJ, Prosser JI. (1983). Mycelial growth and branching of *Streptomyces coelicolor* A3(2) on solid medium. *J Gen Microbiol.* 129: 2029-2036.

Anderson AS, Wellington EM. (2001). The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51(Pt 3): 797-814.

Anderson T.B, Brian P, Champness, W. C. (2001). Genetic and transcriptional analysis of *absA*, an antibiotic gene cluster-linked two-component system that regulates multiple antibiotics in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol.* 39: 553-566.

Antón N, Mendes MV, Martín JF, Aparicio JF. (2004). Identification of PimR as a positive regulator of pimarin biosynthesis in *Streptomyces natalensis*. *J Bacteriol.* 186:2567-2575.

Aparicio JF, Molnár I, Schwecke T, König A, Haydock SF, Khaw LE, Staunton J, Leadlay PF. (1996). Organization of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase. *Gene.* 169: 9-16.

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.* 28: 1279-1287.

Bachmann BO, Li R, Townsend CA. (1998). β -Lactam synthetase: a new biosynthetic enzyme. *Proc Natl Acad Sci.* 95: 9082-9086.

Baker BJ, Dotzlaf JE, Yeh WK. (1991). Deacetoxycephalosporin C hydroxylase of *Streptomyces clavuligerus*. Purification, characterization, bifunctionality, and evolutionary implication. *J Biol Chem.* 266: 5087-5093.

Bao K, Cohen SN. (2003). Recruitment of terminal protein to the ends of *Streptomyces* linear plasmids and chromosomes by a novel telomere-binding protein essential for linear DNA replication. *Genes Dev.* 17(6):774-785.

Bentley SD, Chater KF, Cerdeño-Tárraga A, 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, Hornsby T, Howarth S, Huang C, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabinowitsch E, Rajandream M, 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.

Bibb, M. (1996). 1995 Colworth Prize Lecture. The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology.* 142: 1335-1344.

Bibb, M.J. (2005). Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Curr Opin Microbiol.* 8(2): 208-215.

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(4): 1529-1541.

Brautaset T, Sekurova ON, Sletta H, Ellingsen TE, Strøm AR, Valla S, Zotchev SB. (2000). Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway. *Chem Biol.* 7: 395-403.

Brian P, Riggle PJ, Santos RA, Champness WC. (1996). Global negative regulation of *Streptomyces coelicolor* antibiotic synthesis mediated by an *absA*-encoded putative signal transduction system. *J Bacteriol.* 178(11): 3221-3231.

Brown D, Evans JR, Fletton RA. (1979). Structures of three novel beta-lactams isolated from *Streptomyces clavuligerus*. *J Chem Soc Chem Commun.* 282-283.

1. Introducción

Capstick DS, Willey JM, Buttner MJ, Elliot MA. (2007). SapB and the chaplins: connections between morphogenetic proteins in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol.* 64(3): 602-613.

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 U S A* 100 Suppl. 2: 14555-14561.

Challis, G.L. y 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 (2): 14555-14561.

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. doi: 10.1371

Chater KF, Biró S, Lee KJ, Palmer T, Schrempf H. (2010). The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Rev.* 34(2): 171-98.

Chater KF, Chandra G. (2006). The evolution of development in *Streptomyces* analysed by genome comparisons. *FEMS Microbiol Rev.* 30: 65-672.

Chater KF, Horinouchi S. (2003). Signalling early developmental events in two highly diverged *Streptomyces* species. *Mol Microbiol.* 48: 9-15.

Chater KF, Losick R. (1997). The mycelial life-style of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its relatives. En: *Bacteria as multicellular organisms.* JH Shapiro y M Dworkin, eds. Oxford University Press, New York, USA. 149-182.

Chater KF. (2001). Regulation of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a checkpoint multiplex? *Curr Opin Microbiol.* 4: 667-673.

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: 522-529.

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: 4526-4528.

Chouayekh H, Virolle MJ. (2002). The polyphosphate kinase plays a negative role in the control of antibiotic production in *Streptomyces lividans*. *Mol Microbiol.* 43(4): 919-930.

Claessen D, de Jong W, Dijkhuizen L, Wösten HA. (2006). Regulation of *Streptomyces* development: reach for the sky! *Trends Microbiol.* 14(7): 313-319.

Coque JJ, Pérez-Llarena FJ, Enguita FJ, Fuente JL, Martín JF, Liras P. (1995). Characterization of the *cmcH* genes of *Nocardia lactamdurans* and *Streptomyces clavuligerus* encoding a functional 3'-hydroxymethylcephem O-carbamoyltransferase for cephamycin biosynthesis. *Gene.* 162(1): 21-27.

D**avies J.** (2007). Small molecules: the lexicon of biodiversity. *J Biotechnol.* 129(1): 3-5.

de la Fuente JL, Rumbero A, Martín JF, Paloma Liras. (1997). Delta-1-piperideine-6-carboxylate dehydrogenase, a new enzyme that forms alpha-aminoadipate in *Streptomyces clavuligerus* and other cephamycin C-producing actinomycetes. *Biochem J.* 327: 59-64.

Del Sol R, Pitman A, Herron P, Dyson P. (2003). The product of a developmental gene, *crgA*, that coordinates reproductive growth in *Streptomyces* belongs to a novel family of small actinomycete-specific proteins. *J Bacteriol.* 185(22): 6678-6685.

Demain AL. (2009). Antibiotics: natural products essential to human health. *Med Res Rev.* 29(6): 821-842.

Doroghazi JR, Metcalf WW. (2013). Comparative genomics of actinomycetes with a focus on natural product biosynthetic genes. *BMC Genomics.* 14: 611.

Duncan L, Alper S, Losick R. (1996). SpoIIAA governs the release of the cell-type specific transcription factor σ^F from its anti-sigma factor SpoIIAB. *J Mol Biol.* 260: 147-164.

E**gan LA, Busby RW, Iwata-Reuyl D, Townsend CA.** (1997). The 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: 2348-2355.

Elson SW, Baggaley KH, Davison M, Fulston M, Nicholson NH, Risbridger GD, Tyler JW. (1993). The identification of three new biosynthetic intermediates and one further biosynthetic enzyme in the clavulanic acid pathway. *J Chem Soc Chem Commun.* 1212-1214.

Enguita FJ, Liras P, Leitão AL, Martín JF. (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: 33225-33230.

1. Introducción

Ensign JC. (1978). Formation, properties, and germination of actinomycete spores. *Annu Rev Microbiol.* 32: 185-219.

Ettlinger L, Gäumann E, Hütter R, Keller-Schierlein W, Kradolfer F, Neipp L, Prelog V, Zähner H. (1959). Stoffwechselprodukte von Actinomyceten, Holomycin. *Helv Chim Acta.* 42: 563-569.

Fernández-Moreno, M. A., Caballero, J. L., Hopwood, D. A., Malpartida, F. (1991). The *act* cluster contains regulatory and antibiotic export genes, direct targets for translational control by the *bldA* tRNA gene of *Streptomyces*. *Cell.* 66: 769-780.

Fischbach MA. (2009). Antibiotics from microbes: converging to kill. *Curr. Opin. Microbiol.* 12: 520-527.

Fischer M., Alderson J., van Keulen G., White J, Sawers R. G. (2010). The obligate aerobe *Streptomyces coelicolor* A3(2) synthesizes three active respiratory nitrate reductases. *Microbiology.* 156: 3166-3179.

Flärdh K, Buttner MJ. (2009). *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat Rev Microbiol.* 7: 36-49.

Folcher M., Gaillard H., Nguyen L. T., Nguyen K. T., Lacroix P., Bamas-Jacques N. y col. (2001). Pleiotropic functions of a *Streptomyces pristinaespiralis* autoregulator receptor in development, antibiotic biosynthesis, and expression of a superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 276: 44297-44306.

Fuente A, Lorenzana LM, Martin JF, Liras P. (2002). Mutants of *Streptomyces clavuligerus* with disruptions in different genes for clavulanic acid biosynthesis produce large amounts of holomycin: possible cross-regulation of two unrelated secondary metabolic pathways. *J Bacteriol.* 184: 6559-6565.

Gao B, Gupta RS. (2012). Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 76(1): 66-112.

Gomez-Escribano JP, Bibb MJ. (2011). Engineering *Streptomyces coelicolor* for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *Microb. Biotechnol.* 4: 207-215.

Goranovic D, Blazic M, Magdevska V, Horvat J, Kuscer E, Polak T, Santos-Aberturas J, Martínez-Castro M, Barreiro C, Mrak P, Kopitar G, Kosec G, Fujs S, Martín JF, Petković H. (2012). FK506 biosynthesis is regulated by two positive regulatory elements in *Streptomyces tsukubaensis*. *BMC Microbiol.* 19(12): 238.

Granozzi C, Billetta R, Passantino R, Sollazzo M, Puglia AM. (1990). A breakdown in macromolecular synthesis preceding differentiation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Gen Microbiol.* 136(4): 713-716.

Gunnarsson N., Mortensen U.H., Sosio M., Nielsen J. (2004b). Identification of the Entner-Doudoroff pathway in an antibiotic-producing actinomycete species. *Mol. Microbiol.* 52: 895-902.

Guyet A, Benaroudj N, Proux C, Gominet M, Coppée JY, Mazodier P. (2014). Identified members of the *Streptomyces lividans* AdpA regulon involved in differentiation and secondary metabolism. *BMC Microbiol.* 14(1): 81.

Hara H, Ohnishi Y, Horinouchi S. (2009). DNA microarray analysis of global gene regulation by A-factor in *Streptomyces griseus*. *Microbiology.* 155: 2197-2210.

Henikoff S, Haughn GW, Calvo JM, Wallace JC. (1988). A large family of bacterial activator proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85: 6602-6606.

Higgins CE, Kastner RE. (1971). *Streptomyces clavuligerus* sp. nov., a beta-lactam antibiotic producer. *Int J Syst Bacteriol* 21(4): 326-331.

Higgins CE, Hamill RL, Sands TH, Hoehn MM, Davis NE. (1974). Letter: The occurrence of deacetoxycephalosporin C in fungi and streptomycetes. *J Antibiot. (Tokyo).* 27: 298-300.

Higo A, Hara H, Horinouchi S, Ohnishi Y. (2012). Genome-wide distribution of AdpA, a global regulator for secondary metabolism and morphological differentiation in *Streptomyces*, revealed the extent and complexity of the AdpA regulatory network. *DNA Res.* 19(3): 259-273.

Hirsch CF, Ensign JC. (1978). Some properties of *Streptomyces viridochromogenes* spores. *J Bacteriol.* 134: 1056-1063.

Hopwood D. (2007). *Streptomyces* in nature and medicine: The Antibiotic Makers. *Oxford University Press*, New York, USA.

Hopwood DA, Chater KF, Bibb MJ. (1995). Genetics of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2), a model streptomycete. *Biotechnology* 28: 65-102.

Hopwood, D. A. y Kieser, T. (1993). Conjugative plasmids in *Streptomyces*. In *Bacterial Conjugation*. Clewel, D.B. (ed). Plenum Press, New York.: pp. 293-312.

Horinouchi S. (2003). AfsR as an integrator of signals that are sensed by multiple serine/threonine kinases in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Ind Microbiol Biotechnol.* 30(8): 462-467.

1. Introducción

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: 462-464.

Howarth TT, Brown AG, King TJ. (1976). Clavulanic acid, a novel β -lactam isolated from *Streptomyces clavuligerus*; X-ray crystal structure analysis. *J Chem Soc Chem Commun* 1976: 266b-267b.

Hu H, Zhang Q, Ochi K. (2002). Activation of antibiotic biosynthesis by specified mutations in the *rpoB* gene (encoding the RNA polymerase beta subunit) of *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol.* 184: 3984-3991.

Huang CH, Lin YS, Yang YL, Huang SW, Chen CW. (1998). The telomeres of *Streptomyces* chromosomes contain conserved palindromic sequences with potential to form complex secondary structures. *Mol Microbiol.* 28(5): 905-916.

Huang J, Lih CJ, Pan KH, Cohen, SN. (2001). Global analysis of growth phase responsive gene expression and regulation of antibiotic biosynthetic pathways in *Streptomyces coelicolor* using DNA microarrays. *Genes Dev.* 15: 3183-3192.

Huang J, Shi J, Molle V, Sohlberg B, Weaver D, Bibb MJ, Karoonuthaisiri N, Lih CJ, Kao CM, Buttner MJ, Cohen SN. (2005). Cross-regulation among disparate antibiotic biosynthetic pathways of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* 58(5): 1276-1287.

Hulett FM. (1996). The signal-transduction network for Pho regulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 19(5): 933-939.

Hutchings MI, Hoskisson PA, Chandra G, Buttner MJ. (2004). Sensing and responding to diverse extracellular signals? Analysis of the sensor kinases and response regulators of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiol.* 150: 2795-2806.

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.

Jakimowicz D, Majka J, Messer W, Speck C, Fernández M, Martín MC, Sánchez J, Schauwecker F, Keller U, Schrepf H, Zakrzewska-Czerwinska J. (1998). Structural elements of the *Streptomyces oriC* region and their interactions with the DnaA protein. *Microbiology.* 144: 1281-1290.

Jensen SE, Paradkar AS, Mosher RH, Anders C, Beatty PH, Brumlik MJ, Griffin A, Barton B. (2004). Five additional genes are involved in clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 48: 192-202.

Jensen SE, Westlake DW, Wolfe S. (1985). Deacetoxycephalosporin C synthetase and deacetoxycephalosporin C hydroxylase are two separate enzymes in *Streptomyces clavuligerus*. *J Antibiot.* (Tokyo). 38: 263-265.

Jensen SE, Wong A, Rollins MJ, Westlake DW. (1990). Purification and partial characterization of δ -(L-alpha-aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase from *Streptomyces clavuligerus*. *J Bacteriol.* 172: 7269-7271.

Jensen SE. (2012). Biosynthesis of clavam metabolites. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 39(10): 1407-1419.

Jiang H, Kendrick KE. (2000). Characterization of *ssfR* and *ssgA*, two genes involved in sporulation of *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol.* 182: 5521-5529.

Jimenez A, Tipper DJ, Davies J. (1973). Mode of action of thiolutin, an inhibitor of macromolecular synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 3: 729-738.

Kato JY, Ohnishi Y, Horinouchi S. (2005a). Autorepression of AdpA of the AraC/XylS family, a key transcriptional activator in the A-factor regulatory cascade in *Streptomyces griseus*. *J Mol Biol.* 350: 12-26.

Kawai K, Wang G, Okamoto S, Ochi K. (2007). The rare earth, scandium, causes antibiotic overproduction in *Streptomyces* spp. *FEMS Microbiol. Lett.* 274: 311-315.

Keen CL, Mendelovitz S, Cohen G, Aharonowitz Y, Roy KL. (1988). Isolation and characterization of a linear DNA plasmid from *Streptomyces clavuligerus*. *Mol Gen Genet.* 212(1): 172-176.

Kenig M, Reading C. (1979). Holomycin and an antibiotic (MM 19290) related to tunicamycin, metabolites of *Streptomyces clavuligerus*. *J Antibiot.* (Tokyo). 32: 549-554.

Kenig M, Reading C. (1979). Holomycin and an antibiotic (MM 19290) related to tunicamycin, metabolites of *Streptomyces clavuligerus*. *J Antibiot.* 32: 549-554

Kern BA, Hendlin D, Inamine E. (1980). L-lysine ϵ -aminotransferase involved in cephamycin C synthesis in *Streptomyces lactamdurans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 17: 679-685.

1. Introducción

Khaleeli N, Li RF, Townsend CA. (1999). Origin of the β -lactam carbons in clavulanic acid from an unusual thiamine pyrophosphate-mediated reaction. *J Am Chem Soc.* 121: 9223-9224.

Khokhlov AS, Tovarova II, Borisova LN, Pliner SA, Shevchenko LN, Kornitskaia EI, Ivkina NS, Rapoport IA. (1967). The A-factor, responsible for streptomycin biosynthesis by mutant strains of *Actinomyces streptomycini*. *Dokl Akad Nauk SSSR.* 177: 232-235.

Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. (2000). Practical *Streptomyces* Genetics. Norwich, UK: *The John Innes Foundation*.

Kim D, Forst S. (2001). Genomic analysis of the histidine kinase family in bacteria and archaea. *Microbiology.* 147(Pt 5): 1197-1212.

Kim HS, Lee YJ, Lee CK, Choi SU, Yeo S-H, Hwang YI, Yu TS, Kinoshita H, Nihira T. (2004). Cloning and characterization of a gene encoding the γ -butyrolactone autoregulator receptor from *Streptomyces clavuligerus*. *Arch Microbiol.* 182: 44-50.

Kirby, R. y Hopwood, D.A. (1977). Genetic determination of methylenomycin synthesis by the SCP1 plasmid of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Gen Microbiol.* 98: 239-252.

Kovacevic S, Miller JR. (1991). Cloning and sequencing of the β -lactam hydroxylase gene (*cefF*) from *Streptomyces clavuligerus*: gene duplication may have led to separate hydroxylase and expandase activities in the actinomycetes. *J Bacteriol.* 173: 398-400.

Kovacevic S, Weigel BJ, Tobin MB, Ingolia TD, Miller JR. (1989). Cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Streptomyces clavuligerus* gene encoding deacetoxycephalosporin C synthetase. *J Bacteriol.* 171: 754-760.

Kumon Y, Sasaki Y, Kato I, Takaya N, Shoun H, Beppu T. (2002). Codenitrification and denitrification are dual metabolic pathways through which dinitrogen evolves from nitrate in *Streptomyces antibioticus*. *J Bacteriol.* 184(11): 2963-2968.

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.

Kwong T, Zelyas NJ, Cai H, Tahlan K, Wong A, Jensen SE. (2012). 5S clavam biosynthesis is controlled by an atypical two- component regulatory system in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 56: 4845-4855.

Lamari L, Zitouni A, Boudjelli H, Badji H, Sabaou N, Lebrihi A, Lefebvre G, Seguin E, Tillequin F. (2002a). New dithiolopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J Antibiot.* 55: 696-701.

Lambert, DH; Loria, R. (1989). *Streptomyces scabies* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 39(4): 387.

Leitao AL., Enguita FJ, Fuente, JL, Liras P, Martín JF. (1996). Allophane increases the protein levels of several cephamycin biosynthesis enzymes in *Nocardia lactamdurans*. *Microbiology*. 142: 3399-3406.

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 Med Chem*. 15: 4601-4608.

Li B, Walsh CT. (2010). Identification of the gene cluster for the dithiopyrrolone antibiotic holomycin in *Streptomyces clavuligerus*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107: 19731-19735.

Li R, Liu G, Xie Z, He X, Chen W, Deng Z, Tan H. (2010). PolY, a transcriptional regulator with ATPase activity, directly activates transcription of *polR* in polyoxin biosynthesis in *Streptomyces cacaoi*. *Mol. Microbiol*. 75: 349-364.

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.

Li R., Townsend CA. (2006). Rational strain improvement for enhanced clavulanic acid production by genetic engineering of the glycolytic pathway in *Streptomyces clavuligerus*. *Metab Eng*. 8: 240-252.

Li YQ, Chen PL, Chen SF, Wu D, Zheng J. (2004). A pair of two-component regulatory genes *ecrA1/A2* in *Streptomyces coelicolor*. *J Zhejiang Univ Sci*. 5(2): 173-179.

Lin, Y.S., Kieser, H.M., Hopwood, D.A. y Chen, C.W. (1994). The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. *Mol Microbiol*. 14: 1103.

Linares, J.F., Gustafsson, I., Baquero, F. y Martinez, J.L. (2006). Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103(51): 19484-19489.

Liras P, Demain AL. (2009). Chapter 16. Enzymology of β -lactam compounds with cephem structure produced by actinomycete. *Methods Enzymol*. 458: 401-429.

Liras P, Gómez-Escribano JP, Santamarta I. (2008). Regulatory mechanisms controlling antibiotic production in *Streptomyces clavuligerus*. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 3:5. 667-676.

1. Introducción

Liras P. (1999). Biosynthesis and molecular genetics of cephamycins. Cephamycins produced by actinomycetes. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 75: 109-124.

Liras P. (2013). Holomycin, a dithiolopyrrolone compound produced by *Streptomyces clavuligerus*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 98(3): 1023-1030.

Liu G, Chater KF, Chandra G, Niu G, Tan H. (2013). Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 77(1): 112-143.

Liu G, Tian Y, Yang H, Tan H. (2005). A pathway-specific transcriptional regulatory gene for nikkomycin biosynthesis in *Streptomyces ansochromogenes* that also influences colony development. *Mol. Microbiol*. 55: 1855-1866.

Locci R. (1989). *Streptomyces* and related Genera. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams, S. T.; Sharpe, M. D. & Holt, J. G. eds., Williams & Wilkins, Baltimore, U.S.A. pp. 2451-2492.

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(Pt 8): 2354-2365.

López-García, MT. (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*.

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 β -lactamase inhibitor. *J Bacteriol*. 186. 3431-3438.

Maddocks SE, Oyston PC. (2008). Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiol*. 154: 3609-3623.

Madduri K, Stuttard C, Vining LC. (1989). Lysine catabolism in *Streptomyces* spp. is primarily through cadaverine: beta-lactam producers also make alpha-aminoadipate. *J Bacteriol*. 171(1): 299-302.

Majka J, Jakimowicz D, Messer W, Schrempf H, Lisowski M, Zakrzewska-Czerwińska J. (1999). Interactions of the *Streptomyces lividans* initiator protein DnaA with its target. *Eur J Biochem*. 260(2): 325-335.

Manteca A., Sánchez J. (2009). *Streptomyces* development in colonies and soils. *Appl Environ Microbiol*. 75: 2920-2924.

Manteca A, Álvarez R, Salazar N, Yagüe P, Sánchez J. (2008). Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of *Streptomyces coelicolor*. *Appl Environ Microbiol.* 74: 3877- 3886.

Manteca A, Claessen D, López-Iglesias C, Sánchez 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: 118-125.

Martín JF. (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: 5197-5201.

Martín JF, Liras P. (2010). Engineering of regulatory cascades and networks controlling antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Curr Opin Microbiol.* 13(3): 263-273.

Martín JF, Liras P. (2012). Cascades and networks of regulatory genes that control antibiotic biosynthesis. *Subcell Biochem.* 64: 115-138.

Martín JF, Liras P. (1989). Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. *Annu Rev Microbiol.* 43: 173-206.

Martin JF, Demain AL. (1980). Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol Rev.* 44(2): 230-251.

Masuma R, Tanaka Y, Tanaka H, Omura S. (1986). Production of nanaomycin and other antibiotics by phosphate-depressed fermentation using phosphate-trapping agents. *J Antibiot (Tokyo).* 39(11): 1557-1564.

Matsumoto A, Hong SK, Ishizuka H, Horinouchi S, Beppu T. (1994). Phosphorylation of the AfsR protein involved in secondary metabolism in *Streptomyces* species by a eukaryotic-type protein kinase. *Gene.* 19; 146(1): 47-56.

McCarthy, AJ, Williams ST. (1992). Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment-a review. *Gene* 115: 189-192.

McCormick JR , Flärdh K. (2012). Signals and regulators that govern *Streptomyces* development. *FEMS Microbiol Rev.* 36(1): 206-231.

McKenzie NL, Nodwell JR.(2007). Phosphorylated AbsA2 negatively regulates antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* through interactions with pathway-specific regulatory gene promoters. *J Bacteriol.* 189: 5284-5292.

1. Introducción

Medema MH, Trefzer A, Kovalchuk A, van den Berg M, Muller U, Heijne W y col. (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.

Méndez C, Braña AF, Manzanal MB, Hardisson C. (1985). Role of substrate mycelium in colony development in *Streptomyces*. *Can J Microbiol.* 31(5): 446-450.

Michels PC, Khmelnitsky YL, Dordick JS, Clark DS. (1998). Combinatorial biocatalysis: a natural approach to drug discovery. *Trends Biotechnol.* 16(5): 210-215.

Mo S, Yoo YJ, Ban YH, Lee SK, Kim E, Suh JW, Yoon YJ. (2012). Roles of *fkfN* in Positive Regulation and *tcs7* in Negative Regulation of FK506 Biosynthesis in *Streptomyces* sp. strain KCTC 11604BP. *Appl Environ Microbiol.* 78: 2249-2255.

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: 1501-1510.

Moore JM, Bradshaw E, Seipke RF, Hutchings MI, McArthur M. (2012). Use and discovery of chemical elicitors that stimulate biosynthetic gene clusters in *Streptomyces* bacteria. *Methods Enzymol.* 517: 367-385.

Mosher RH, Paradkar AS, Anders C, Barton B, Jensen SE. (1999). Genes specific for the biosynthesis of clavam metabolites antipodal to clavulanic acid are clustered with the gene for clavaminic synthase 1 in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 43: 1215-1224

Nagarajan R, Boeck LD, Gorman M, Hamill RL, Higgins CE, Hoehn MM, Stark WM, Whitney JG. (1971). β -lactam antibiotics from *Streptomyces*. *J Am Chem Soc.* 93. 2308-2310.

Nárdiz N, Santamarta I, Lorenzana LM, Martín JF, Liras P. (2011). A rhodanese-like protein is highly overrepresented in the mutant *S. clavuligerus oppA2::aph*: effect on holomycin and other secondary metabolites production. *Microb Biotechnol.* 4: 216-225.

Natsume R, Ohnishi Y, Senda T, Horinouchi S. (2004). Crystal structure of a gamma-butyrolactone autoregulator receptor protein in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Mol Biol.* 336(2): 409-419.

Netolitzky DJ, Wu X, Jensen SE, Roy KL. (1995). Giant linear plasmids of beta-lactam antibiotic producing *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Lett.* 131(1): 27-34.

Nicholson NH, Baggaley KH, Cassels R, Davison M, Elson SW, Fulston M, Tyler JW, Woroniecki SR. (1994). Evidence that the immediate biosynthetic precursor of clavulanic acid is its N-aldehyde analogue. *J Chem Soc Chem. Commun.* 1281-1282.

Novotna J, Vohradsky J, Berndt P, Gramajo H, Langen H, Li XM, Minas W, Orsaria L, Roeder D, Thompson CJ. (2003). Proteomic studies of diauxic lag in the differentiating prokaryote *Streptomyces coelicolor* reveal a regulatory network of stress-induced proteins and central metabolic enzymes. *Mol Microbiol.* 48(5): 1289-1303.

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.

Ochi K. (2007). From microbial differentiation to ribosome engineering. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71: 1373-1386.

Ohnishi Y, Kameyama S, Onaka 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.

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: 431-439.

Okamura K, Soga K, Shimauchi Y, Ishikura T. (1977). Holomycin and N-propionyl-holothin, antibiotics produced by a cephamycin C producer. *J Antibiot.* 30: 334-336.

Olano C, Abdelfattah MS, Gullón S, Braña AF, Rohr J, Méndez C, Salas, JA. (2008). Glycosylated derivatives of steffimycin: insights into the role of the sugar moieties for the biological activity. *Chembiochem.* 9: 624-633.

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(2): 532-539.

Onaka H, Mori Y, Igarashi Y, Furumai T. (2011). Mycolic acid-containing bacteria induce natural-product biosynthesis in *Streptomyces* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 400-406.

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.

1. Introducción

Parashar A, Colvin KR, Bignell DRD, Leskiw BK. (2009). BldG and SCO3548 interact antagonistically to control key developmental processes in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol.* 191: 2541-2550.

Park SS, Yang YH, Song E, Kim EJ, Kim WS, Sohng JK, Lee HC, Liou KK, Kim BG. (2009). Mass spectrometric screening of transcriptional regulators involved in antibiotic biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Ind Microbiol Biotechnol.* 36(8): 1073-1083.

Parker JL, Jones AM, Serazetdinova L, Saalbach G, Bibb MJ, Naldrett MJ. (2010). Analysis of the phosphoproteome of the multicellular bacterium *Streptomyces coelicolor* A3(2) by protein/peptide fractionation, phosphopeptide enrichment and high-accuracy mass spectrometry. *Proteomics.* 10(13): 2486-2497.

Pelechano V, Pérez-Ortín JE. (2008). The transcriptional inhibitor thiolutin blocks mRNA degradation in yeast. *Yeast.* 25: 85–92.

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): 2127-2140.

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.

Perez-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.

Potůcková L, Kelemen GH, Findlay KC, Lonetto MA, Buttner MJ, Kormanec J. (1995). A new RNA polymerase sigma factor, sigma F, is required for the late stages of morphological differentiation in *Streptomyces* spp. *Mol Microbiol.* 17(1): 37-48.

Qin Z, Baker AT, Raab A, Huang S, Wang TH, Yu Y, Jaspars M, Secombes CJ, Deng H. (2013). The fish pathogen *Yersinia ruckeri* produces holomycin and uses an RNA methyltransferase for self-resistance. *J Biol Chem.* 288: 14688-14697.

Qin Z, Huang S, Yu Y, Deng H. (2013b). Dithiopyrrolone natural products: isolation, synthesis and biosynthesis. *Mar Drugs*. 17; 11(10): 3970-3997.

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: 9651-9654.

Retzlaff L, Distler J. (1995). The regulator of streptomycin gene expression, StrR, of *Streptomyces griseus* is a DNA binding activator protein with multiple recognition sites. *Mol Microbiol.* 18(1): 151-162.

Rigali S, Nothaft H, Noens EE, Schlicht M, Colson S, Müller M, Joris B, Koerten HK, Hopwood DA, Titgemeyer F, van Wezel GP. (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: 1237-1251.

Rigali S, Titgemeyer F, Barends S, Mulder S, Thomae AW, Hopwood DA, van Wezel GP (2008). Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. *EMBO Rep.* 9: 670-675.

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.

Rodríguez-García A, Sola-Landa A, Apel K, Santos-Beneit F, Martín JF. (2009). Phosphate control over nitrogen metabolism in *Streptomyces coelicolor*: direct and indirect negative control of *glnR*, *glnA*, *glnII* and *amtB* expression by the response regulator PhoP. *Nucleic Acids Res.* 37: 3230-3242.

Ryding, NJ, Anderson TB, Champness WC. (2002). Regulation of the *Streptomyces coelicolor* calcium-dependent antibiotic by *absA*, encoding a cluster-linked two-component system. *J Bacteriol.* 184: 794-805.

Ryu YG, Butler MJ, Chater KF, Lee KJ. (2006). Engineering of primary carbohydrate metabolism for increased production of actinorhodin in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Environ Microbiol.* 72(11): 7132-7139.

1. Introducción

Salas JA, Méndez C. (2009). Indolocarbazole antitumour compounds by combinatorial biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol.* 13(2): 152-160.

Salowe SP, Krol WJ, Iwata-Reuyl D, Townsend CA. (1991). Elucidation of the order of oxidations and identification of an intermediate in the multistep clavaminic acid synthesis reaction. *Biochemistry.* 30: 2281-2292.

Sánchez C, Zhu L, Braña AF, Salas AP, Rohr J, Méndez C, Salas JA. (2005). Combinatorial biosynthesis of antitumor indolocarbazole compounds. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102(2): 461-466.

Sánchez L, AF Braña. (1996). Cell density influences antibiotic biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Microbiology.* 142: 1209-1220.

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(4): 968-981.

Santamarta I, Pérez-Redondo R, Lorenzana LM, Martín JF, 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: 824-835.

Santamarta I, Rodríguez-García A, Pérez-Redondo R, Martín JF, Liras P. (2002). CcaR is an autoregulatory protein that binds to the *ccaR* and *cefD-cmcl* promoters of the cephamycin C-clavulanic acid cluster in *Streptomyces clavuligerus*. *J Bacteriol.* 184: 3106-3113.

Santos-Beneit F, Rodríguez-García A, Sola-Landa A, Martín JF. (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: 53-68.

Sawai R, Suzuki A, Takano Y, Lee PC, Horinouchi S. (2004). Phosphorylation of AfsR by multiple serine/threonine kinases in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Gene.* 334: 53-61.

Schell MA. (1993). Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol.* 47: 597-626.

Schrempf H. (2001). Recognition and degradation of chitin by streptomycetes. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 79: 285-289.

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: 687-694.

Sheldon PJ, Busarow SB, Hutchinson CR. (2002). Mapping the DNA-binding domain and target sequences of the *Streptomyces peucetius* daunorubicin biosynthesis regulatory protein, Dnrl. *Mol Microbiol.* 44(2): 449-460.

Shima J, Hesketh A, Okamoto S, Kawamoto S, Ochi K. (1996). Induction of actinorhodin production by *rpsL* (encoding ribosomal protein S12) mutations that confer streptomycin resistance in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* 178: 7276-7284.

Shiozawa H, Kagasaki T, Haruyama H, Domon H, Utsui Y, Kodama K, Takahashi S. (1993). Thiomarinol, a new hybrid antimicrobial anti-biotic produced by a marine bacterium: fermentation, isolation, structure, and antimicrobial activity. *J Antibiot.* 46: 1834-1842.

Shiozawa H, Kagasaki T, Torikata A, Tanka N, Fujimoto K, Hata T, Furukawa Y, Takahashi S. (1995). Thiomarinol B and C, new antimicrobial antibiotics produced by a marine bacterium. *J. Antibiot.* 48: 907-909.

Shiozawa H, Shimada A, Takahashi S. (1997). Thiomarinol D, E, F and G, new hybrid antimicrobial antibiotic produced by a marine bacterium: fermentation, isolation, structure and antimicrobial activity. *J. Antibiot.* 50: 449-452.

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): 1149-1160.

Sola-Landa A, Moura RS, Martín JF. (2003). The two-component PhoR–PhoP system controls both primary metabolism and secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces lividans*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100: 6133-6318.

Sola-Landa A, Rodríguez-García A, Franco-Domínguez E, Martín JF. (2005). Binding of PhoP to promoters of phosphate regulated genes in *Streptomyces coelicolor*: identification of PHO boxes. *Mol Microbiol.* 56: 1373-1385.

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.

Speck C, Messer W. (2001). Mechanism of origin unwinding: sequential binding of DnaA to double- and single-stranded DNA. *EMBO J.* 20(6): 1469-1476.

1. Introducción

Tahlan K, Anders C, Jensen SE. (2004). The paralogous pairs of genes involved in clavulanic acid and clavam metabolite biosynthesis are differently regulated in *Streptomyces clavuligerus*. *J Bacteriol.* 186: 6286-6297.

Tahlan K, Anders C, Wong A, Mosher RH, Beatty PH, Brumlik MJ, Griffin A, Hughes C, Griffin J, Barton B, Jensen SE. (2007). 5 S clavam biosynthetic genes are located in both the clavam and paralog gene clusters in *Streptomyces clavuligerus*. *Chem Biol.* 14: 131-142.

Takano E, Gramajo HC, Strauch E, Andres N, White J, Bibb MJ. (1992). Transcriptional regulation of the *redD* transcriptional activator gene accounts for growth-phase-dependent production of the antibiotic undecylprodigiosin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol.* 6(19): 2797-2804.

Takano E. (2006). Gamma-butyrolactones: *Streptomyces* signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation. *Curr Opin Microbiol.* 9: 287-294.

Tomono A, Tsai Y, Ohnishi Y, Horinouchi S. (2005a). Three chymotrypsin genes are members of the AdpA regulon in the A-factor regulatory cascade in *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol.* 187: 6341-6353.

Traag BA, van Wezel GP. (2008). The SsgA-like proteins in actinomycetes: small proteins up to a big task. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 94(1): 85-97.

Tsai HH, Huang CH, Tessmer I, Erie DA, Chen CW. (2011). Linear *Streptomyces* plasmids form superhelical circles through interactions between their terminal proteins. *Nucleic Acids Res.* 39(6): 2165-2174.

Turner WB. (1973). Secondary metabolism with special reference to Actinomycetales. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser.* 2: 209-217.

Turpin PE, Dhir VK, Maycroft KA, Rowlands C, Wellington EMC. (1992). The effect of *Streptomyces* species on the survival of Salmonella in soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 101: 271-280.

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: 135-142.

Umeyama T, Lee PC, Horinouchi S. (2002). Protein serine/threonine kinases in signal transduction for secondary metabolism and morphogenesis in *Streptomyces*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 59(4-5): 419-425.

Usui S, Yu CA. (1989). Purification and properties of isopenicillin N epimerase from *Streptomyces clavuligerus*. *Biochim Biophys Acta*. 999(1): 78-85.

Van Keulen G, Alderson J, White J, Sawers RG. (2005a). Nitrate respiration in the actinomycete *Streptomyces coelicolor*. *Biochem Soc Trans*. 33: 210-212.

van Keulen G, Alderson J, White J, Sawers RG. (2007). The obligate aerobic actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2) survives extended periods of anaerobic stress. *Environ Microbiol*. 9: 3143- 3149.

Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, van Sinderen D. (2007). Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol Mol Biol Rev*. 71: 495-548.

Volff JN, Altenbuchner J. (2000). A new beginning with new ends: linearisation of circular chromosomes during bacterial evolution. *FEMS Microbiol Lett*. 186: 143-150.

Wada K. (1979). Allophane and dimogolite. In *Minerals in Soil Environments*. Eds., J.B.Dixon and S.B. Weed, pp.603- 638, Soil Sci.Soc., America.

Waksman SA, Henrici AT. (1943). The Nomenclature and Classification of the Actinomycetes. *J Bacteriology*. 46(4): 337-341.

Ward AC, Bora N. (2006). Diversity and biogeography of marine actinobacteria. *Curr Opin Microbiol*. 9(3): 279-286.

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.

Watve MG, Tickoo R, Jog MM, Bhole BD. (2001). How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch Microbiol*. 176(5): 386-390.

Webster JM, Li J, Chen G. (2000). Anticancer property of dithiopyrrolones. U.S. patent number 6,020,360.

Whitney JG, Brannon DR, Mabe JA, Wicker KJ. (1972). Incorporation of labeled precursors into A16886B, a novel β -lactam antibiotic produced by *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1(3): 247-251.

Wietz M, Mansson M, Gotfredsen CH, Larsen TO, Gram L. (2010). Antibacterial compounds from marine Vibrionaceae isolated on a global expedition. *Mar Drugs*. 8: 2946-2960.

1. Introducción

Wietzorrek A, Bibb M. (1997). A novel family of proteins that regulates antibiotic production in streptomycetes appears to contain an OmpR-like DNA-binding fold. *Mol Microbiol.* 25: 1181-1184.

Willey J, Schwedock J, Losick R. (1993). Multiple extracellular signals govern the production of a morphogenetic protein involved in aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor*. *Genes Dev.* 7: 895-903.

Willey JM, Willems A, Kodani S, Nodwell JR. (2006). Morphogenetic surfactants and their role in the formation of aerial hyphae in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol.* 59(3): 731-742.

Wilson DJ, Xue Y, Reynolds KA, Sherman DH. (2001). Characterization and analysis of the PikD regulatory factor in the pikromycin biosynthetic pathway of *Streptomyces venezuelae*. *J Bacteriol.* 183: 3468-3475.

Wolanski M, Donczew R, Kois-Ostrowska A, Masiewicz P, Jakimowicz D, Zakrzewska-Czerwinska J. (2011b). The level of AdpA directly affects expression of developmental genes in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol.* 193(22): 6358-6365.

Wolański M, Jakimowicz D, Zakrzewska-Czerwińska J. (2012). AdpA, key regulator for morphological differentiation regulates bacterial chromosome replication. *Open Biol.* 2(7): 120097.

Wu X, Roy KL. (1993). Complete nucleotide sequence of a linear plasmid from *Streptomyces clavuligerus* and characterization of its RNA transcripts. *J Bacteriol.* 175(1): 37-52.

Xiao XF, Wolfe S, Demain AL. (1991). Purification and characterization of cephalosporin 7 alpha-hydroxylase from *Streptomyces clavuligerus*. *Biochem J.* 280 (Pt 2): 471-474.

Xu Q, Traag BA, Willemse J, McMullan D, Miller MD, Elsliger MA, Abdubek P, Astakhova T, Axelrod HL, Bakolitsa C, Carlton D, Chen C, Chiu HJ, y col. (2009). Structural and functional characterizations of SsgB, a conserved activator of developmental cell division in morphologically complex actinomycetes. *J Biol Chem.* 284(37): 25268-25279.

Yagüe P, López-García MT, Rioseras B, Sánchez J, Manteca A. (2013). Pre-sporulation stages of *Streptomyces* differentiation: state-of-the-art and future perspectives. *FEMS Microbiol Lett.* 342(2): 79-88.

Yamazaki H, Ohnishi Y, Horinouchi S. (2000). An A-factor-dependent extracytoplasmic function sigma factor (σ^{AdsA}) that is essential for morphological development in *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol.* 182: 4596-4605.

Yamazaki H, Ohnishi Y, Horinouchi S. (2003a). Transcriptional switch on of *ssgA* by A-factor, which is essential for spore septum formation in *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol.* 185: 1273-1283.

Yamazaki H, Takano Y, Ohnishi Y, Horinouchi S. (2003b). *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.

Yim G, Wang HH, Davies J. (2007). Antibiotics as signalling molecules. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 362(1483): 1195-1200.

Yu H, Serpe E, Romero J, Coque JJ, Maeda K, Oelgeschläger M, Hintermann G, Liras P, Martín JF, Demain AL, y col. (1994). Possible involvement of the lysine epsilon-aminotransferase gene (*lat*) in the expression of the genes encoding ACV synthetase (*pcbAB*) and isopenicillin N synthase (*pcbC*) in *Streptomyces clavuligerus*. *Microbiology.* 140(Pt 12): 3367-3377.

Zerikly M, Challis GL. (2009). Strategies for the discovery of new natural products by genome mining. *Chembiochem.* 10(4): 625-633.

Zhang CC. (1996). Bacterial signalling involving eukaryotic-type protein kinases. *Mol Microbiol.* 20(1): 9-15.

2.Objetivos

El tema del proyecto de tesis doctoral inicialmente presentado fue titulado "Análisis transcriptómico diferencial entre *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 y mutantes alterados en la producción de antibióticos". A partir de los resultados transcripcionales obtenidos mediante micromatrices, se abordaron nuevos objetivos de trabajo a los propuestos inicialmente. Los objetivos planteados en la presente tesis doctoral han sido los siguientes:

1. Análisis comparado de la expresión génica en las cepas mutantes *S. clavuligerus* $\Delta ccaR::tsr$, *S. clavuligerus* $\Delta claR$ y *S. clavuligerus* $oppA2::aph$ con su cepa parental *S. clavuligerus* ATCC 27064.
2. Estudio del efecto de la eliminación del megaplásmido pSCL4: Análisis morfológico y de la producción de metabolitos secundarios en la cepa *S. clavuligerus* pSCL4⁻.
3. Caracterización de la agrupación biosintética de ácido clavulánico en otros actinomicetos.
4. Producción de nuevos compuestos bioactivos en *S. clavuligerus* ATCC 27064.

3. Resultados

Publicaciones

Los resultados de la presente tesis doctoral son el resultado de cuatro publicaciones científicas, tres de ellas aceptadas y una cuarta actualmente en proceso de evaluación .

- **Álvarez-Álvarez, R., Rodríguez-García, A., Santamarta, I., Redondo-Pérez R., Prieto-Domínguez, A., Martínez-Burgo, Y., Liras, P.** (2014). Transcriptomic analysis of *Streptomyces clavuligerus* $\Delta ccaR::tsr$ effects of CcaR on global regulation. *Microbial Biotechnology*. 7: 221-231.
Factor de impacto: 3,023 (2013)
- **Álvarez-Álvarez, R., Rodríguez-García, A., Martínez-Burgo, Y., Robles-Reglero, V., Santamarta, I., Pérez-Redondo, R., Martín, J.F., Liras, P.** (2014). A 1.8-Mb-reduced *Streptomyces clavuligerus* genome: relevance for secondary metabolism and differentiation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 98: 2183-2195.
Factor de impacto: 3,811 (2013)
- **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.
Factor de impacto: 3,811 (2013)
- **Álvarez-Álvarez, R., Botas, A., Albillos, S.M., Rumbero, A., Martín J.F., Liras, P.** Molecular genetics of naringenin biosynthesis, a typical plant secondary metabolite produced by *Streptomyces clavuligerus*.
Manuscrito en evaluación en Molecular Microbiology
Factor de impacto: 5,026 (2013)

Además de las publicaciones científicas presentadas como resultados, el doctorando a participado como coautor en los siguientes trabajos:

- **Santamarta, I., López-García, M.T., Kurt, A., Nárdiz, N., Álvarez-Álvarez, R., Pérez-Redondo, R., Martín, J.F., and Liras, P.** (2011). Characterization of DNA-binding sequences for CcaR in the cephamycin-clavulanic acid supercluster of *Streptomyces clavuligerus*. *Mol Microbiol*. 81: 968-981.

3. Resultados

- **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*. *Applied Microbiol Biotechnol.* 97: 5869-5880.
- **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.
- **Martínez-Burgo, Y., Álvarez-Álvarez, R., Redondo-Pérez, R., and Liras, P.** (2014). Heterologous expression of *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 cephamycin C gene cluster. *Journal of Biotechnology.* 186: 21-29.

3.1. Resultados

Capítulo I

Transcriptomic analysis of *Streptomyces clavuligerus* $\Delta ccaR::tsr$: effects of CcaR on global regulation.

Álvarez-Álvarez, R.^{1,2}, Rodríguez-García, A.^{1,2}, Santamarta, I.², Pérez-Redondo, R.², Prieto-Domínguez, A.¹, Martínez-Burgo, Y.¹, and Liras, P.^{1,2}

¹ Área de Microbiología, Departamento de Biología Molecular. Facultad de CC. Biológicas y Ambientales. Universidad de León, 24071 León, Spain.

² Instituto de Biotecnología de León (INBIOTEC). Parque Científico de León, Avda. Real nº1, 24006 León, Spain.

Running Title: *Streptomyces clavuligerus* $\Delta ccaR::tsr$ transcriptomic.

Key words: *Streptomyces clavuligerus*, CcaR, SARP regulator, clavulanic acid, cephamycin C, holomycin.

3.1.1. SUMMARY

S. clavuligerus ATCC 27064 and *S. clavuligerus* $\Delta ccaR::tsr$ cultures were grown in SA medium and samples were taken in the exponential and stationary growth phases. Transcriptomic analysis showed that the expression of one hundred and eighty six 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 and 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 CcaR (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 up-regulated. 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 RT-qPCR 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.

3.1.2. INTRODUCTION

Streptomyces species are the largest group of antibiotic-producing microorganisms. 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 LAL-type (Antón *et al.*, 2004; Wilson *et al.*, 2001; Tahlan *et al.*, 2007) are present in several clusters, but the most common ones are the activator proteins belonging to the SARP (*S*treptomyces *a*ntibiotic *r*egulatory *p*roteins) family. They are present in many antibiotic clusters (Garget *et al.*, 2010; He *et al.*, 2010; Bate *et al.*, 2002 and 2006) and bind specific DNA sequences activating expression of antibiotic biosynthesis genes.

Cephamycin C biosynthesis in *S. cattleya* is controlled by a SARP-type protein encoded by *thnU*, a gene which is not located in the cephamycin C cluster (Rodríguez *et al.*, 2008). In *S. clavuligerus*, a similar protein, 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 clavulanic acid cluster, CcaR binds sequences upstream of *ceaS2*, which encodes the first enzyme of the CA pathway, and of *claR*, for the Lys-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 (The 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 *S. 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* Δ *ccaR::tsr*, a strain lacking the SARP regulator that controls cephamycin C and CA biosynthesis.

3.1.3. RESULTS

Transcriptomic analysis of antibiotic biosynthesis genes in *S. clavuligerus* ATCC27064 and *S. clavuligerus* $\Delta ccaR::tsr$.

S. clavuligerus ATCC 27064 and *S. clavuligerus* $\Delta ccaR::tsr$ cultures were grown in SA medium and samples were taken in the exponential and stationary growth phases (**Figure 3.1.1**) as indicated in Experimental Procedures. The microarrays analysis showed differences in expression in one hundred and eighty six genes of the *ccaR*-negative mutant at one specific sampling time at least (**Table 3.1.1**).

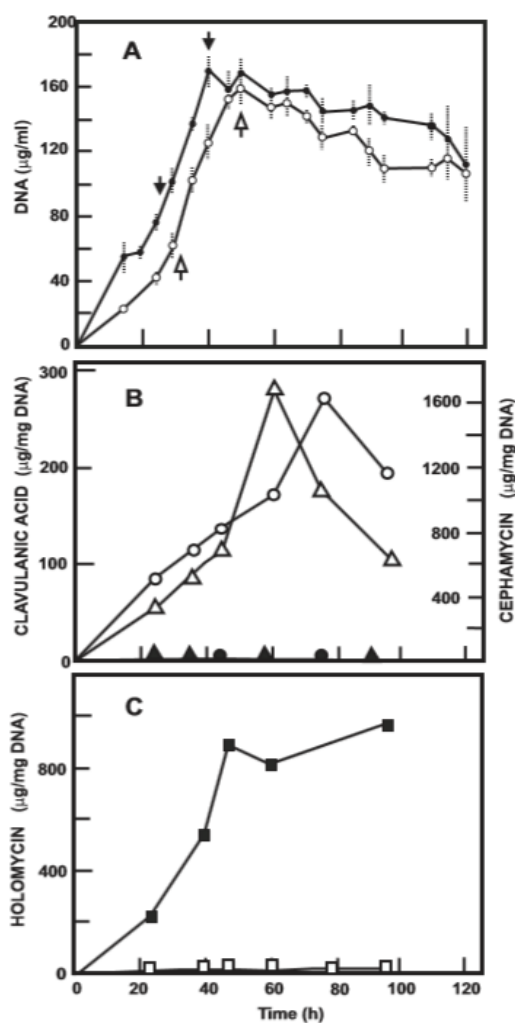


Figure 3.1.1. Growth and antibiotic production in SA medium. Strains used: *S. clavuligerus* ATCC 27064 (open symbols) and *S. clavuligerus* $\Delta ccaR::tsr$ (closed symbols). **A)** Growth (circles) as measured by the DNA content. **B)** Cephamycin C (circles) or clavulanic acid (triangles) production. **C)** Holomycin production (squares).

3.1. Resultados. Capítulo I

These genes belong to the cephamycin C gene cluster, clavulanic acid gene cluster, clavams, holomycin, cellular differentiation, carbon and nitrogen, amino acids or phosphate metabolism and energy production.

Clavulanic acid 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 *clvR*, encoding the regulatory protein ClvR, 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* of cytochrome P450, and *pcbR*, all of them 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 *ccaR* promoter in the *ccaR*-mutant. The second gene, *blip*, encoding a well characterized β -lactamase inhibitory protein, 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 (López-García *et al.*, 2010), was also slightly down-regulated.

Genes for clavulanic acid precursors.

CA biosynthesis occurs through condensation of arginine and glyceraldehyde-3-phosphate by carboxyethylargininesynthase (CEAS), the first enzyme of the CA pathway. *S. clavuligerus* and *S. coelicolor* probes of genes for arginine biosynthesis and glycerol utilization were present in the microarrays.

The arginine biosynthesis genes were down regulated 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 *gylR* 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, since *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 cephamycin C biosynthesis, the transcriptomic data fitted well with those previously obtained by RT-PCR (Santamarta *et al.*, 2011). The M_c values for *lat*, *cmcl*, *cmcl*, *cefD* and *ceffF*, 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 cephamycin 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 *et al.* (2002). A down regulation 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 down-regulated in the *ccaR*-deleted mutant.

Nitrogen and phosphate metabolism.

The lack of CcaR and, therefore, of clavulanic acid and cephamycin C formation, affected nitrogen metabolism. A strong downregulation was observed in the exponential phase in the expression of the ammonium transporter encoding gene

3.1. Resultados. Capítulo I

amtB (M_c -4.1) and the downstream gene, *glnB* (M_c -4.39), which encodes the uridyltransferase 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 synthetase (*glnA3*, *glnA2*, *glnA1*) were under expressed in the *ccaR*-deleted mutant (M_c -4.67, -3.56 and -1.77) in the exponential phase. A weaker, but clear down regulation 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* $\Delta ccaR::tsr$ mRNA in relation to *S. clavuligerus* ATCC 27064 mRNA. This might indicate that cephamycin C and clavulanic acid 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 thirteen genes encoding different types of regulators was affected in the mutant, including *adpA* (see above). A very strong downregulation was observed for the *whiB* gene, for a 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 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) (**Table 3.1.S1**).

Validation studies.

RT-qPCR. The validation of many genes differentially expressed in this transcriptomic analysis has already been carried out using proteomics or RT-qPCR (Santamarta *et al.*, 2011). Such is the case for all the down-regulated genes of the clavulanic acid pathway and for the *lat*, *cmcl*, *cefD* or *cmcT* genes in the cephamycin C gene cluster.

Other differentially regulated genes present in **Tables 3.1.1** and **3.1.S1** were validated by quantitative real time PCRs performed on reverse transcribed RNA samples. A total of 15 genes (*pcbC*, *pcd*, *claR*, *ceaS2*, *blip*, *hlml*, *hlmA*, *gapA2*, *glnA1*, *glnA2*, SCLAV_4359, SCLAV_3668, *mprA2*, SCLAV_5661 and, as control, *hrdB*) were chosen for analysis (**Fig.3.1.2**). The Pearson's correlation coefficient ($R^2 = 0.9243$) between M_c values and relative expression values of RT-qPCR 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. 3.1.2C**) 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.

3.1.4. DISCUSSION

A transcriptomic study reveals the complete gene expression in a microorganism, allowing the comparison of overproducing strains and wild type strains (Medema *et al.*, 2010). However, while this method is convenient for understanding

3.1. Resultados. Capítulo I

the metabolic flow in industrial strains, these strains have been obtained through heavy mutagenesis and selection programs; therefore, the final results observed might

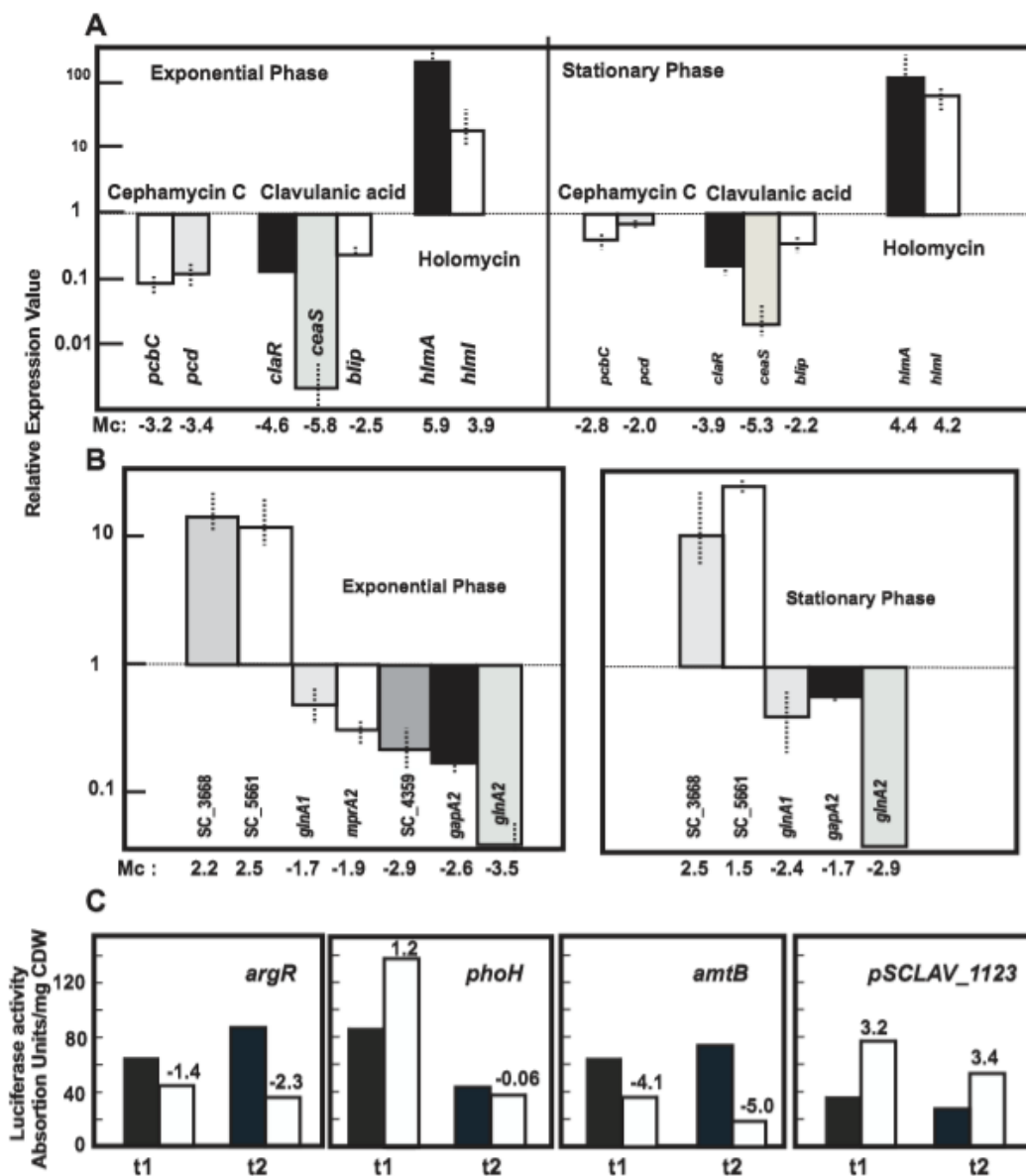


Figure 1.1. Validation of the microarray results by RT-qPCR. Quantitative RT-PCR of genes indicated below using the oligonucleotides shown in **Table 3.1.S2**. The relative values are referred to 1, assigned relative value for the expression of each gene in *S. clavuligerus* ATCC 27064. Error bars were 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. *S. clavuligerus* ATCC 27064 (black bars), *S. clavuligerus* Δ ccaR::tsr (white bars). The numbers indicate for each gene the relative M_c values of *S. clavuligerus* Δ ccaR::tsr for each gene.

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 *et al.*, 1998). As expected, the clavulanic acid 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 down-regulated 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, EMSA 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 down-regulated in the *ccaR*-mutant, perhaps due to a co-transcription with the *ccaR* gene located upstream.

Medema *et al.* (2010) found several uncharacterized gene clusters, including one for 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*-knock out 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 *et al.* (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' clavulanic acid cluster, including the *cvm7* gene, encoding a LAL regulator, was weakly down-regulated except for the *cas1* and *orf8* genes, encoding the clavamate synthetase 1 isoenzyme and a serine hydroxymethyltransferase, which were strongly downregulated. This result contrasts with that of Medema *et al.* (2010) who described a significant overexpression of all these genes in the CA overproducing mutant that overexpresses *ccaR*.

3.1. Resultados. Capítulo I

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 to the two-fold expression increase observed for these genes by Medema *et al.* (2010) in the high clavulanic acid-producing strain; however, our result in the *gap2* gene, for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2, indicates that this gene is down-regulated (0.16-fold), confirming what was observed by Medema *et al.* (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 clavulanic acid 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 clavulanic acid and cephamycin C production directly affects the flow of these pathways.

3.1.5. EXPERIMENTAL PROCEDURES

Culture conditions.

S. clavuligerus ATCC 27064 and the mutants *S. clavuligerus* $\Delta ccaR::tsr$ (Alexander *et al.*, 1998) and *S. clavuligerus* *ccaR::aph* (Pérez-Llarena *et al.*, 1997) were used in this work. Strain *S. clavuligerus* $\Delta ccaR::tsr$ was chosen for the transcriptomic experiments since the *ccaR* was deleted. To determine the more homogeneous and repetitive conditions for RNA sampling, the wild type strain and *S. clavuligerus* $\Delta ccaR::tsr$ were grown in SA medium and DNA, cell dry weight and antibiotics production were analyzed. TSB 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 semi-defined SA medium (starch-asparagine) (Aidoo *et al.*, 1994). The cultures were maintained at 28°C with 220 rpm shaking. Exponential phase sampling was done when the cultures reached a DNA content of 75 and 80 µg/ml in the wild type and the mutant (24 and 32 h, respectively) and 160 and 170 µg DNA/ml in the wild type and the mutant for the early stationary phase (40 and 50 hours, respectively) (**Figure 3.1.1**).

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 *et al.* (2013).

Labelling and Microarray hybridizations

S. clavuligerus microarrays were obtained from Agilent Technologies, in the Agilent 8x15K 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 Labeling Systems (Life Technologies). Total RNA was labelled with Cy3-dCTP (Amersham) using random primers and Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). gDNA was labelled 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 labelling efficiencies were quantified spectrophotometrically. Cy3-cDNA (300 ng) and Cy5-labeled 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; 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 *et al.* (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 vs. 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

3.1. Resultados. Capítulo I

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 NCBI-GEO Database under accession number GSE51435.

RT-qPCR

The oligonucleotide primers used in this work are shown in **Table 3.1.S2** (Supporting Information). All PCR reactions were performed using total DNA of *S. clavuligerus* strains as a template in a T-gradient (Biometra) thermocycler. The PCR reaction (30 μ l) was performed as described by Kieseret *al.* (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 touch-down 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).

Gene expression analysis by RT-qPCR was performed as previously described (López-García *et al.*, 2010). *S. 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) to eliminate DNA. Negative controls on RT-qPCR 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 (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 *et al.* (2012). At least two different cultures from the same strain were analysed for luminescence production and measured in triplicate.

Acknowledgement. We acknowledge the reception of *S. clavuligerus* $\Delta ccaR::tsr$ from Prof. S. E. Jensen. *S. clavuligerus* gene sequences were obtained from DSM (The Netherlands). 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. R. Álvarez-Álvarez and Y. Martínez-Burgo received FPU fellowships from the Ministry of Science and Innovation.

3.1.6. BIBLIOGRAPHY

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.

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.

Antón, N., Mendes. M.V., Martín, J.F., and Aparicio J.F. (2004). Identification of PimR as a positive regulator of pimarin biosynthesis in *Streptomyces natalensis*. *J. Bacteriol.* 186: 2567-2575.

Baños, S., Pérez-Redondo, R., Koekman, B., 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.

3.1. Resultados. Capítulo I

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 VImI 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 MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. (2000). Practical *Streptomyces* Genetics. John Innes Foundation. Norwich, U.K.

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* $\Delta adpA$ -deleted mutant. *Microbiology.* 156: 2354–2365.

Martín, J.F., and Liras P. (2010). Engineering of Regulatory Cascades and Networks Controlling Antibiotic Biosynthesis in *Streptomyces*. *Current Op. in 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 *clavR* 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., Liras P. (2012). ArgR of *Streptomyces coelicolor* is a versatile regulator. *PLoSOne.* 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 MT, Kurt A, Nárdiz N, Alvarez-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.

Sartor, M., Schwanekamp, 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.

3.1. Resultados. Capítulo I

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.

3.2. Resultados

Capítulo II

A 1.8 Mb-reduced *Streptomyces clavuligerus* genome: Relevance for secondary metabolism and differentiation.

Álvarez-Álvarez, R.^{1,2}, Rodríguez-García, A.^{1,2}, Martínez-Burgo, Y.¹, Robles-Reglero, V.^{1,2}, Santamarta, I.², Pérez-Redondo, R.², Martín, JF.¹ and Liras, P^{1,2}.

¹Área de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad de León, 24071 León, Spain.

²Instituto de Biotecnología de León, INBIOTEC, Parque Científico de León, Avda. Real nº1, 24006 León, Spain.

Running Title: A *Streptomyces clavuligerus* mini-genome.

Key words: *Streptomyces clavuligerus*, clavulanic acid, holomycin, linear plasmids, pSCL4.

3.2.1. ABSTRACT

A large part (21%) of the wild type *S. 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, 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: i) a normal copy number of the linear plasmids, ii) completely lack of the linear plasmids, and iii) a *parA-parB*_{pSCL4} mutant what resulted in lack of pSCL4. In addition, a strain with a functional *oppA2* gene was constructed lacking the megaplasmid pSCL4. The

3.2. Resultados. Capítulo II

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.

3.2.2. INTRODUCTION

S. 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 Wals, 2010; Robles-Reglero *et al.*, 2013) a dithiopyrrolone 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* 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 (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 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 behaviour of these linear plasmid-free strains indicates that the linear plasmids have an important role on secondary metabolites biosynthesis and differentiation.

3.2.3. MATERIALS AND METHODS

Culture conditions and strains.

The origin and characteristics of the *Streptomyces* strains used in this work is shown in **Table 3.2.1**. To start *Streptomyces* seed liquid cultures the strains were grown in 100 ml of TSB (Tryptic Soy Broth) 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 hours 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 3.2.1**.

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 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 (O.D._{600 nm}) of 7 to 10. Ten ml of this 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

3.2. Resultados. Capítulo II

(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).

Strain	Origin	Characteristics of the strain
<i>S. clavuligerus</i> ATCC 27064	ATCC	Wild type strain.
<i>S. clavuligerus oppA2::aph</i> (renamed <i>S. clavuligerus oppA2::aph pSCL^{low}</i>)	Lorenzana <i>et al.</i> , 2004	Clavulanic acid non-producer, holomycin overproducer strain. Kanamycin resistant. Non sporulating strain. Carry low copy number of pSCL1, pSCL2 and pSCL4.
<i>S. clavuligerus oppA2::aph pSCL⁻</i>	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 pSCL⁺</i>	This work	Clavulanic acid non-producer, holomycin low producer strain. Apramycin resistant. Carry normal copy number of pSCL1, pSCL2 and pSCL4.
<i>S. clavuligerus pSCL4⁻</i>	This work	Holomycin producer strain. Non sporulating.
<i>S. clavuligerus ΔoppA2::acc pSCL4⁻</i>	This work	Clavulanic acid non-producer, holomycin overproducer strain. Apramycin resistant. Non sporulating. Carry normal copy number of pSCL1 and pSCL2. It lacks pSCL4.
<i>S. clavuligerus ΔccaR::tsr</i>	Wang <i>et al.</i> , 2004	Clavulanic acid, cephamycin C non producer. Thiostrepton resistant.

Table 3.2.1. Characteristic of the *Streptomyces* strains used in this work

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 twenty four 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 for SCLAV_p0126, SCLAV_p1328 and SCLAV_p1452 whereas using DNA from the wild type strain the expected 413 bp, 430

bp and 421 bp DNA bands corresponding to each gene amplification were observed. The strain was deposited in the University of Leon culture collection under the number ULCC-701.

S. clavuligerus Δ oppA2::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 3.2.S1**. Four exconjugants designed *S. clavuligerus* Δ oppA2::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 pSCL4⁻, 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^R system 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 Leon culture collection under the number ULCC-702.

S. clavuligerus Δ oppA2::acc pSCL4⁻. This double deletion strain was obtained as indicated before for *S. clavuligerus* Δ oppA2::acc pSCL⁺ but using *S. clavuligerus* pSCL4⁻, 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 6 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.

3.2. Resultados. Capítulo II

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 value above 7.0 were used.

Polymerase chain reactions (PCR) and RT-PCR analysis

Oligonucleotide primers used in this work are shown in **Table 3.2.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 μ l volume: 30 nM DNA template, 0.2 mM dNTP's 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°C 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 μ g each, Superscript™ One-Step RT-PCR mixed Platinum® Taq (Invitrogen) 0.3 μ l and 0.05% DMSO 1 μ l. 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 μ l) instead of the Superscript™ One-Step RT-PCR/Platinum® Taq mixture.

Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) and qPCR.

Gene expression analysis by 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.

Labelling and Microarray Hybridizations.

S. clavuligerus microarrays were obtained from Agilent Technologies, in the format of Agilent 8x15K. 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 7728 chromosomal genes (out of 7825) of *S. 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. Labelling reactions were performed according to the recommendations described by BioPrime® Array CGH Genomic Labeling Systems (Life Technologies). Total RNA was labelled with Cy3-dCTP (Amersham) using random primers and SuperScript™ II reverse transcriptase (Invitrogen). gDNA was labelled 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 labelling 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 2000; 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.

3.2.4. 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 of growth (t2) 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 3.2.2**) are located in plasmid pSCL2, and forty genes belong to the megaplasmid pSCL4 (**Table 3.2.3**) 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 an decrease in expression of the plasmid-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. 3.2.1A**) 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. 3.2.1B**). As shown in **Fig. 3.2.1A** 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.

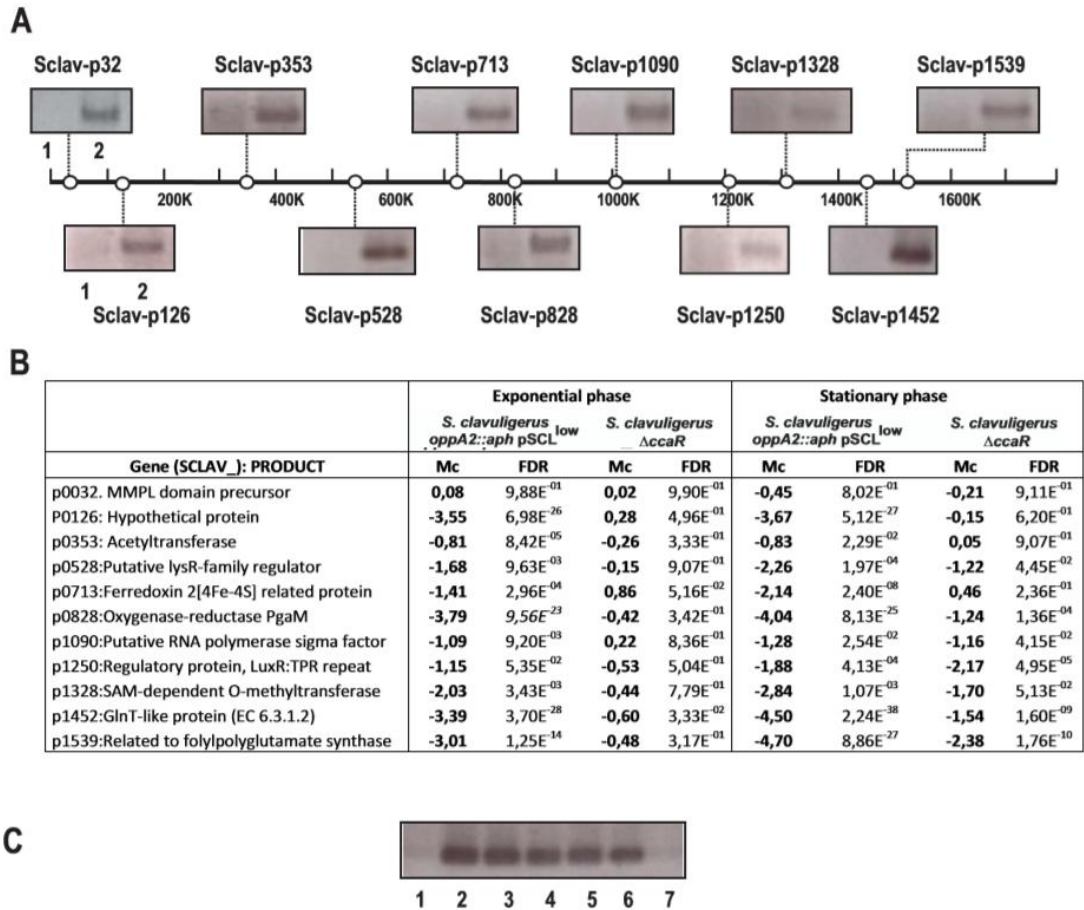


Figure 3.2.1. Expression of genes located in the megaplasmid pSCL4 of *S. clavuligerus*.

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 eleven genes tested in pSCL4 in *S. clavuligerus oppA2::aph* pSCL^{low} and *S. clavuligerus* Δ *ccaR*. **C)** PCR amplification of the *parA*_{pSCL2} gene in: (1) *S. clavuligerus oppA2::aph* pSCL^{low} (1), *S. clavuligerus* ATCC 27064 (2), *S. clavuligerus* Δ *oppa2::acc* pSCL⁺ (3,4), *S. clavuligerus* Δ *ccaR* (5,6). Negative control without DNA (7).

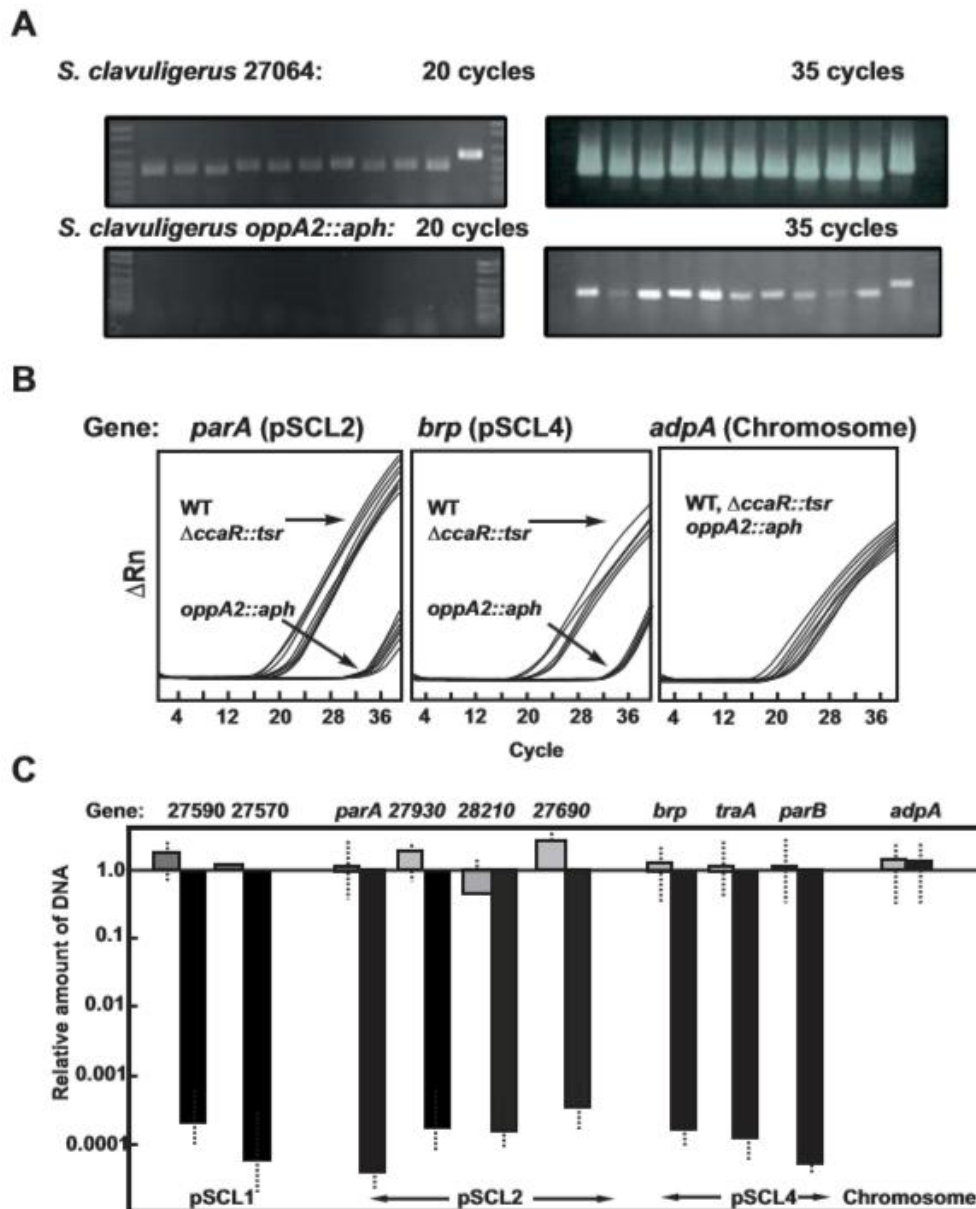


Figure 3.2.2. Quantification of *S. clavuligerus* plasmids by PCR and qPCR. A) PCR amplification of the 11 genes studied in **Fig. 3.2.1** (in the same order) after 20 PCR cycles (left panel) and 35 cycles (right panel) of amplification using total DNA from *S. clavuligerus* ATCC 27064 (upper panels) 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, SclaA2_010100027690), *brp*, *traA* and *parB* (all in pSCL4) and the chromosomal *adpA* gene in *S. clavuligerus* $\Delta ccaR$ (gray bars), and *S. clavuligerus oppA2::aph* pSCL^{low} (black bars).

Plasmids pSCL1, pSCL2 and pSCL4 are present in very low copy number in the *S. clavuligerus oppA2::aph*.

The presence of the plasmids pSCL4 and pSCL2 in the *oppA2* mutant was also tested by PCR (**Figs. 3.2.1C and 3.2.2A**) 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. 3.2.2A**) and also in the control strain *S. clavuligerus ΔccaR::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. 3.2.2A**). 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 (*parB*_{pSCL4}, *traA*) involved in plasmid stability and for genes involved in regulation of antibiotic production (*brp*) (**Fig. 3.2.2B and C**) and 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 twenty-five thousand-fold lower in *S. clavuligerus oppA2::aph* than in the wild type strain and other genes tested were in the order of ten thousand fold lower. Similarly, as shown by qPCR, *brp*, *traA* and *parB*_{pSCL4}, located in the megaplasmid pSCL4, were present only in trace amounts (10^4 lower concentration than in the parental strain) as occurs with the genes located in pSCL1. In contrast, in the control strain *S. clavuligerus ΔccaR::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. 3.2.2C**). 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 3.2.1**. The three strains indicated below knocked-out in *oppA2* were unable to produce clavulanic acid, although they are different in other characteristics as follow:

3.2. Resultados. Capítulo II

S. clavuligerus $\Delta oppA2::acc$ 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), produced aerial mycelium and sporulated in ME plates as the wild type strain. 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. 3.2.3**) 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.

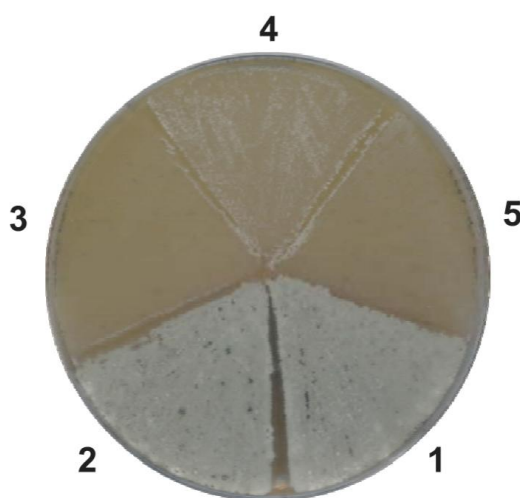


Figure 3.2.3. Effect of the presence of plasmids on the morphologic differentiation of *S. clavuligerus* strains. The strains were grown in ME plates. **1)** *S. clavuligerus* ATCC 27064, **2)** *S. clavuligerus* $\Delta oppA2::acc$ pSCL⁺, **3)** *S. clavuligerus* $\Delta oppA2::acc$ pSCL⁻ **4)** *S. clavuligerus* pSCL⁻ and **5)** *S. clavuligerus* *oppA2::aph* pSCL⁻.

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. 3.2.3**).

S. clavuligerus pSCL⁻. 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. 3.2.4**), amplification of 9 genes located in pSCL4 did not give amplification after 35 cycles of PCR. However, 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. 3.2.4). These results indicates that the different linear plasmids have distinct *parA-parB* genes.

S. clavuligerus $\Delta oppA2::acc$ 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. 3.2.3). Since the only common characteristic of the three strains, and the only difference with plasmid-containing *S. clavuligerus* $\Delta oppA2::acc$ 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.

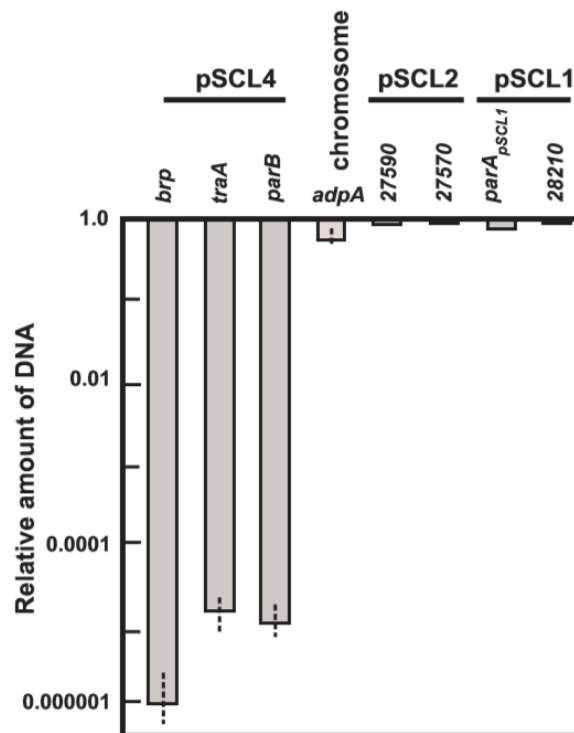


Figure 3.2.4. Linear plasmids present in *S. clavuligerus* pSCL4⁻. Study of genes located in pSCL4, pSCL1, pSCL2 and in the chromosome as shown by qPCR. The location of the tested genes is indicated above.

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 of 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.

3.2. Resultados. Capítulo II

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. 3.2.5** 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. 3.2.5**, 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. 3.2.5** middle left panel). Clavulanic acid biosynthesis only depends on a functional *oppA2* gene as shown by comparing *S. clavuligerus* pSCL⁺ and *S. clavuligerus* $\Delta oppA2::acc$ pSCL⁺ (**Fig. 3.2.5** lower left panel). This result confirms previous reports indicating that *oppA2* is essential for CA biosynthesis.

Production of holomycin. Holomycin production (**Fig. 3.2.5** central panels) by the wild type strain is null; however, when plasmid pSCL4 is eliminated from the wild type strain holomycin production reach 1000 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 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* $\Delta oppA2::acc$ pSCL⁻ or the lack of all the plasmids in *S. clavuligerus* *oppA2::aph* pSCL⁻ results in holomycin overproduction up to 1600 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DNA (**Fig. 3.2.5** 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. 3.2.5** 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* $\Delta oppA2::acc$ pSCL⁻ 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.

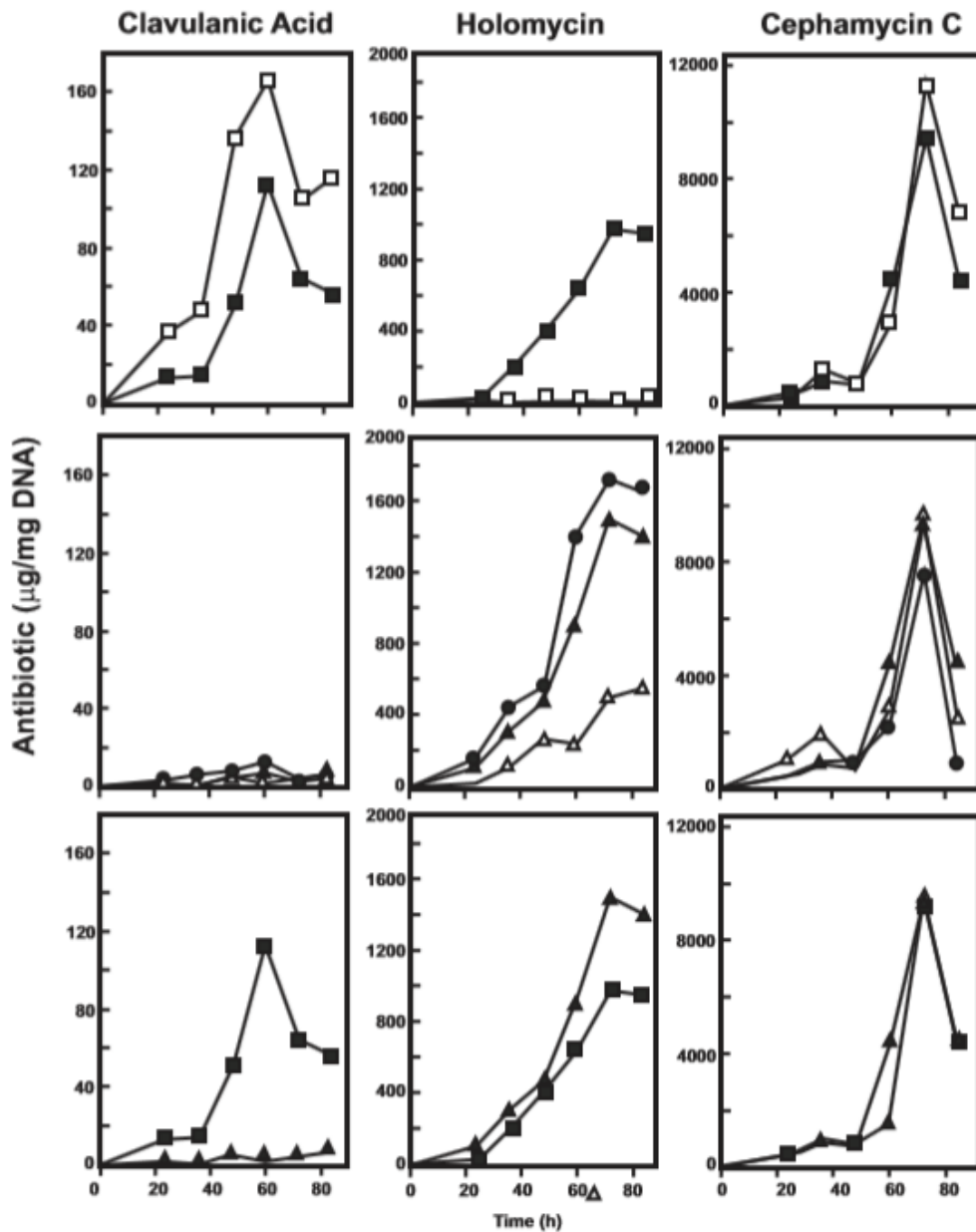


Figure 3.2.5. Antibiotic production by *S. clavuligerus* strains with different genetic background. Cephamycin C production (right panels), clavulanic acid production (left panels) and holomycin production (central panels). Strains: *S. clavuligerus* ATCC 27064 (open squares), *S. clavuligerus* pSCL4⁺ (closed squares), *S. clavuligerus* oppA2::aph pSCL⁻ (closed circles), *S. clavuligerus* ΔoppA2::acc pSCL⁺ (open triangles), *S. clavuligerus* ΔoppA2::acc pSCL⁻ (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.

3.2.5. 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.

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, suggest that a different 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 : i) 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 pSCL⁻*, obtained after deletion of *parA-parB_{pSCL4}*. Therefore, the larger production of holomycin by these strains suggests that, ii) 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 pSCL⁻* which contains a functional *oppA2* gene. Therefore, we can conclude that: iii) the effect of OppA2 and an 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 1 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.

Acknowledgements. 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.

3.2.6. 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.

Bentley SD, Chater KF, Cerdeño-Tárraga 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, Hornsby T, Howarth S, Huang CH, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabinowitsch 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.

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.

Fuente A de la, 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.

Gomez-Escribano JP, Bibb MJ. (2011). Engineering *Streptomyces coelicolor* for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *Microb Biotechnol*. 4(2): 207-215.

Gust B, Kieser T, Chater KF. (2002). REDIRECT technology: PCR-targeting system in *Streptomyces coelicolor*. The John Innes Centre, Norwich, United Kingdom.

Jensen SE, Paradkar AS, Mosher RH, Anders C, Beatty PH, Brumlik MJ, Griffin A Barton B. (2004). Five additional genes are involved in clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 48(1): 192-202.

Kirby R. (1978). An unstable genetic element affecting the production of the antibiotic holomycin by *Streptomyces clavuligerus*. *FEMS Microbiol Lett.* 3: 283-286.

Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. (2000). Practical *Streptomyces* Genetics. John Innes Foundation. Norwich, U.K.

Kinashi H. (2011). Giant linear plasmids in *Streptomyces*: a treasure trove of antibiotic biosynthetic clusters. *J Antibiot. (Tokyo).* 64(1): 19-25.

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 USA.* 107: 19731-19735.

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 Press, Norwich, UK, 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, Valegard 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.

3.2. Resultados. Capítulo II

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.

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.

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, 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.

Smyth GK. (2004). Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol*. 3, Iss. 1, Article 3.

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 thiolopyrrolones. 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.

3.3. Resultados

Capítulo III

Expression of the endogenous and heterologous clavulanic acid cluster in *Streptomyces flavogriseus*: Why a silent cluster is sleeping

Álvarez-Álvarez, R.^{1,2}, Martínez-Burgo, Y.¹, Pérez-Redondo, R.², Braña, A.F.³, Martín, J.F.¹, Liras, P.^{1,2}

¹ Microbiology Section. Department of Molecular Biology. Faculty of Biology and Environmental Sciences. Vegazana Campus. University of León. León 24071. Spain.

² Institute of Biotechnology. INBIOTEC. Av. Real 1. León 24006. Spain

³ 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.

Running Title: Heterologous expression of the clavulanic acid gene cluster.

Key words: Genomes, clavulanic acid, gene clusters, heterologous expression, *Streptomyces clavuligerus*, *Streptomyces flavogriseus*, *Saccharomonospora viridis*.

3.3.1. 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 *S. clavuligerus* CA cluster but assembled in a different organization. *S. flavogriseus* was grown in nine different media but clavulanic acid production was undetectable by bioassays or HPLC analyses. 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 suggests 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

3.3 Resultados. Capítulo III

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*.

3.3.2. INTRODUCTION

Clavulanic acid (CA) is a beta-lactamase inhibitor with clavam 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 proclavamic acid hydrolase (*pah2*) that removes the amidino group of arginine to produce clavaminic acid (Marsh *et al.*, 1992; Aidoo *et al.*, 1994) (**Fig.3.3.1A**). The known late steps of the CA pathway involve at least two enzymes, the glycyyl clavaminic acid synthase (encoded by *gcaS*) forming the peptide-like intermediate N-glycyyl-clavaminic acid. This compound is the precursor of clavaldehyde from which clavulanic acid is formed by the final enzyme of the pathway, clavaldehyde 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 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: i) the ancestral assembling of the gene cluster, or ii) 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 challenge for the pharmaceutical industry and requires understanding of the molecular basis for this lack of expression (Laureti *et al.*, 2011).

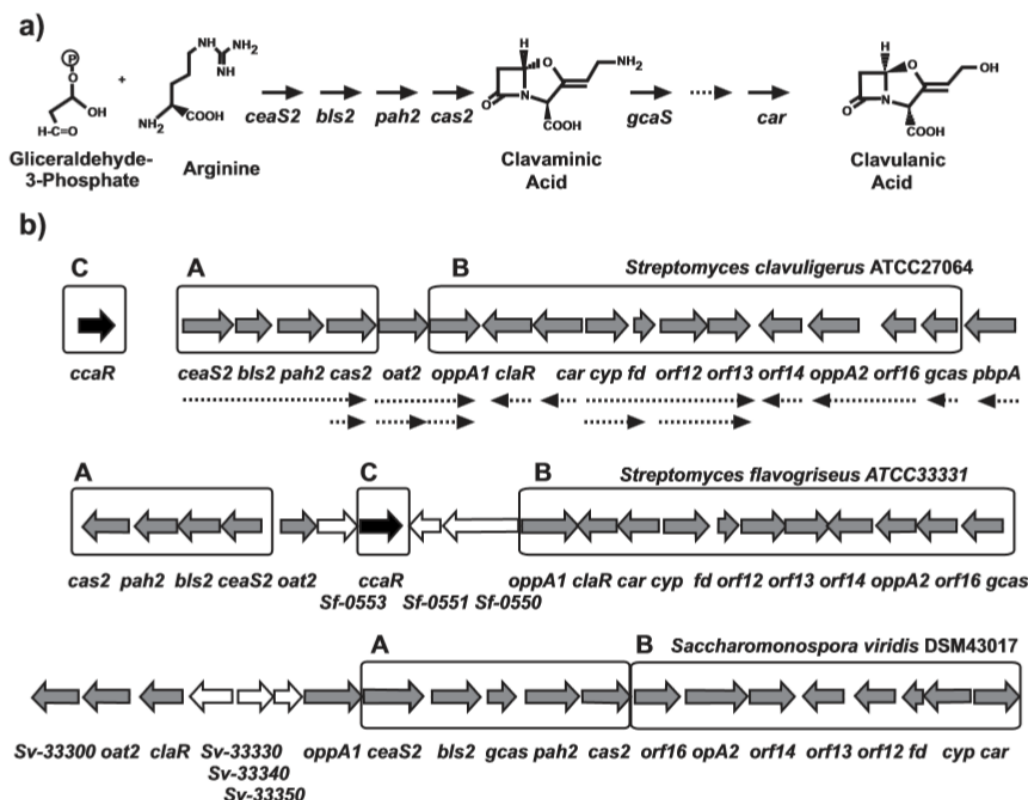


Figure. 3.3.1. Clavulanic acid biosynthesis pathway and gene clusters. A) Scheme of the clavulanic acid pathway. The genes encoding enzymes involved in the different steps are indicated. **B)** Clavulanic acid gene cluster in *S. clavuligerus*, *S. flavogriseus* and *Sac. viridis*. The transcriptional 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.

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 using HPLC and biological assays to determine if those novel CA gene clusters were expressed.

3.3 Resultados. Capítulo III

In this work the CA cluster of *Streptomyces flavogriseus* and *Saccharomonosora viridis* (hereafter abbreviated as *Sac. viridis*) was analyzed and production of CA by these strains in different media was tested using HPLC and biological assays. In addition, the heterologous expression of *S. clavuligerus* CA cluster in *S. flavogriseus* allowed to identify non-expressed genes what explain the silent nature of the *S. flavogriseus* CA cluster.

3.3.3. MATERIALS AND METHODS

Strains and culture conditions.

Streptomyces strains used in this work are described in **Table 3.3.1**. They were grown at 28°C and 220 rpm in 500 ml baffled flasks containing 100 ml TSB medium for 24 h to an O.D._{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 Higgens *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 by bioassay using *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 (2005). These samples were analyzed by HPLC in a SunFire column (5 µm, 4.6 x 250 mm, Waters), 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 x 150 mm, Waters) 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) was used as standard.

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 ccaR _F 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 ccaR _C genes 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 ccaR _C gene expressed from the P _{fur} promoter. Kanamycin, tetracycline and hygromycin B resistant.
<i>S. coelicolor</i> M 1146	Gomez-Escribano and Bibb, 2011	Strain for expression of heterologous gene clusters.

Table 3.3.1. *Streptomyces* strains used in this work.

Nucleic Acid Manipulation.

Oligonucleotides. Oligonucleotides used in this work (Laboratorios Conda, Madrid) are shown in **Table 3.3.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).

3.3 Resultados. Capítulo III

Samples to extract RNA were taken at 24 and 48 hours of culture. The RNA was quantified in a Nano-Drop spectrophotometer and 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 DNA of *S. flavogriseus* and the oligonucleotides Sfla_0552-D and Sfla_0552-R (**Table 3.3.S1**) a 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 Orué *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* ET12567[pUZ8002], which was later conjugated with *S. clavuligerus* Δ *ccaR::tsr* to give *S. clavuligerus* (Δ *ccaR::tsr*::[P_{fur}-ccaR_F]). To construct [ccaR_C-p_{fur}] the *S. clavuligerus* *ccaR_C* gene was amplified by PCR using oligonucleotides 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: i) a 502 bp DNA fragment internal to *ceaS2* which was amplified with oligonucleotides *ceaS2_D* and *ceaS2_R*, and ii) 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, that 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 ϕ C31), 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* DH5 α and colonies resistant to both kanamycin and tetracycline were isolated. After 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 1700 bp DNA fragment containing *oppA2* which was not amplified when DNA from *S. flavogriseus* ATCC 33331 was used.

RT-PCR. The one step RT-PCR reaction mixture contained in a 20 µl volume RNA template (200 ng), reaction mixture 1X, oligonucleotides 0.5 mM each, DMSO (5%), *SuperScript™ II* reverse transcriptase and *Platinum® Taq 2 U* (Invitrogen). 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 seconds; 60 °C/30 seconds; 72 °C/40 seconds and a final extension of 72 °C/10 minutes. 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 RT-qPCR was performed as previously described (Kurt *et al.*, 2013). The quantification of gene expression was performed by the $2^{-\Delta Ct}$ method (Livak and Schmittgen, 2001; Schmittgen and Zakrajsek, 2000), using the gene *hrdB* as internal control (Aigle *et al.*, 2000).

3.3.4. 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*, *S. jumonjinensis* and *S. katsuharamanus* (Ward and Hodgson, 1993), but no information on the CA gene cluster sequence of the last two species is available. *S. 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. 3.3.1B**), 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

3.3 Resultados. Capítulo III

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 acids identity with those of *S. clavuligerus* (ranging from 88% for OppA1 to 61% for ClaR) than with those of *Sac. viridis* (**Table 3.3.2**). 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 frame shift mutations.

The GcaS protein encoded by *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) whether 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. 3.3.1B**) are almost identical in the CA cluster of the three strains and in the clavam producer *S. antibioticus*:

Block A (**Fig. 3.3.1B**) 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 *S. viridis*. These genes are in the same order in *S. clavuligerus*, *S. flavogriseus* and *S. antibioticus* (Nobary *et al.*, 1995) but genes in block A are in the opposite orientation with respect to block B in *S. flavogriseus* (**Fig. 3.3.1B**).

Block B. A large set of genes (block B in **Fig. 3.3.1B**) 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. 3.3.1B**) 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.

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 acids 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. 3.3.1**); they encode respectively a 625 amino acids penicillin-binding protein with putative transpeptidase activity, a 1414 amino acids hypothetical protein with some similarity to NocE and a 88 amino acids hypothetical protein.

Expression of the CA gene cluster and clavulanic acid production by 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 by bioassays or by HPLC analysis of broth of the liquid cultures. Supplementation of the *S. flavogriseus* cultures with the CA precursors glycerol (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 3.3.S1*). Positive and negative PCR controls (not shown) confirmed that the sets of oligonucleotides used were effective in amplification and discriminates between *S. clavuligerus* and *S. flavogriseus* CA orthologous genes.

The results of the *S. flavogriseus* RT-PCR reactions are shown in **Fig. 3.3.2.A** clear expression of the *ccaR* and *clvR* 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 by 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 by *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 *ccaR* gene (named *ccaR_F* thereafter) was expressed in *S. flavogriseus* ATCC 33331, as shown by RT-PCR (*see Fig. 3.3.2*), 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 hypothesis 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.

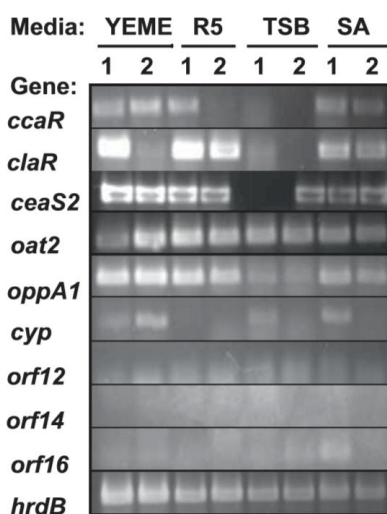


Figure. 3.3.2. Expression of the CA biosynthesis genes as detected by RT-PCR. Isolated RNA from *S. flavogriseus* cultures grown in YEME, R5, TSB and SA media for 24 h (1) and 48 h (2) was submitted to 35 cycles of amplification for the genes indicated at the left side of the figure. The *hrdB* gene is used as external control.

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 hours. 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 (Perez-Llarena *et al.*, 1997).

Heterologous expression of *S. clavuligerus* clavulanic acid cluster in *S. flavogriseus* ATCC 33331 and *S. coelicolor* M 1146

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

3.3 Resultados. Capítulo III

C cluster) in *S. flavogriseus* ATCC 33331 and in the model organism *S. coelicolor* M 1146 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].

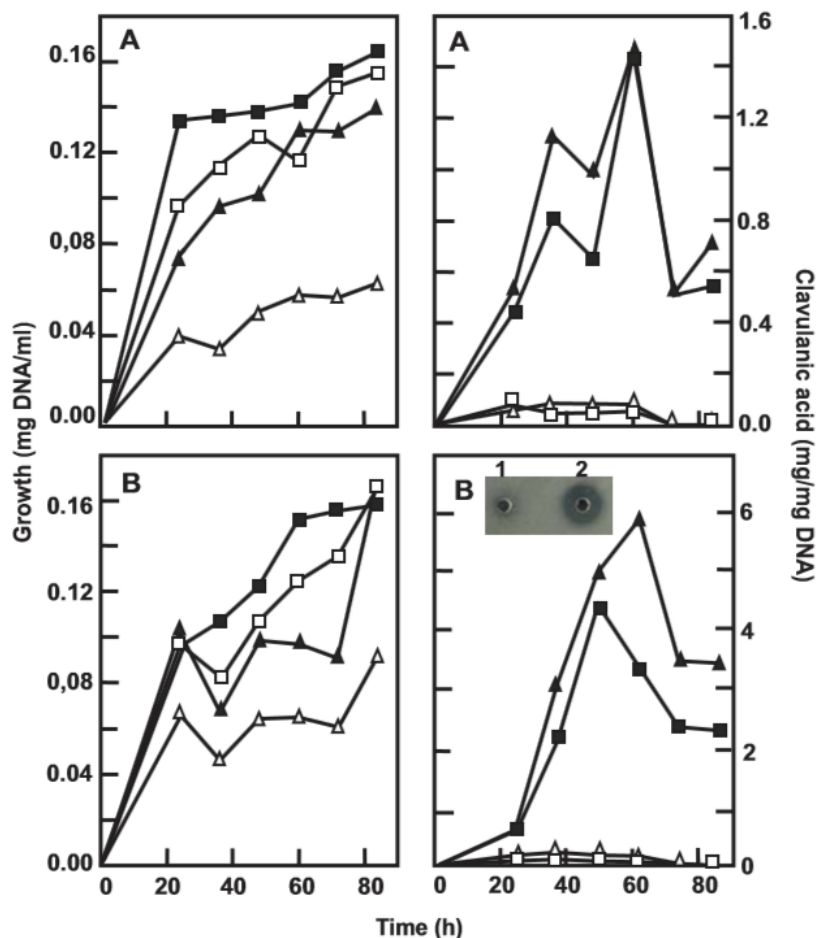


Figure. 3.3.3. Heterologous clavulanic acid production by exconjugants of *S. flavogriseus*. Growth (left panels) and clavulanic acid production (right panels) in MEY (A) and TBO medium (B) of *S. flavogriseus* ATCC 33331 (open triangles), *S. flavogriseus*::[*P_{fur}-ccaR_C*] (open squares), *S. flavogriseus*::[SCos-CA] (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 hours.

These strains and their control, 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. 3.3.3 inset**) but not in the control *S. flavogriseus* grown in MS, ISP4 and particularly in MEY and TBO medium.

To validate these results two exconjugants of *S. flavogriseus*::[SCos-CA] and *S. flavogriseus*::[P_{fur-ccaR_C}]:[SCos-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. 3.3.3**). 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 µg/ml) at 45 h, about 4 to 5-fold 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 µg/mg DNA (28.5 and 164.5 µg/ml) in MEY and TBO media, respectively. The inhibition zone on penicillin-resistant *Klebsiella* bioassays produced by broths of the cultures is shown in the inset of **Fig. 3.3.3**.

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. Using 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. 3.3.4A and B**). In both cases, mass spectra of that peak showed a negative ion, [M-H]⁻, with an *m/z* value of 198, as expected for clavulanic acid (**Fig. 3.3.4C**).

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, expression of both the endogenous and the heterologous CA gene clusters were studied also (using specific sets of oligonucleotides) in *S. flavogriseus*::[SCos-CA] which carries the CA

3.3 Resultados. Capítulo III

cluster of *S. clavuligerus*. The studies were done at 48 h of growth in liquid TBO medium which support high CA formation by all the strains.

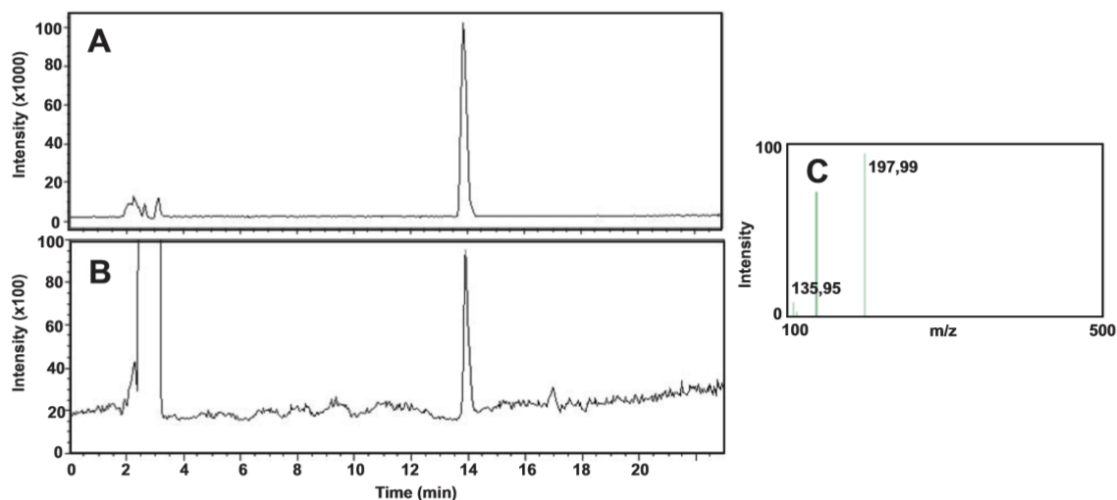


Figure. 3.3.4. Mass chromatography obtained by selected ion recording at m/z 198. A) Clavulanic acid standards (0.1 μg); **B)** Broth (10 μl) from a 60 h culture of *S. flavogriseus*::[SCos-CA] grown in TBO medium. **C)** Mass spectra of the clavulanic acid peak at chromatogram B detected in negative mode (M-H).

All the CA genes were well expressed in control *S. clavuligerus* ATCC 27064 (**Fig. 3.3.5A**) 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. 3.3.5B**, 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. 3.3.5A**), 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, that 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. 3.3.5B** 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 3-4 fold 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 µg/ml compared to the 164.5 µg/ml produced by *S. clavuligerus* in the same medium. The absence of heterologous expression in *S. coelicolor* and the low expression in *S. flavogriseus* illustrates the important role of the rest of the genes (i.e. the genetic background) on the expression of the CA cluster.

3.3.5 DISCUSSION

Streptomyces species are prolific producers of antibiotics and other related secondary metabolites (Martin *et al.*, 2000; Berdy, 2012). The availability of an increasing number of genome sequences of species of *Streptomyces* (Pati *et al.*, 2009; Ikeda *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 (Laureti *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. flavogriseus* 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 *et al.*, 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. flavogriseus* is the presence in the later of the *ccaR* gene, encoding a the SARP type regulator (block C in **Fig. 3.3.1B**) (Pérez-Llarena *et al.*, 1997a). These differences suggest that intense reorganization processes have occurred within the genus

3.3 Resultados. Capítulo III

Streptomyces that cannot be explained by simple rearrangements during vertical inheritance of the CA genes from a common *Streptomyces* ancestor.

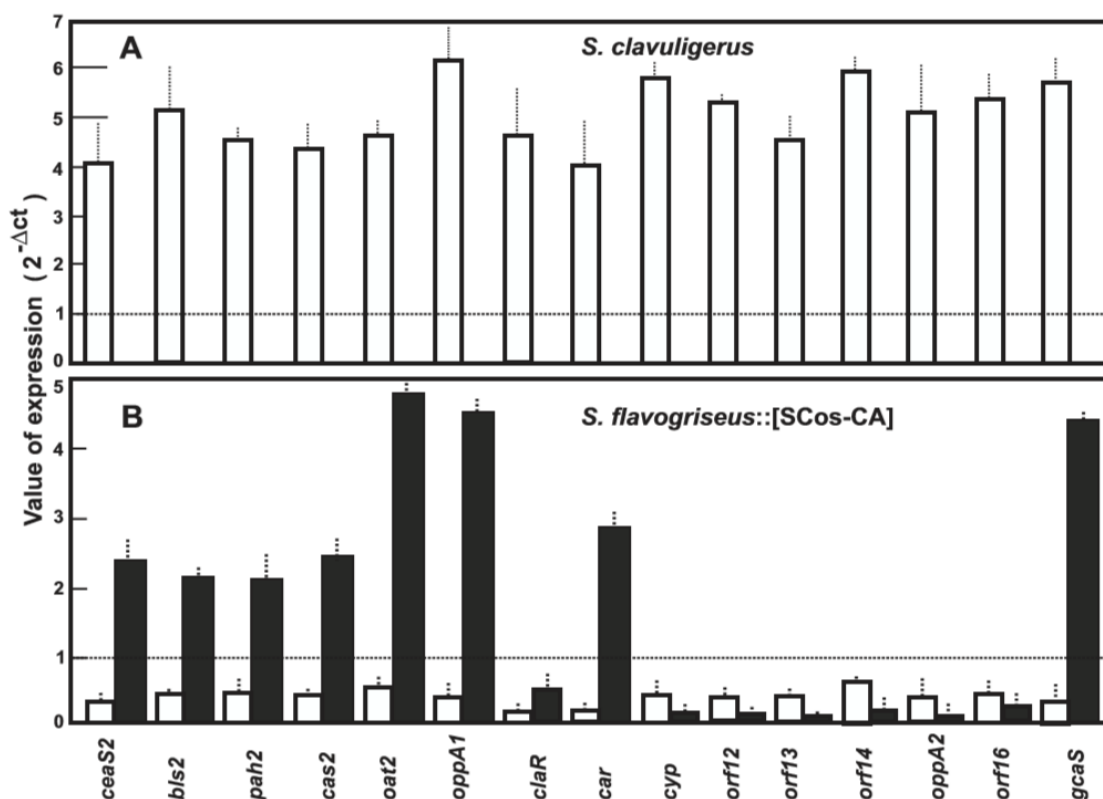


Figure 3.3.5. Quantitative expression by RT-qPCR of the clavulanic acid biosynthesis genes. A) White bars show the expression of the genes (indicated at the bottom of the figure) in *S. clavuligerus* grown in TBO medium after 48 h of culture. **B)** Expression of the clavulanic acid biosynthesis genes in *S. flavogriseus::[SCos-CA]*. Expression of genes of the endogenous *S. flavogriseus* cluster is shown in black bars. Heterologous expression of genes of *S. clavuligerus* CA cluster in *S. flavogriseus::[SCos-CA]* is shown in white bars.

S. flavogriseus did not produce CA in nine different culture media, in which *S. clavuligerus* produces high levels and therefore the *S. flavogriseus* CA cluster might be considered as silent. Several of the *S. flavogriseus* 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. flavogriseus* is in an intermediate evolutive stage and might lose eventually the functionality of the

genes for the late steps, leading to a strain similar to *S. antibioticus* (Nobary *et al.*, 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 trithiazolylpyridine-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 *ccaR_C* gene 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. 3.3.2**). 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*

3.3 Resultados. Capítulo III

species (Wang *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2010). Interestingly the constructions carrying [P_{fur}-*ccaR_C*] and [SCos-CA] results 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 acids 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*.

Acknowledgement. This work was supported by Grants BIO2009-09820 and LE046A11-2 from the Spanish Ministry of Economy and Competitivity and the Junta de Castilla y León, respectively. R. Álvarez-Álvarez and Y. Martínez-Burgo received a PFU fellowship 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.

3.3.6. 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.* 6: 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-Tárraga 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, Hornsby T, Howarth S, Huang CH, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabinowitsch 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.

Blanco G. (2012). Comparative analysis of a cryptic thienamycin-like gene cluster identified in *Streptomyces flavogriseus* by genome mining. *Arch Microbiol.* 194: 549-555.

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.

Bérdy J. (2012). Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are. *J Antibiot* 65: 385-395.

Brakhage AA, Schroeckh V. (2011). Fungal secondary metabolites - strategies to activate silent gene clusters. *Fungal Genet Biol.* 48: 15-22.

Doran JL, Leskiw BK, Aippersbach S, Jensen SE. (1990). Isolation and characterization of a beta-lactamase-inhibitory protein from *Streptomyces clavuligerus* and cloning and analysis of the corresponding gene. *J Bacteriol.* 172: 4909-4918.

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.

3.3 Resultados. Capítulo III

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 Chemoter.* 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 Biochemistry.* 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 clavamate synthase from *Streptomyces antibioticus*. A multifunctional enzyme of clavam biosynthesis. *J Biol Chem.* 270: 5399-5404.

Jensen SE, Paradkar AS, Mosher RH, Anders C, Beatty PH, Brumlik MJ, Griffin A, Barton B. (2004). Five additional genes are involved in clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 48: 192-202.

Kang SG, Park HU, Lee HS, Kim HT, Lee KJ. (2000). New beta-lactamase inhibitory protein (BLIP-I) from *Streptomyces exfoliatus* SMF19 and its roles on the morphological differentiation. *J Biol Chem.* 275: 16851-16856.

Khaleeli N, Li R, Townsend CA. (1999). Origin of the β -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*. Norwich: John Innes Foundation

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.

Laureti 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 β -lactam antibiotics: A model for evolutive combinatorial assembly of new β -lactams. *Internat Microbiol.* 1: 271-278.

Liras P, Santamarta I, Pérez-Redondo R. (2011). Clavulanic acid and clavams biosynthesis and regulation, p167-178. In: Dyson P (ed) *Streptomyces Molecular Biology and Biotechnology*. Caister Academic Press, Norfolk, UK.

Livak KJ, Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$. *Method. Methods.* 25: 402-408.

3.3 Resultados. Capítulo III

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 clavamate synthase central to clavulanic acid formation: cloning and sequencing of both genes from *Streptomyces clavuligerus*. *Biochemistry* 31: 12648-12657.

Martín JF, Gutiérrez S, Aparicio JF. (2000). Secondary metabolites, p 213-236. In Lederberg, J. (ed.), *Encyclopedia of Microbiology*, vol. 4, 2nd ed Academic Press. San Diego, CA.

Martín JF, Liras P. (2010). Engineering of Regulatory Cascades and Networks Controlling Antibiotic Biosynthesis in *Streptomyces*. *Current Op in Microbiol*. 13: 263-273.

Matthew AG, Till R, Smith MCM. (2003). Integration Site for *Streptomyces* Phage Φ BT1 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, 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.

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. (1997). 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. (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. (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.

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.

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.

3.3 Resultados. Capítulo III

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.

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.

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.

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.

3.4. Resultados

Capítulo IV

Molecular genetics of naringenin biosynthesis, a typical plant secondary metabolite produced by *Streptomyces clavuligerus*.

R. Álvarez-Álvarez^{1,2}, A. Botas², SM. Albillos², A. Rumbero³, J.F. Martín¹ P. Liras^{1,2}

- ^{1.} Microbiology Section. Department of Molecular Biology. Faculty of Biology and Environmental Sciences. Vegazana Campus. University of León. León 24071. Spain.
- ^{2.} Institute of Biotechnology. INBIOTEC. Av. Real 1. León 24006. Spain
- ^{3.} Organic Chemistry Department. University Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049-Madrid. Spain

Key Word: Naringenin, Secondary Metabolism, *Streptomyces clavuligerus*, histidine ammonium lyase.

3.4.1. SUMMARY

A compound present in cultures broths of *S. clavuligerus* ATCC 27064 grown in complex TSB medium but not in defined SA medium has been characterized by LC-MS and NMR as naringenin. This plants typical metabolite, not described previously to be produced naturally by microorganisms, is formed by the action of a chalcone synthase. Bioinformatic search of *S. clavuligerus* genome detected a gene encoding a chalcone synthase (SCLAV_5492, *ncs*) side by side with a gene for a P₄₅₀ cytochrome oxigenase (SCLAV_5491, *ncyP*). The starting unit for the formation of naringenin in plants is p-coumaroyl-CoA which is formed from tyrosine. A gene encoding a tyrosine/phenylalanine ammonia lyase (SCLAV_5457, *tal*) has been located in *S. clavuligerus* genome. Disruption of any of the three genes (*ncs*, *ncyP*, *tal*) resulted in lack of production of naringenin and the complemented mutants regain the ability to produce the compound, indicating that these genes are involved in naringenin formation. Addition of acetate, butyrate, palmitic acid or oleic acid did not improve significantly naringenin production, but tyrosine and phenylalanine supplementation resulted in cultures producing up to 3-fold more naringenin.

3.4.2. INTRODUCTION

S. clavuligerus ATCC 27064 is an industrially relevant actinomycete, used for the production of clavulanic acid (CA) (Baggaley *et al.*, 1997). This strain has a peculiar carbohydrate metabolism (Pérez-Redondo *et al.*, 2010) and is able to produce in addition to CA other bioactive compounds such as cephamycin C (Liras and Demain, 2009), clavams (Jensen, 2012), and holomycin (Li and Walsh, 2010; Robles-Reglero *et al.*, 2013). Interestingly sequencing of the *S. clavuligerus* genome revealed that this organism has potential ability to produce a wealth of additional secondary metabolites (Medema *et al.*, 2010). Up to 25 clusters for putative secondary metabolites are located in the 6.8 Mb chromosome of *S. clavuligerus* and 23 more are present in the 1.8 Mb megaplasmid pSCL4 (Medema *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2010). They include ten clusters containing genes for nonribosomal peptide synthetases (NRPS), six clusters with genes for polyketide synthases (PKS), as well as NRPS-PKS hybrid clusters and genes for putative terpene synthesizing enzymes.

New gene clusters encoding novel bioactive products are of utmost interest. The homology of some clusters with previously studied orthologous in other *Streptomyces* species suggest that *S. clavuligerus* might produce staurosporine, moenomycin, indigoidine, and enediyne-like compounds, some of which are antitumor agents.

Since most of these compounds have never been detected in *S. clavuligerus* cultures they must be silent clusters that are only expressed in response to specific nutritional or physiological signals, or in response to elicitors (Ochi and Hosaka, 2013; Martín and Liras, 2014).

Chalcone synthases are type III polyketide synthases involved in the condensation of different CoA-activated precursor units (particularly phenylpropanoids as starter units) to produce flavonoid-type chalcones. They are very frequent in plants, where they serve as precursors of different types of flavonoids, and in fungi (Schröder, 1999) but are rare in actinomycetes. Some types of flavonoid intermediates, e.g. the naringenin appeared to be restricted to plants. Interestingly, we found in this work that *S. clavuligerus* ATCC 27064 is able to produce naringenin. Search of the *S. clavuligerus* genome for chalcone synthases revealed the presence of a gene encoding a chalcone synthase (SCLAV_ 5492) similar to *rppA* of *S. griseus* (Ueda *et al.*, 1995; Funa *et al.*, 2002) or SCO1206 in *S. coelicolor* (Li *et al.*, 2007) that is involved in the biosynthesis of a red-brown pigment (Funa *et al.*, 2000). However, *S. coelicolor* does not produce naringenin among its secondary metabolites (Bentley *et al.*, 2002).

An interesting question is whether there are chemical structures of secondary metabolites restricted to plants or if most of them can be found in some actinobacteria. In this work we describe that *S. clavuligerus* is able to produce naringenin, a flavanone important as antioxidant (Cavia-Saiz *et al.*, 2010), described to *act* as anti-inflammatory and chemoprotective and antitumor agent (Jagetia *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2014). Naringenin is naturally produced in several plants, especially in grapefruit, and its biosynthesis has been studied in *Medicago*, parsley and other plants (**Fig.3.4.1**) but it is unknown if the same pathway occurs in *S. clavuligerus*. The starter

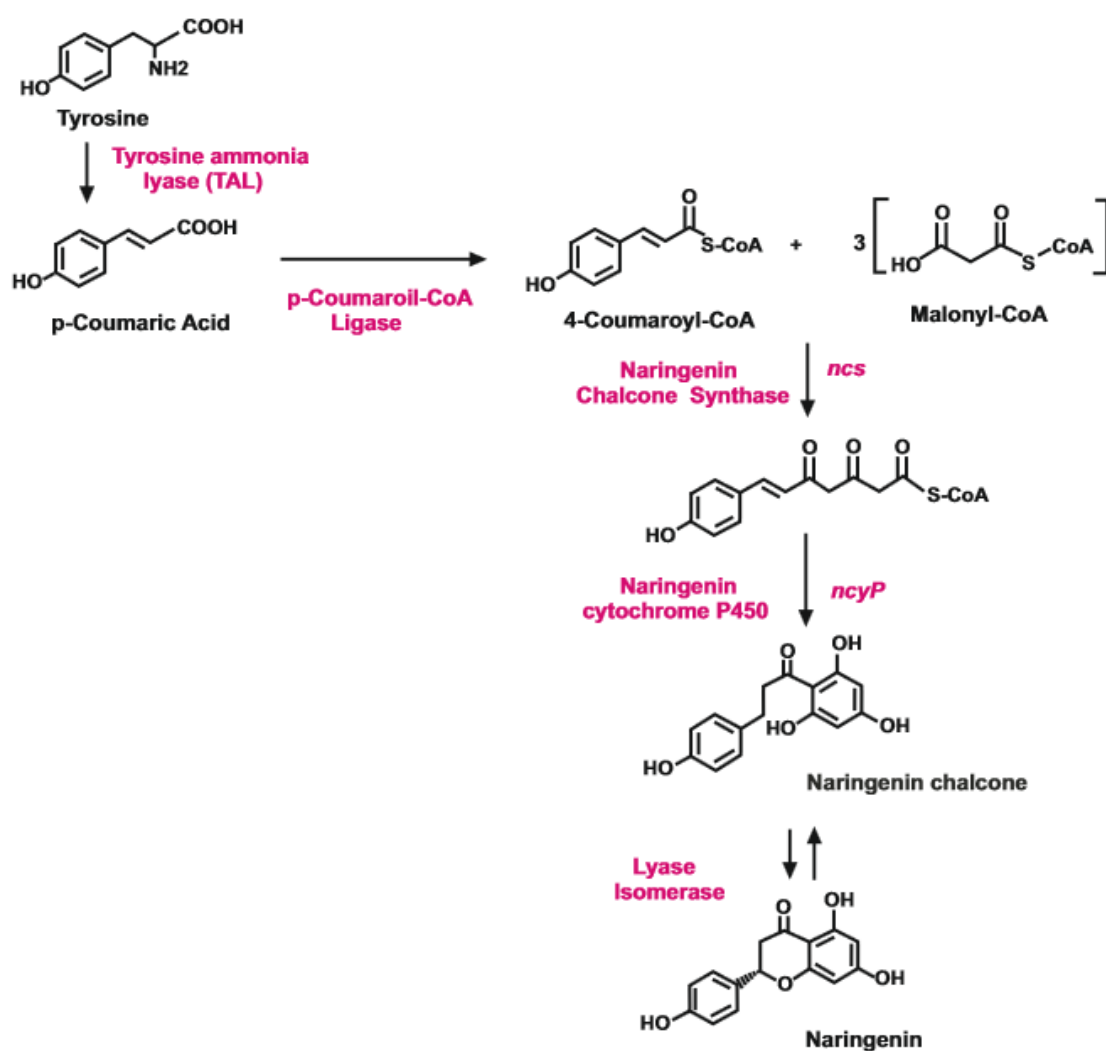


Fig. 3.4.1. Proposed naringenin biosynthesis pathway in *S. clavuligerus*. The names of the intermediate compounds, enzymes involved and genes are indicated. Naringenin biosynthesis starter in plants is usually phenylalanine and there are additional steps for the hydroxylation of cinnamic acid to produce p-coumaric acid.

unit for naringenin biosynthesis is 4-coumaroyl-CoA, which in dicotyledonous plants derives from phenylalanine by the action of a phenylalanine ammonia lyase (PAL) and

3.4. Resultados. Capítulo IV

a hydroxylation step by a cinnamate-4-hydroxylase followed by activation by a CoA-dependent ligase (Kyndt *et al.*, 2002). In dicotyledonous plants the ammonia lyase uses tyrosine (and phenylalanine) as substrate producing p-coumaric acid without the need of the cinnamate-4-hydroxylase. A related enzyme, encoded by the *encP* gene has been detected in *Streptomyces maritimus* and found to convert phenylalanine in cinnamic acid, required for enterocin biosynthesis (Xiang and Moore, 2002) but production of naringenin in prokaryotes has never been reported. It was therefore of interest to study if the putative naringenin gene cluster(s) in *S. clavuligerus* is similar to that of plants and whether it is expressed under some specific conditions.

3.4.3. MATERIALS AND METHODS

Strains and culture conditions

The wild type strain, *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 was used to purify naringenin. Strains *S. clavuligerus* $\Delta ncs::acc$, *S. clavuligerus* $\Delta ncyP::acc$ and *S. clavuligerus* $\Delta tal::acc$ were obtained from the wild type strain by the REDIRECT Technique.

All the strains were grown at 28°C in an orbital shaker incubator at 220 rpm for 24 h in 500 ml baffled flasks containing 100 ml of TSB medium. A 5% (v/v) of this seed culture was used to inoculate TSB (Trypticaseine Broth) or SA (Starch-Asparagine medium pH 6.8) cultures grown in the same conditions. All the cultures were made in triplicate flasks. The TSB was supplemented with tyrosine, phenylalanine or with organic acids (acetate, butirate, oleic acid, palmitic acid) as sodium salts, when required. Cultures of transformants strains were supplemented with kanamycin (50 µg/ml), tetracycline (10 µg/ml), hygromycin (50 µg/ml), apramycin (50 µg/ml) or nalidixic acid (25 µg/ml) when required.

Naringenin purification by HPLC

Naringenin was purified by HPLC using an Alliance 2695 HPLC with a refrigerated autosampler, a column furnace and a photodiode array detector (PDA) 2998 (Waters Corp.). Naringenin was quantified at its absorption peak (290 nm). The system was equipped with 3.5 mm pore particle XBridge™ C18 (2,1x150 mm, Waters Corp.) column.

The culture samples were centrifuged at 13000 rpm for 5 min and the supernatants filtered through sterile 0.2 mm polyethersulphone (PES) syringe filters (VWR, Intl.). The whole sample (100 ml) was loaded in multiple injections. HPLC conditions were as follows: column temperature 40°C; the flow was kept at 0.32 ml/min from 0 to 2 min and then increased gradually to reach 0,40 ml/min at 10 min. A mixture of Milli Q water with 0,01% trifluoroacetic acid (A) and acetonitrile (B) were

used as solvent with the following program: 0-2 min increase from 20 to 30% B and kept at 30% B thereafter. The peak eluting at 6 min from repeated injections was pooled and the solvent from the pooled preparation was evaporated under low pressure (SpeedVac Savant Sc110, Thermo Sci.). The concentrated solution was lyophilized and kept at -20°C until NMR analysis and identification. Pure naringenin and genistein (Sigma Ch. Co.) were used as standards.

NMR Analysis

NMR spectra were recorded in metanol-d₄ at room temperature using a Bruker WM 500 spectrometer [500 MHz (¹H NMR) and 125 MHz (¹³C NMR)]. Chemical shifts are given on the δ -scale and were referenced to the solvent ($\delta_c=49.0$ ppm) and to the TMS as internal standard. The pulse programs of the following 2D experiments were taken from the Bruker software library and the parameters were as follows: 500/125 MHz gradient-selected HMQC spectra [1]: relaxation delay $D_1=1.5$ s; 500/125 MHz gradient-selected HMBC spectra [1]: relaxation delay $D_1=1.5$ s; evolution delay $D_2=3.33$ ms; delay for evolution of long range coupling $D_6=60$ ms. 500 MHz gradient-selected ¹H, ¹H COSY spectra [2]: relaxation delay $D_1=1.5$ s; 90° pulse for ¹H.

Mass spectrometry

The mass spectra were determined by HPLC-MS (Agilent Technologies). Using a HP-1100 Series HPLC and MS: 6120 Quadrupole LC/MS.

Molecular Biology Studies

The oligonucleotides used in this work are shown in **Table 3.4.S1**.

Extraction and purification of RNA. RNA was extracted from 1.5 ml samples taken at 24 and 48 h of growth in TSB and SA media. Two volumes of RNA-protect (Quiagen) were added to the samples. The commercial system Quiagen, RNAeasy was used following the manufacturer instructions as described previously (Santamarta *et al.*, 2011).

RT-PCR. For RT-PCR amplification the final 20 μ l reaction contained RNA (200-300 ng), reaction mixture 1x, 0.5 mM each oligonucleotide; 5% DMSO; *SuperScriptTM II* Reverse Transcriptase and *Platinum® Taq* (Invitrogen) 1-2 units. Control reactions were done with the same procedure but only with *Platinum® Taq*. Amplification conditions: cDNA was formed in a 50°C 30 min cycle. Then, an initial 94°C 2 min denaturation cycle was followed by 25 to 35 30-seconds cycles at 95°C. A final extension cycle of 10 min at 72°C reaction was allowed.

Construction of the complemented strains. In order to complement the *ncs*, *ncyP* and *tal*-deleted strains, each of those genes was obtained by PCR amplification,

3.4. Resultados. Capítulo IV

sequenced to confirm their integrity and subcloned downstream of the anhydrotetracycline-inducible *tcp-830* promoter in the EcoRV site of the conjugative-integrative vector pAV11 (Rodríguez-García *et al.*, 2005). The constructions were introduced in *E.coli* ET/pUZ8002, and then were transferred to the adequate *Streptomyces* strain by conjugation. Hygromycin resistant exconjugants were tested by PCR to confirm the presence of the complementing genes.

3.4.4. RESULTS

Characterization of a new compound produced by *S. clavuligerus* ATCC 27064

In the course of a comparative HPLC study of the compounds produced by *S. clavuligerus* in TSB and SA media a compound showing a large absorbance peak was found in cultures grown in TSB medium that was not present in the broth of SA grown cultures. TSB is a tryptic hydrolysate of soybean meal rich in plant-derived amino acids whereas SA contains only asparagine as nitrogen source. The peak eluted at 6 minutes under the HPLC conditions used in the study assay (**Fig. 3.4.2**) and corresponds to an extracellular compound that is also present in extracts of washed cells at about 1% of the concentration with respect to that found in the broth. No appreciable amount of the compound was associated to the mycelium.

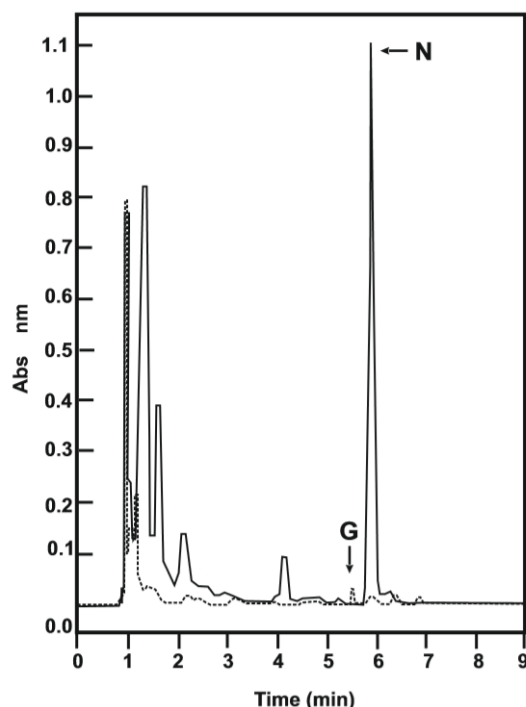


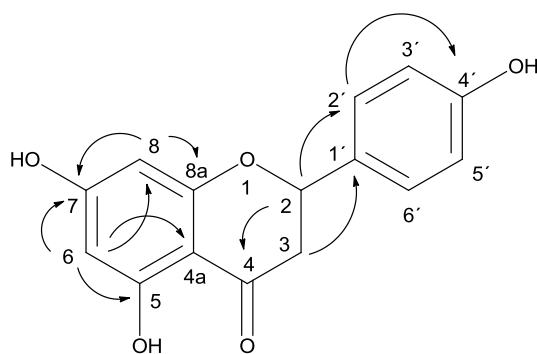
Fig. 3.4.2. HPLC analysis of culture broths of *S. clavuligerus*. The broth of cultures grown in SA medium (discontinuous lane) and TSB medium (continuous line) were analyzed as indicated in materials and methods. The peak with a retention time of 6.0 min coincides with pure commercial naringenin (N). Genistein (G) has a retention time of 5.4 min.

In order to purify the compound batch cultures were carried out for 72 h to obtain a total of 2.4 l of supernatant. The centrifuged culture supernatant was concentrated under vacuum and extracted with ethyl acetate as indicated in Material and Methods. After repeated HPLC injections the compound eluting at 6.0 min was pooled and lyophilized to obtain 5 mg of pure material that was used for the chemical characterization of the molecule.

The compound produced by *S. clavuligerus* as identified by LC-MS and NMR is naringenin and coelutes in HPLC with authentic naringenin

A mass (m/z) of 273 and a molecular formula of $C_{15}H_{12}O_5$ was obtained from LC-MS $[MH^+]$ and from the ^{13}C -NMR analysis. Examination of NMR data analysis (**Fig. 3.4.3**) suggested that compound **1** was a flavanone. Its 1H -NMR spectrum revealed characteristic resonances of aromatic protons such as four proton signals of the B-ring

A)



B)

Nº	^{13}C	1H
2	79.04	5.40 (dd, $J_{2,3b} = 13.1$; $J_{2,3a} = 3.0$ Hz)
3	42.66	H-3a : 2.70 (dd, $J_{3a,3b} = 17.2$; $J_{3a,2} = 3.0$ Hz) H-3b : 3.15 (dd, $J_{3b,3a} = 17.2$; $J_{3b,2} = 13.1$ Hz)
4	196.26	
4a	102.19	
5	164.11	
6	95.00	5.95 (d, $J_{6,8} = 2.0$ Hz)
7	166.59	
8	95.80	5.94 (d, $J_{8,6} = 2.0$ Hz)
8a	163.50	
1'	129.49	
2', 6'	128.10	7.37 (d, $J_{2',3'} = J_{6',5'} = 8.6$ Hz)
3', 5'	115.22	6.87 (d, $J_{3',2'} = J_{5',6'} = 8.6$ Hz)
4'	157.82	
5-OH		12.15 s

Fig. 3.4.3. NMR analysis for the purified compound. A) Heteronuclear multiple-bond correlation. **B)** 1H and ^{13}C -NMR chemical shifts assignments for naringenin en acetone- d_6 .

3.4. Resultados. Capítulo IV

appearing as two doublets at δ 7.37 and 6.87 ppm with $J=8.6$ Hz due to *ortho*-coupling were assigned to H-2',6' and H-3',5, respectively; the two *meta*-coupled protons at δ 5.95 and 5.94 ppm with $J=2.0$ Hz were assigned to H-6 and H-8. The presence of the quaternary signal of 5-OH with the 4-keto group at δ 12.15 and signals at δ 5.40 (1H, dd, $J=13.1$ and 3.0 Hz), δ 2.70 (1H, dd, $J=17.2$ and 3.0 Hz) and δ 3.15 (1H, dd, $J=17.2$ and 13.1 Hz), in conjunction with the ^{13}C -NMR signals at δ 79.04 and 42.66 ppm, inferred from HMQC spectrum, pointed to the presence of an -O-CH-CH₂-CO- system in the C-ring of the flavanone component. This conclusion was reinforced by the peak correlating signals at δ 3.15 and 2.70 ppm with the signal at δ 5.40 observed in the ^1H - ^1H COSY spectrum.

The assignment of the signals of the ^{13}C -NMR spectrum, corresponding at δ 95.00 (C-6), δ 95.8 (C-8), δ 115.22 (C-3' and C-5') and δ 128.10 (C-2' and C-6') was carried out by using HSQC-HMQC spectrum, which showed a correlation peak via $^1J_{\text{C-H}}$. Other heteronuclear correlations deduced from the HMBC spectrum (Fig. 3) via $^2J_{\text{C-H}}$ and $^3J_{\text{C-H}}$, were used to assign the signals corresponding at δ 196.26 (C-4), δ 157.82 (C-4'), δ 166.59 (C-7), δ 164.11 (C-5), δ 163.50 (C-8a), δ 129.49 (C-1') and δ 102.19 (C-4a).

All these NMR data together with the mass spectrum suggested the structure of naringenin [3] for compound **1**. The compound was different from genistein, a plant flavonoid intermediate similar to naringenin but carrying an additional double bond; both compounds were clearly resolved by HPLC (retention times of 5.4 and 6.0 min for genistein and naringenin, respectively).

Production of naringenin is stimulated by aromatic amino acids

Production of naringenin in TSB medium increases in parallel to the growth of the culture reaching the maximum level at 84 h (**Fig. 3.4.4**). TSB is a complex medium; however, it might not have the adequate requirements for naringenin production. Since this compound is known to be formed from malonate and tyrosine or phenylalanine in different plants, we supplemented the TSB medium separately with different organic acids (acetic, butyric, palmitic and oleic acid, as sodium salts) and measured the final production of naringenin in each case. Acetate and oleic acid did not improve naringenin production, while butyrate and palmitic acid improved it 1.15- and 1.63-fold, respectively.

In addition, cultures were supplemented with phenylalanine or tyrosine at 5 and 10 mM concentration (**Fig. 3.4.4C**). Tyrosine improved the naringenin production by 1.83- and 2.32-fold at 5 and 10 mM concentration, respectively. The best production was observed by addition of phenylalanine, resulting in a naringenin increase of 2.16- and 3.7-fold respectively, at 5 and 10 mM concentration (up to 184 $\mu\text{g}/\text{ml}$). This concentration is much higher than the production obtained by a multistep

engineered *E. coli* strain (Wu *et al.*, 2014) indicating that *S. clavuligerus* ATCC 27064 is an excellent naringenin producer.

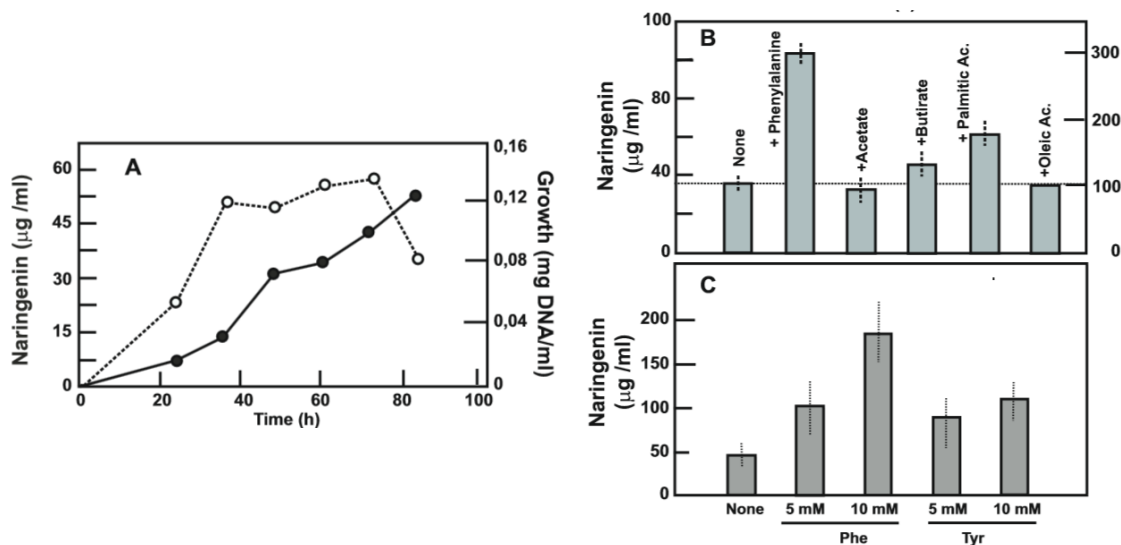


Fig. 3.4.4. Production of naringenin by *S. clavuligerus*. **A)** Profile of a culture of *S. clavuligerus* grown in TSB medium Growth (open circles), naringenin production (closed circles). **B)** Naringenin production at 84 h of cultures by *S. clavuligerus* ATCC 27064 in the absence and presence of phenylalanine, acetate, butyrate, palmitic acid or oleic acid at 5 mM concentration. **C)** Production of naringenin in TSB cultures supplemented with each phenylalanine and tyrosine at 5 and 10 mM concentration.

Bioinformatic analysis of genes putatively encoding naringenin biosynthetic enzymes in the *S. clavuligerus* genome

The putative pathway for naringenin biosynthesis (**Fig. 3.4.1**) requires the action of a naringenin chalcone synthase (Ncs) condensing the p-coumaroyl-CoA starting unit and three malonyl-CoA molecules. Therefore, using the sequence of *Glycine max* naringenin chalcone synthase (CAA38456) we searched the *S. clavuligerus* genome for homologous genes using the BLAST Program. A single match corresponded to *S. clavuligerus* SCLAV_5492; this gene (named *ncs*) encodes a 351 amino acids protein with characteristics of a type III polyketide synthase and a 29 % identity (44 % functionally conserved amino acids) along the entire sequence with *G. max* naringenin chalcone synthase, hereafter named Ncs. Interestingly, this chalcone synthase is closely related to type III PKSs of the RppA family occurring in many *Streptomyces* species (see Discussion).

Upstream of *ncs* we found a gene, SCLAV_5491, encoding a 454 amino acid cytochrome P₄₅₀ oxygenase that, will be named hereafter *ncyP*. Genes encoding P₄₅₀ oxygenases are frequently present in secondary metabolites gene clusters and we postulated that *ncyP* might encode the enzyme required for the chalcone cyclization

3.4. Resultados. Capítulo IV

(see disruption and complementation experiments). This cytochrome P₄₅₀ gene is more closely related to *rppA*-linked P₄₅₀'s in several *Streptomyces* species than to the other *S. clavuligerus* P₄₅₀'s (see Discussion).

Genes encoding proteins analogous to Ncs and NcyP are present with the same organization in *S. coelicolor* (SCO_1206 and 1207), *S. lividans* (Sli_1485 and 1486) or *S. griseus* (SGR_6619 and 6620) while in *S. venezuelae* (SVEN_5366 and 5367) are located tail to tail, and in *S. avermitilis* (SAV_1171 and SAV_7131) are separated in the genome. The linkage of the *ncs* and *ncyP* genes may be relevant for efficient formation of naringenin (see Discussion). A tyrosine, at position 224, conserved in the *S. clavuligerus* Ncs protein, might be involved in the recognition of the first (starter) unit of p-coumaroil-CoA, or malonyl-CoA as proposed in the RppA synthase of *S. coelicolor* (Li *et al.*, 2007).

Location of genes putatively involved in the formation of the 4-coumaroil-CoA precursor

Naringenin is formed from a 4-coumaric acid starting unit. In order to find genes encoding the enzyme required for 4-coumaroyl formation, the *encP* gene of *Streptomyces maritimus*, encoding a phenylalanine/ tyrosine ammonia lyase (Xiang and Moore, 2002), was used to search the *S. clavuligerus* genome. One single gene, SCLAV_5457, located 47.3 kb upstream of the *ncs-ncyP* cluster was found that encodes a protein with 37% amino acids identity (51% conserved residues) to EncP along the whole sequence. SCLAV_5457 has 1679 bp and encodes a 559 amino acid protein related to TAL or PAL tyrosine/phenylalanine ammonia lyases (Appert *et al.*, 1994). These enzymes are able to deaminate phenylalanine to produce cinnamic acid and tyrosine to produce coumaric acid. A short chain dehydrogenase/reductase encoded by SCLAV_5458, located downstream of the former gene may act on the double bond of the propenoyl side chain of 4-coumaric acid to reduce the double bond.

Activation of coumaric acid is likely to be mediated by the action of the aryl-CoA ligase encoded by SCLAV_3408. This last enzyme contains an ATP binding site for activation of the aromatic acid as an acyl-adenylate and is similar to coumaroyl-CoA ligases of plants and *Penicillium chrysogenum* (Schneider *et al.*, 2003; Lamas-Maceiras *et al.*, 2006; Martín *et al.*, 2012) and to the benzoyl-CoA ligase of *S. maritimus* involved in the biosynthesis of enterocin (Xiang and Moore, 2002).

Deletion of *S. clavuligerus ncs* and *ncyP* genes blocks naringenin biosynthesis

In order to elucidate if the *ncs* or *ncyP* genes are involved in naringenin biosynthesis we proceeded to delete, separately, each of these genes using the Redirect procedure. Seven clones of *S. clavuligerus* $\Delta ncs::acc$ were obtained. The deleted strains showed the same pigmentation, aerial mycelium and spores formation

as the parental strain. However, when tested for naringenin biosynthesis in TSB liquid cultures, production of naringenin at 84 h cultures was drastically reduced to about 9% of that in the parental strain, in the seven clones (**Fig. 3.4.5**).

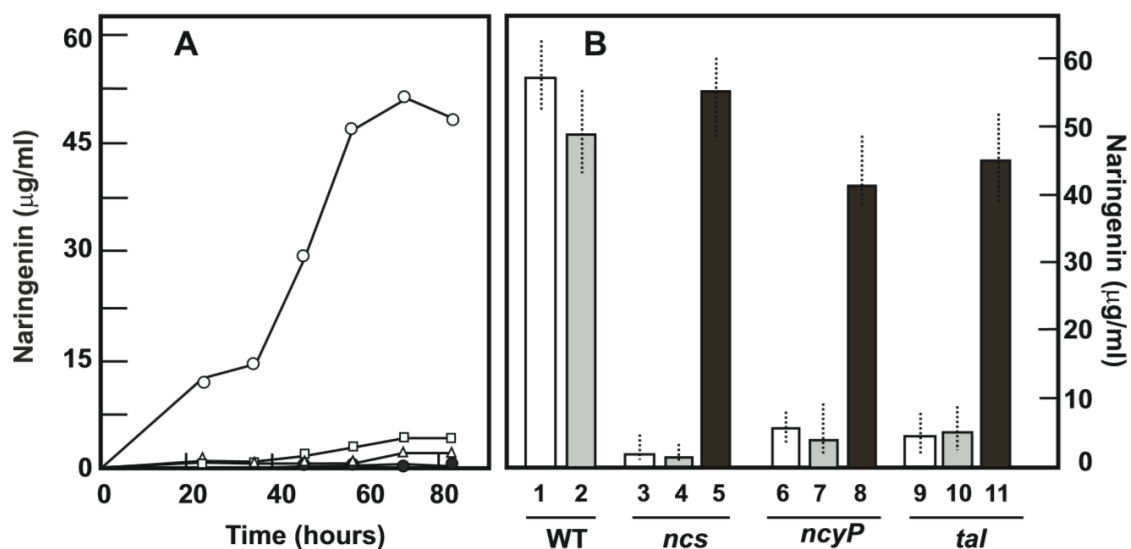


Fig. 3.4.5. Production of naringenin by *S. clavuligerus* deleted mutants and complemented strains. **A)** Production of naringenin by *S. clavuligerus* 27064 (open circles), *S. clavuligerus ncs::acc* (closed circles), *S. clavuligerus ncyP::acc* (open triangles), *S. clavuligerus tal::acc* (open squares). **B)** Production of naringenin by *S. clavuligerus* deleted and complemented strains at 96 h of growth. 1) *S. clavuligerus* ATCC27064, 2) *S. clavuligerus* [pAV11], 3) *S. clavuligerus* $\Delta ncs::acc$ 4) *S. clavuligerus* $\Delta ncs::acc$ [pAV11] 5) *S. clavuligerus* $\Delta ncs::acc$ [pAV11-*ncs*], 6) *S. clavuligerus* $\Delta ncyP::acc$ 7) *S. clavuligerus* $\Delta ncyP::acc$ [pAV11], 8) *S. clavuligerus* $\Delta ncyP::acc$ [pAV11-*ncyP*], 9) *S. clavuligerus* $\Delta tal::acc$ 10) *S. clavuligerus* $\Delta tal::acc$ [pAV11] and 11) *S. clavuligerus* $\Delta tal::acc$ [pAV11-*tal*].

Deletion of *ncyP* produced two exconjugants designated as *S. clavuligerus* $\Delta ncyP::acc$. Both mutants produced only traces of naringenin, about 4% of the level of the parental strain indicating that *ncyP* (but not other P₄₅₀ oxygenases present in the cell) is strictly required for naringenin biosynthesis. Therefore, for the first time it is demonstrated that both genes, *ncs* and *ncyP*, are involved in naringenin formation (see *Discussion*).

Complementation of the *ncs* and *ncyP* genes in the deleted mutants restores naringenin production.

Streptomyces clavuligerus mutants $\Delta ncs::acc$ and $\Delta ncyP::acc$ were complemented with each of the deleted genes subcloned in the integrative plasmid pAV11 downstream of the anhydrotetracycline-inducible *tcp80* promoter. The complemented strains were grown in TSB medium in the presence of

3.4. Resultados. Capítulo IV

anhydrotetracycline (10 µg/ml) to induce the tcp80 promoter (Rodríguez-García *et al.*, 2005). Production of naringenin was measured after 96 h of culture in all strains. *S. clavuligerus* ATCC 27064 produced 58 µg/ml. The control transformant with the integrated empty plasmid, *S. clavuligerus* [pAV11], produced a slightly lower naringenin level (48 µg/ml). The production in the deleted mutants and their controls transformed with the empty plasmid dropped to 2 to 7 µg/ml in the different strains. However, complementation of the *ncs*-deleted mutant resulted in restoration of naringenin production (to 55 µg/ml) and complementation of the *ncyP*-deleted mutant resulted in naringenin concentrations of 42 µg/ml (**Fig. 3.4.5B**). These results confirmed the involvement of *ncs* and *ncyP* in naringenin biosynthesis.

***S. clavuligerus* Δ tal::acc, deleted in the tal gene, does not produce naringenin and production is restored by complementation**

Using oligonucleotides tal_F and tal_R a 1929 bp DNA fragment was amplified, sequenced and used to locate a cosmid containing the *tal* gene. Two cosmids D6-6 and D9-10 gave positive hybridization with the 1.9 kb DNA fragment. The sequencing of the insert of both cosmids showed that the *tal* gene was in a central position in cosmid D9-10 which was used for further studies. Seven apramycin resistant kanamycin sensitive clones, deleted in *tal*, were obtained by the Redirect technique. The seven clones were identical by restriction mapping, PCR amplification and sequencing confirming that the *tal* gene was substituted by the *acc* gene; the deleted strain was named *S. clavuligerus* Δ tal::acc. The *tal* mutant showed a normal behavior in sporulation and aerial mycelium formation in TSB and ME media. When they were grown in TSB liquid cultures the naringenin production at 96 h was lower than 6% in comparison to the wild type strain. Complementation of one of these mutants with the *tal* gene results in a transformant producing 46 µg/ml, which is 95% of the production of the control strain *S. clavuligerus* [pAV411] (**Fig. 3.4.5B**). This confirms that the ammonia lyase encoded by *tal* is involved in naringenin formation, probably by using tyrosine or phenylalanine as substrates to form the 4-coumaric acid precursor unit. In this respect, *S. clavuligerus* is similar to monocotyledonous plants that are able to use a TAL to form directly p-coumaric acid and differs from dicotyledonous plant cells which form coumaric acid through a hydroxylation of trans-cinnamic acid by the enzyme cinnamate-4-hydroxylase. The genome of *S. clavuligerus* does not contain a coumarate-4-hydroxylase.

RT-PCR transcription analysis of the genes involved in naringenin biosynthesis

Expression of *ncs* and *ncyP* in two different media (SA and TSB) was tested by RT-PCR at 24 and 48 h of culture. As shown in **Fig. 3.4.6** a very weak amplification band of these two genes is observed in cultures grown in SA medium while a strong amplification signal appears in TSB medium what corroborates our initial results on

production of naringenin in each of these media. Expression of these genes might be induced by soybean-derived compounds in the triptic soybean broth as reported for other P_{450} genes (Sariaslani and Kuntz, 1986). Using the oligonucleotides indicated in **Table 3.4.S1** an RT-PCR analysis was done for the intergenic *ncs-ncyP* region. No amplification of the intergenic fragment was detectable (not shown) in RNA samples in which both *ncs* and *ncyP* were clearly amplified, indicating that each of these genes was expressed as a monocistronic unit.

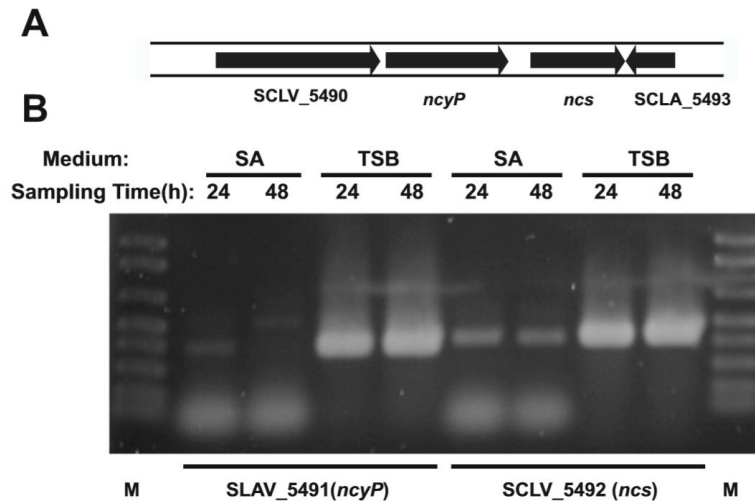


Fig 3.4.6. Organization and expression of the *ncs* and *ncyP* cluster of *S. clavuligerus*. **A)** Organization of the *ncs-ncyP* gene cluster. **B)** Expression of the *ncyP* and *ncs* genes in SA and TSB medium at 24 and 48 h of growth as detected by RT-PCR after 35 cycles of amplification in the conditions indicated in Materials and Methods.

To determine whether the stimulatory effect observed by phenylalanine and tyrosine addition to the cultures was due to an induction effect, quantification by qRT-PCR of the *ncs*, *ncyP* and *tal* transcripts in control cultures and cultures supplemented with phenylalanine or tyrosine (each at 5 and 10 mM concentration) was made. No significant differences in the transcription of the three genes was observed following phenylalanine or tyrosine addition, and only a very weak stimulation of the *ncs* transcription was observed in the presence of phenylalanine. Therefore the stimulatory effect of aromatic amino acids on naringenin production is likely due to a precursor effect and not to induction of the naringenin biosynthetic genes.

3.4.5. DISCUSSION

The two genes *ncs-ncyP* cluster and the *tal* gene, although located in two separate not too distant positions in the genome (47.3 kb), may cooperate in the

3.4. Resultados. Capítulo IV

formation of the p-coumaric acid precursor unit and in the assembly of the naringenin molecule.

Bacterial type III polyketide synthases are a group of PKSs that contain two KS domains and catalyze repeated condensations of malonyl/CoA units. They reassemble plant chalcone synthases (Austin and Noel, 2003) in amino acid sequence, although the plant chalcone synthases are usually larger enzymes. Some type III PKSs have been described in soil dwelling *Streptomyces* species and some related actinobacteria (Zeng *et al.*, 2012). Several of these PKSs are involved in the production of red-brown pigments and consequently the encoding gene was named *rppA* (Cortés *et al.*, 2002; Ikeda *et al.*, 1996; Funa *et al.*, 2005). The best known of these PKSs is the 1,3,6,8 tetrahydroxynaphthalene (THN) synthase of *S. griseus* and *S. coelicolor* encoded by the *rppA* gene. In the formation of THN the RppA PKS uses malonyl-CoA as starter unit and three additional malonyl-CoA as elongation units (Funa *et al.*, 1999). In some *Streptomyces* species the THN is further oxidized to the naphthoquinone flavolin (Zeng *et al.*, 2012).

The *Streptomyces* RppA were hypothesized to have a small active center cavity that allowed only the entry of small acyl-CoA derivatives such as malonyl-CoA (Funa *et al.*, 2002) at difference of the plants chalcone synthases that use bulky starter units such as p-coumaroyl-, caffeoyl- or trans-cinnamoyl-CoA.

In *S. clavuligerus*, as shown in this article, and also in plants, the initial product of the Ncs is the naringenin chalcone that in plants is usually later converted in flavonoids. Naringenin is synthesized by cyclization of a tetraketide formed by condensation of a p-coumaroyl-CoA starter and three malonyl-CoA elongation units (**Fig. 3.4.1**). The cyclization mechanism catalyzed by Ncs that leads to the formation of the pyrone ring of naringenin (**Fig. 3.4.1**) is different from the aromatization mechanism that results in the formation of THN, which involves a condensation with the free carboxyl group of the starter malonyl-CoA.

Crystal structure of some CHSs (Ferrer *et al.*, 1989; Jez *et al.*, 2000) have revealed an important role of the size of the cavity of the active center in the selection of the starter unit, and therefore, of the product of Ncs versus other related type III PKSs.

The high degree of identity of the *S. clavuligerus* Ncs and the RppAs of *S. avermitilis* and *S. coelicolor* (76 and 74% identity, respectively) and the presence of the catalytic triad indicates that the *S. clavuligerus* Ncs enzyme is a member of the RppA family. However, *S. clavuligerus* does not produce significant amounts of THN or THN-derived pigments indicating that p-coumaroyl-derived naringenin is the major product of this enzyme. Furthermore, the Δncs mutant is not albino at difference of the *S. griseus* $\Delta rppA$ mutant and does not change in colour with respect to its parental strain.

The *ncs*-encoded naringenin chalcone synthase contains the characteristic catalytic triad Cys¹³⁸ and His²⁷⁰ but has Asn³⁰³ instead of the standard Gln³⁰³ that is present in several RppA and RppA-analogues from different *Streptomyces* species (Li *et al.*, 2007; Zeng *et al.*, 2012).

The Tyr²²⁴ in the entry channel of RppA's was proposed as the amino acid determining the selective use of malonyl-CoA as starter unit, although this hypothesis was later disputed by new evidence provided by a set of mutants in the Tyr²²⁴ residue (Li *et al.*, 2007). Interestingly, the *S. clavuligerus* Ncs has a conserved Tyr at position 224 thus indicating that this amino acid is not an obstacle for the entry of p-coumaroyl-CoA as starter unit of the polyketide. Indeed, the wild type *S. coelicolor* RppA enzyme is able to use benzoyl-CoA (and even phenylacetyl-CoA) as starter for the formation of the corresponding tetraketide-derived pyrone (Li *et al.*, 2007) these products contains an starter-derived aromatic ring and are closed as a pyrone ring, and, therefore, resemble naringenin. In *S. coelicolor* these pyrones were considered to be "derailment" products of the THN pathway but reflect the potential of RppA to synthesize naringenin-like compounds. These pyrones may be natural products formed together with THN in low concentration probably due to the scarcity or lack of benzoyl-CoA, p-coumaroyl-CoA or other aryl-CoA precursors which are abundant in *S. clavuligerus* and *S. maritimus* (Xiang and Moore, 2002) due to the presence of a PAL or TAL ammonia lyase.

Linked to the *ncs* gene there is a deduced *ncyP* gene encoding a P₄₅₀ oxygenase that is strictly required for naringenin biosynthesis. Similarly the P₄₅₀ gene associated with *rppA* in *S. griseus* (known as *rppB*) is also required for THN formation (Ueda *et al.*, 1995; Funa *et al.*, 2002). Our transcriptional studies show that those two genes are transcribed as separated transcripts whereas in *S. griseus* they appear to be co-transcribed and are translationally coupled, suggesting that both proteins are likely to form a functional couple. Cortés *et al.* (2002) suggested that the RppA associated P₄₅₀ has a role in cross-linking of THN molecules and this hypothesis was later supported by strains overexpression *rppB* that form dimers and trimers of flavolin, the quinone derived from THN. However, this P₄₅₀ oxygenase has probably a role as a helper in the cyclization of the tetraketides, both in THN and naringenin biosynthesis, what explains the essential role of the P₄₅₀ oxigenases in the formation of THN and naringenin that proceeds by different final cyclization processes.

Tyrosine ammonia lyase and formation of p-coumaroyl-CoA

Phenylalanine and tyrosine ammonia lyases belong to a family of aromatic amino acid ammonia lyases that are closely related to bacterial histidine ammonia lyases and aminomutases (Louie *et al.*, 2006). These enzymes catalyze the non-oxidative deamination of aromatic amino acids resulting in the formation of trans-p-coumaric acid when the substrate is L-tyrosine or trans-cinnamic acid when the

3.4. Resultados. Capítulo IV

substrate is phenylalanine. The biosynthesis of trans-cinnamic acid in dicotyledonous plants is catalyzed by a large PAL that works as a tetramer. A separate enzyme cinnamate 4-hydroxylase introduces the hydroxyl group at position 4 of the aromatic ring. In monocotyledonous plants both reactions are catalyzed by a single enzyme with TAL/PAL activities that may form directly p-coumaric acid (Rosler *et al.*, 1997). The bacterial aryl ammonia lyases are smaller (about 400 amino acids) tetrameric enzymes (Louie *et al.*, 2006) ammonia lyases. Based on the crystal structure of the *Rhodobacter* histidine ammonia lyase and in the kinetics data of some mutant enzymes Louie and coworkers (2006) proposed that His⁸⁹ has an important role in the recognition of histidine or aromatic amino acids as substrates since His⁸⁹ forms hydrogen bridges with the substrates of the enzyme.

75	102	161	316	365	452	
YGVTGFG...	LITYH...	SVGASGDLV...	QDPYSIR...	GGNFYGG...	EAHNQDKV...	<i>Streptomyces clavuligerus</i>
YGVTGFG...	LITYH...	SVGASGDLV...	QDRYSIR...	GGNFYGG...	EAHNQDKV...	<i>Saccharopolyspora spinosa</i> 67%
YGVTGFG...	LIRYH...	SVGASGDLV...	QDRYSVR...	GGNFYGG...	SAMQEDHV...	<i>Saccharothrix espanaensis</i> 67%
YGVTGFG...	LIRYH...	SLGASGDLV...	QDRYSVR...	GGNFYGG...	EAHNQDKV...	<i>Amycolatopsis decaplanina</i> 56%
YGVTSGFG...	LIRFL...	SVGASGDLV...	QDRYSVR...	GGNFYGG...	EAHNQDKV...	<i>Streptomyces rimosus</i> 56%
YGVTGFG...	MLRFL...	SCGASGDLI...	QDKYSIR...	GGNFYGS...	EAHNQDKV...	<i>Solirubrobacter soli</i> 52%
YGVTGFG...	IVRSH...	SLGCSGDLA...	QDAYSVR...	NGNFHGA...	SAMQEDHV...	<i>Streptomyces coelicolor</i> 39%
YGVTGFG...	IVRSH...	SLGCSGDLA...	QDAYSVR...	NGNFHGA...	SAMQEDHV...	<i>Streptomyces avermitilis</i> 39%
YGVTGFG...	IVRSH...	SLGCSGDLA...	QDAYSVR...	NGNFHGA...	SAMQEDHV...	<i>Streptomyces globisporus</i> 41%
YGVNTSMG...	LINAV...	SLGTSGLD...	EDAYSIR...	NGHFHQ...	TADFQDIV...	<i>Streptomyces maritimus</i> 37%
YGLTTGFG...	LVHHL...	TVGASGDLT...	QDAYSLR...	GGNFMGQ...	NAANQDVV...	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> 40%
** . . . **.*.*.*.*	.. * * *	. * * *	. * * *	

Fig. 3.4.7. Partial amino acid sequence alignment of regions known to form the active site of TAL proteins. Above are indicated the amino acid positions in *S. clavuligerus* SCLAV_5457 sequence. At the right side is shown the % of amino acids identity of the whole protein. The sequences used in this figure are ammonia lyases from *Saccharopolyspora spinosa* (WP_029535616.1), *Saccharothrix espanaensis* (WP_015102494), *Amycolatopsis decaplanina* (WP_007032994), *Streptomyces globisporus* (WP_029182093.1), *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970 (ELQ83456.1), *Streptomyces maritimus* EncP (gb|AAF81735.1), *Solirubrobacter soli* (WP_028063475.1), *Streptomyces coelicolor* (WP_629085.1), *Streptomyces avermitilis* (WP_010984755.1) and *Rhodobacter sphaeroides* (WP_011339422.1).

The *S. clavuligerus* TAL, as the homologous enzyme of *Saccharothrix spanaensis* involved in the biosynthesis of saccharomicin (Berner *et al.*, 2006), has a rather different amino terminal region when compared with the *Rhodobacter* enzyme, although six motifs described in the *Rhodobacter* enzyme to interact with the substrate are conserved to some degree (**Fig. 3.4.7**). The H⁸⁹ present in the *Rhodobacter* ammonia lyase corresponds to Y¹⁰⁵ in *S. clavuligerus* TAL; this Y is conserved or substituted by Phe in a small group of *Streptomyces* species (or other actinomycetes species) which have ammonia lyases with 50 to 60% identity to the *S. clavuligerus* TAL, while the bulk of *Streptomyces* ammonia lyases have about 40%

identity with the *S. clavuligerus* enzyme, have an IVRSH sequence with serine at the corresponding 105 position. Although all the actinomycetes enzymes lack His⁸⁹ the Phe⁸⁹ probably plays the same role of interaction with aromatic amino acid substrates. Using in vitro reactions with the *Saccharothrix* enzyme, that has a LIKYH domain carrying tyrosine (Berner *et al.*, 2006) it has been clearly demonstrated that the product of this ammonia lyase is p-coumaric acid and not trans-cinnamic acid and the substrate used is L-tyrosine. Similar observations have been made for tyrosine amino mutase of *Streptomyces globisporus* that forms p-coumaric acid as an intermediate in the α - to β - tyrosine isomerization and has 37% identity to the *S. clavuligerus* TAL. Similar enzymes are present in the genomes of several *Streptomyces* species that form a separate class with the characteristic Phe⁸⁹ but it is unknown if they serve as aryl ammonia lyases or as aromatic amino acid amino-mutases.

The aromatic amino acid ammonia lyases have an autocatalytically formed prosthetic group that is also present in the *S. clavuligerus* TAL protein as deduced from spectrophotometric studies (Álvarez-Álvarez, unpublished results). These enzymes were thought to contain a dehydroalanine prosthetic group derived from serine (in the *Rhodobacter sphaeroides* HAL protein) but later molecular genetics and spectrophotometric studies (Schwede *et al.*, 1999; Röther *et al.*, 2000) established that the prosthetic group is methylenimine-imidazol-5-one (MIO). This molecule is formed by autocatalytic dehydration and cyclization of the internal tripeptide ala-ser-gly that in *S. clavuligerus* TAL corresponds to amino acids A¹⁶⁴-S¹⁶⁵-G¹⁶⁶ (**Fig. 3.4.7**). This tripeptide precursor of the prosthetic MIO group is present in all putative aromatic ammonia lyases and amino acid mutases in several *Streptomyces* species.

Acknowledgement. This work was supported by Grant BIO2012-34723 from the Spanish Ministry of Economy and Competitively. R. Álvarez-Álvarez received a FPU fellowship from the Spanish Ministry of Education, Culture and Sports.

3.4.6 REFERENCES

- Appert, C., E. Logemann, K. Hahlbrock, J. Schmid, and N. Amrhein.** (1994). Structural and catalytic properties of the four phenylalanine ammonia-lyase isoenzymes from parsley. *Eur. J. Biochem.* 225: 491-499.
- Austin, M.B, and Noel, J.P.** (2003). The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Nat Prod Rep.* 20: 79-110.
- 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., Rabbinowitsch, E., Rajandream, M.A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K.,**

3.4. Resultados. Capítulo IV

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: 141-147.

Baedeker, M. and Schulz, G.E. (2002). Autocatalytic Peptide Cyclization during Chain Folding of Histidine Ammonia-Lyase. *Structure*. 10: 61-67.

Baggaley, K.H., Brown, A.G., and Schofield, C.J. (1997). Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and other clavams. *Nat Prod Rep*. 14: 309-333.

Berner, M., Krug, D., Bihlmaier, C., Vente, A., Müller, R., and Bechthold, A. (2006). Genes and enzymes involved in caffeic acid biosynthesis in the actinomycete *Saccharothrix espanaensis*. *J Bacteriol*. 188: 2666-2673.

Cavia-Saiz, M., Busto, M.D., Pilar-Izquierdo, M.C., Ortega, N., Pérez-Mateos, M., and Muñiz P. (2010). Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringenin: a comparative study. *J Sci Food Agric*. 90: 1238-1244.

Cortés, J., Velasco, J., Foster, G., Blaackaby, A.P., Rudd, B.A.M. and Wilkinson, B. (2002). Identification and cloning of a type III polyketide synthase required for diffusible pigment biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea*. *Mol Microbiol*. 44: 1213-1224.

Ferrer, J.L., Jez, J.M., Bowman, M.E., Dixon, R. A., and Noel, J.P. (1999). Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. *Nat Struct Biol*. 6: 775-784.

Funa, N., Ohnishi, Y., Fujii, I., Shibuya, M., Ebizuka, Y., and Horinouchi, S. (1999). A new pathway for polyketide synthesis in microorganisms. *Nature*. 400: 897-899.

Funa, N., Ohnishi, Y., Ebizuka, Y., and Horinouchi S. (2002). Properties and substrate specificity of RppA, a chalcone synthase-related polyketide synthase in *Streptomyces griseus*. *J Biol Chem*. 277: 4628-4635.

Funa, N., Funabashi, M., Ohnishi, Y., and Horinouchi, S. (2005). Biosynthesis of Hexahydroxyperylenequinone Melanin via Oxidative Aryl Coupling by Cytochrome P-450 in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol*. 187: 8149-8155.

Ikeda, K., Masujima, T., Suzuki, K., and Sugiyama, M. (1996). Cloning and sequence analysis of the highly expressed melanin-synthesising gene operon from *Streptomyces castaneoglobisporus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 45: 80-85.

Jagetia, A., Jagetia, G.C., and Jha, S. (2007). Naringin, a grapefruit flavanone, protects V79 cells against the bleomycin-induced genotoxicity and decline in survival. *J Appl Toxicol.* 27: 122-132.

Jensen, S.E. (2012). Biosynthesis of clavam metabolites. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 39: 1407-1419.

Jez, J.M., and Noel, J.P. (2000). Mechanism of chalcone synthase. pKa of the catalytic cysteine and the role of the conserved histidine in a plant polyketide synthase. *J Biol Chem.* 275: 39640-39646.

Kyndt, J.A., Meyer, T.E., Cusanovich, M.A., and Van Beeumen, J.J. (2002). Characterization of a bacterial tyrosine ammonia lyase, a biosynthetic enzyme for the photoactive yellow protein. *FEBS Lett.* 512: 240-244.

Lamas-Maceiras, M., Vaca, I., Rodríguez, E., Casqueiro, J., and Martín, J.F. (2006). Amplification and disruption of the phenylacetyl-CoA ligase gene of *Penicillium chrysogenum* encoding an aryl-capping enzyme that supplies phenylacetic acid to the isopenicillin N-cyltransferase. *Biochem J.* 395: 147-155.

Li, B., and Walsh, C.T. (2010). Identification of the gene cluster for the dithiolopyrrolone antibiotic holomycin in *Streptomyces clavuligerus*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107: 19731-19735.

Li, S., Grünschow, S., Dordik, J., and Sherman, D. H. (2007). Molecular analysis of the role of tyrosine 224 in the active site of *Streptomyces coelicolor* RppA, a bacterial Type III polyketide synthase. *J Biol Chem.* 282: 12765-12772.

Liras, P. and Demain, A.L. (2009). Enzymology of β -Lactam Compounds with Cephem Structure Produced by Actinomycete. In "*Methods in Enzymology*", Vol. 458. Hopwood, D., (ed). Burlington: Academic Press, pp. 401-429

Louie, G.V., Bowman, M.E., Moffitt, M.C., Baiga, T.J., Moore, B.S., and Noel, J.P. (2006). Structural determinants and modulation of substrate specificity in phenylalanine-tyrosine ammonia-lyases. *Chem Biol.* 13: 1327-1338.

3.4. Resultados. Capítulo IV

Martín, J.F., Ullán, R.V., García-Estrada, C. (2012). Role of peroxisomes in the biosynthesis and secretion of β -lactams and other secondary metabolites. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 39: 367-82.

Martín, J.F. and Liras, P. (2014). Novel antimicrobial and other bioactive metabolites obtained from silent gene clusters. In *Antibiotics Current Innovations and Future Trends*. Sanchez, S. and Demain, A.L. (eds). Caister Academic Press, pp. 275-292.

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., and 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., and Hosaka, T. (2013). New strategies for drug discovery: activation of silent or weakly expressed microbial gene clusters. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97: 87-98.

Pérez-Redondo, R., Santamarta, I., Bovenberg, R., Martín, J.F., and Liras, P. (2010). The enigmatic lack of glucose utilization in *Streptomyces clavuligerus* is due to inefficient expression of the glucose permease gene. *Microbiology.* 156: 1527-37.

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-García, A., Combes, P., Pérez-Redondo, R., Smith, M.C., and Smith, M.C. (2005). Natural and synthetic tetracycline-inducible promoters for use in the antibiotic-producing bacteria *Streptomyces*. *Nucleic Acids Res.* 33: e87.

Rosler, J., Krekel, F., Amrhein, N., and Schmid, J. (1997). Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase activity. *Plant Physiol.* 113: 175-179.

Röther D, Merkel D, Rétey J. (2000). Spectroscopic Evidence for a 4-Methylidene Imidazol-5-one in Histidine and Phenylalanine Ammonia-Lyases. *Angew Chem Int Ed Engl.* 39: 2462-2464.

Santamarta, I., López-García, M.T., Kurt, A., Nárdiz, N., Álvarez-Álvarez, R., Pérez-Redondo, R., Martín, J.F., and Liras, P. (2011). Characterization of DNA-binding sequences for CcaR in the cephamycin-clavulanic acid supercluster of *Streptomyces clavuligerus*. *Mol Microbiol.* 81: 968-981.

Sariaslani, F.S., and Kunz, D.A. (1986). Induction of cytochrome P-450 in *Streptomyces griseus* by soybean flour. *Biochem Biophys Res Commun.* 141: 405-410.

Schwede, T.F., Rétey, J. and Schulz, G.E. (1999). Crystal structure of histidine ammonia-lyase revealing a novel polypeptide modification as the catalytic electrophile. *Biochemistry.* 38: 5355-5361.

Schneider, K., H"ovel, K., Witzel, K., Hamberger, B., Schomburg, D., Kombrink, E. and Stuible, H. P. (2003). The substrate specificity-determining amino acid code of 4-coumarate:CoA ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 8601-8606.

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., and Kim, J.F. (2010). Draft genome sequence of *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585, a producer of diverse secondary metabolites. *J Bacteriol.* 192: 6317-6318.

Schröder, J. (1999). Probing plant polyketide biosynthesis. *J. Nat Struct Biol.* 6: 714-716.

Ueda, K., Kim, K.M., Beppu, T. and Horinouchi, S. (1995). Overexpression of a gene cluster encoding a chalcone synthase-like protein confers redbrown pigment production in *Streptomyces griseus*. *J Antibiot (Tokyo).* 48: 638-646.

Wu, J., Zhou, T., Du, G., Zhou, J., Chen, J. (2014). Modular Optimization of Heterologous Pathways for De Novo Synthesis of (2S)-Naringenin in *Escherichia coli*. *PlosOne.* 9: e101492.

Xiang, L., and Moore, B.S. (2002). Inactivation, complementation, and heterologous expression of *encP*, a novel bacterial phenylalanine ammonia-lyase gene. *J Biol Chem.* 277: 32505-32509.

Zeng, J., Decker, R. and Zhan, J. (2012). Biochemical characterization of a type III polyketide biosynthetic gene cluster from *Streptomyces toxytricini*. *Appl Biochem Biotechnol.* 166: 1020-1033.

4. Discusión

El interés industrial de *Streptomyces clavuligerus* se debe a que es el principal productor del ácido clavulánico, un inhibidor de beta-lactamasas, que se administra combinado junto con antibióticos beta-lactámicos como la amoxicilina para el tratamiento de distintas infecciones. Este hecho explica el profundo estudio microbiológico, bioquímico y genético que se ha realizado de esta cepa desde su aislamiento y caracterización por Higgins y Kastner en 1971.

Inicialmente, debido a los escasos conocimientos en genética molecular, los mutantes superproductores de ácido clavulánico, cefamicina C u otros metabolitos como la holomicina eran obtenidos mediante técnicas de mutagénesis al azar. El posterior desarrollo de técnicas moleculares permitió ahondar en la organización génica de las agrupaciones biosintéticas implicadas en la producción de estos metabolitos, así como de los reguladores más o menos específicos que coordinan dicha producción y que en ocasiones pueden estar implicados en el metabolismo primario, el desarrollo y diferenciación morfológica. En este sentido, durante los últimos treinta años se han aislado y caracterizado en nuestro laboratorio los genes y enzimas para la biosíntesis de cefamicina C y de ácido clavulánico (Liras y col., 2008; Liras y Demain, 2009), y se han estudiado los mecanismos de regulación de su producción. Como ya se ha indicado anteriormente, las agrupaciones biosintéticas de ácido clavulánico y cefamicina C están adyacentes en el cromosoma de *S. clavuligerus* y controlados conjuntamente por un regulador positivo tipo SARP, codificado por el gen *ccaR*, que se localiza en la agrupación de genes para cefamicina C (Pérez-Llarena y col., 1997).

Papel de CcaR en la regulación global de la producción de antibióticos en S. clavuligerus

La regulación específica de la producción de ácido clavulánico y cefamicina C por la proteína activadora CcaR resulta evidente, ya que el mutante interrumpido en *ccaR* anula la producción de ambos metabolitos (Pérez-Llarena y col., 1997). Resultados similares fueron obtenidos en otro grupo de investigación con el mutante delecionado *S. clavuligerus* $\Delta ccaR::tsr$ (Alexander y Jensen, 1998). Sin embargo, la cepa afectada en *ccaR* presenta otras diferencias fenotípicas respecto a la cepa parental. Así, los sobrenadantes de los cultivos de mutantes *ccaR* poseen una coloración amarilla, debido a la producción de holomicina (de la Fuente y col., 2002). Este hecho pone de manifiesto la compleja red de regulación en *Streptomyces clavuligerus*, en lo que al metabolismo secundario se refiere, de forma que la inactivación de un regulador específico de ruta para la biosíntesis de ácido clavulánico y cefamicina C activa la producción de la holomicina, compuesto no producido por la cepa parental en las condiciones experimentales utilizadas. Podemos deducir que bien sea mediante de forma directa o indirecta, CcaR ejerce un control negativo en la producción de la holomicina, no regulando exclusivamente la producción del ácido clavulánico y de la

4. *Discusión*

cefamicina C. También se ha observado que el regulador CcaR parece tener un papel importante sobre el desarrollo y la diferenciación morfológica, ya que el mutante *ccaR* es defectivo en esporulación.

La compañía DSM (Delf, Holanda) en colaboración con el *Institute for Genome Research* (TIGR) llevó a cabo la secuenciación en 2005 del genoma de *S. clavuligerus*, y ha publicado de forma fraccionada grandes partes de su genoma; la secuencia de unos 800 genes fue suministrada a nuestro grupo dentro de un convenio de investigación. En el año 2008, la compañía *Agilent Technologies* en base a estas secuencias elaboró para nuestro grupo micromatrices que contienen parte del genoma de *S. clavuligerus*, además del genoma completo de *S. coelicolor*, microorganismo modelo del género.

Con estos precedentes, se realizaron experimentos transcripcionales mediante micromatrices de la cepa *S. clavuligerus* $\Delta ccaR::tsr$ con el fin de analizar el efecto global del regulador CcaR sobre el metabolismo primario y secundario (**Capítulo I de Resultados**). Los resultados de expresión de los genes de agrupaciones biosintéticas concuerdan con el perfil fenotípico y los estudios transcriptómicos previos (Santamarta y col., 2011; Robles-Reglero y col., 2013).

Los genes de las agrupaciones de ácido clavulánico y cefamicina C presentan un descenso generalizado en la tasa de transcripción en la cepa mutante *ccaR* respecto a la cepa silvestre debido a la ausencia del activador específico. Todos los genes biosintéticos de holomicina presentes en las micromatrices se encuentran sobreexpresados en la cepa mutante. El análisis bioinformático de las regiones promotoras de estos genes no muestra cajas heptaméricas consenso de unión a CcaR, en cuyo caso debería ejercer un improbable control negativo, por lo que parece que la activación de la biosíntesis de holomicina en el mutante *ccaR* se produce de forma indirecta por una cascada reguladora aún desconocida.

En la introducción de esta tesis doctoral (*ver epígrafe 1.1.3.1*) cuestionábamos el modelo clásico de la regulación del metabolismo secundario basado en un sistema jerárquico donde los reguladores globales o pleiotrópicos se ubican en un nivel superior controlando los reguladores específicos de ruta. López-García y col. (2010) observaron en el mutante *S. clavuligerus* $\Delta adpA$ una disminución de la expresión del gen *ccaR* en comparación a la cepa parental, ajustándose al modelo clásico de regulación jerarquizada. Sin embargo, los resultados transcriptómicos obtenidos en relación al gen *adpA*, el cual se haya reprimido en el mutante *S. clavuligerus* $\Delta ccaR::tsr$, confirman la existencia de una compleja red de regulación cruzada sin claros niveles jerárquicos donde el regulador específico CcaR parece modular la expresión del gen del regulador pleiotrópico AdpA. Esta disminución en la expresión de *adpA* se puede explicar al ser la cepa mutante *ccaR* defectiva en la esporulación, ya que AdpA es un regulador clave en la correcta diferenciación morfológica.

La expresión de otros reguladores transcripcionales más o menos específicos, muchos de ellos de función desconocida, y de sistemas de dos componentes se encuentra también afectada en el mutante *ccaR*. Este cambio en el patrón de transcripción de genes reguladores puede explicar la activación de la biosíntesis de otros metabolitos crípticos, como la holomicina, cuya regulación directa aún no han sido identificada experimentalmente. Esta regulación cruzada entre distintos metabolitos secundarios en la que la ausencia o disminución de uno de ellos es compensada con la activación o aumento de la producción de otro no es casual. Estudios de Rodríguez y col. (2008) en *Streptomyces cattleya* son un ejemplo de este hecho frecuente. *S. cattleya* es el microorganismo productor de tienamicina y cefamicina C. En la agrupación biosintética de tienamicina se localizan dos reguladores, *thnI* y *thnU*. *ThnI* es un activador transcripcional tipo LysR que activa la producción de la tienamicina, mientras que *ThnU* es un regulador tipo SARP que actúa regulando la producción de cefamicina C, sin un efecto sobre la producción de tienamicina. La eliminación del gen *thnI*, provoca la anulación en la producción de tienamicina, y a su vez incrementa la producción de la cefamicina C en este mutante, aumentando la expresión de los genes estructurales *pcbAB* y *cmcl*. El efecto de regulación cruzada de *CcaR* modulando la expresión el gen activador *claR*, regulador específico, y otros genes estructurales de la agrupación de ácido clavulánico en *S. clavuligerus* mediante la unión directa a sus regiones promotoras también ha sido demostrado (Santamarta y col., 2011). Sin embargo, en este caso la delección del gen *ccaR* provoca anulación en la producción de cefamicina C y ácido clavulánico (Pérez-Llarena y col., 1997).

El metabolismo primario también se encuentra afectado en la mutante *ccaR*, puesto que como es sabido, la producción de metabolitos secundarios depende directamente de precursores generados a partir de intermediarios procedentes del metabolismo primario. La anulación en la producción de ácido clavulánico o cefamicina C implicaría una reducción en la demanda de estos precursores, activándose una cascada de señalización. En este sentido, podemos observar un descenso en la tasa de transcripción de los genes pertenecientes a la agrupación de la arginina, precursor clave en la biosíntesis del ácido clavulánico. Resulta llamativo el fuerte descenso generalizado en la expresión de los genes implicados en el metabolismo del nitrógeno. Este hecho puede entenderse como la reducción en la demanda de compuestos nitrogenados debido la anulación en la producción de ácido clavulánico y cefamicina C.

Activación de la producción de holomicina: papel modulador de OppA2 y del megaplásmido pSCL4

La producción de holomicina por diferentes cepas mutantes de *S. clavuligerus* resulta ser un claro paradigma de la activación de agrupaciones biosintéticas crípticas de metabolitos secundarios. En el **Capítulo II de Resultados** hemos profundizado en la

4. Discusión

regulación de la biosíntesis de la holomicina mediante la delección del gen *oppA2* y del megaplásmido pSCL4.

En 2002, de la Fuente y colaboradores describieron que la cepa interrumpida en el gen *oppA2* de *S. clavuligerus* era capaz de producir elevadas concentraciones de holomicina, un metabolito secundario con actividad antitumoral de coloración amarilla, no producido por la cepa parental a niveles detectables, siendo los niveles de producción en el mutante *oppA2* mas altos que en la cepa interrumpida en *ccaR*. (Fuente *et al.*, 2002; Lorenzana *et al.*, 2004). Se trataba de uno de los primeros ejemplos de activación de agrupaciones biosintéticas crípticas o silenciosas. El gen *oppA2*, ubicado en la agrupación biosintética del ácido clavulánico, codifica una oligopéptido permeasa implicada en la producción del ácido clavulánico, puesto que su interrupción anula completamente la biosíntesis de dicho compuesto.

La secuenciación completa y publicación del genoma de *S. clavuligerus* (*ver epígrafe 1.2.1*) facilitó una valiosa información sobre organización genómica de este microorganismo. El trabajo de Medema y col. (2010) reduce el tamaño del cromosoma desde las aproximadamente 8 Mb inicialmente estimadas a poco más de 6 Mb, siendo uno de los cromosomas más pequeños de todas las especies descritas del género. Además, la secuenciación puso de manifiesto la presencia del megaplásmido pSCL4 de 1.8 Mb, el cual constituye un importante reservorio de agrupaciones biosintéticas crípticas de metabolitos secundarios (Medema y col., 2010).

En paralelo a los estudios realizados con la cepa *S. clavuligerus* $\Delta ccaR::tsr$, se han realizado en esta tesis experimentos transcripcionales mediante micromatrices de la cepa *S. clavuligerus oppA2::aph* (Lorenzana y col., 2004). Los resultados transcripcionales han puesto de manifiesto que la cepa interrumpida en *oppA2* posee en bajo número copias de los plásmidos pSCL1, pSCL2 y pSCL4, debido probablemente a mutaciones en genes implicados en la replicación o la segregación plasmídica durante la obtención de la cepa mediante regeneración de protoplastos; debido a estos estudios la cepa *S. clavuligerus oppA2::aph* ha sido red denominada *S. clavuligerus oppA2::aph pSCL^{low}*. Esta cepa es nula productora de ácido clavulánico y presenta una producción de holomicina en torno a 1600 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DNA. Respecto a su diferenciación morfológica, la cepa muestra fenotipo "*bald*", es decir, carece de micelio aéreo. La interrupción del gen *oppA2* combinada con el bajo número de copias de los elementos extracromosomales pSCL1, pSCL2 y pSCL4 en la cepa *S. clavuligerus oppA2::aph pSCL^{low}* no permite aclarar cuáles son los cambios genéticos que provocan los cambios fenotípicos descritos. La elaboración de las cepas indicadas en la **Tabla 3.2.1** han permitido desarrollar un correcto análisis funcional de *oppA2* y pSCL4.

La cepa carente de pSCL4 (*S. clavuligerus pSCL4⁻*) produce 1000 μg de holomicina/mg DNA de holomicina, mientras que la cepa delecionada en *oppA2* con un número normal de copias de pSCL4 (*S. clavuligerus* $\Delta oppA2 pSCL⁺$) sólo produce 400 μg

de holomicina/mg DNA. Cuando ambas mutaciones están presentes en la misma cepa (*S. clavuligerus* $\Delta oppA2$ $pSCL4^-$) la producción se incrementa a 1600 μg de holomicina/mg DNA. En base a estos resultados, podemos concluir que la activación de la agrupación críptica de holomicina responde independientemente a la ausencia de *OppA2* y de *pSCL4*, apreciándose un efecto sinérgico debido a la pérdida de ambos elementos. Es probable que se produzca una regulación sobre la agrupación de holomicina debido a la presencia de una o varias proteínas represoras codificadas en *pSCL4*.

En cuanto a la producción de cefamicina C, tanto la delección de *oppA2* como la eliminación de *pSCL4* no parece tener un efecto negativo en producción. Sin embargo, con las distintas cepas demostramos el papel fundamental del gen *oppA2* en la biosíntesis de ácido clavulánico, la cual disminuye parcialmente en ausencia de sólo *pSCL4*.

La correcta esporulación del mutante *S. clavuligerus* $\Delta oppA2$ $pSCL4^+$ y el fenotipo "blad" de *S. clavuligerus* $pSCL4^-$ confirman que *OppA2* no está implicada en el proceso de diferenciación morfológica en *S. clavuligerus*. Los genes *whi* y *bld* implicados en la formación de micelio aéreo y la esporulación se localizan en el cromosoma, sin embargo es posible que en *pSCL4* puedan localizarse genes esenciales implicados en el proceso de diferenciación morfológica.

pSCL4: Un gran elemento extracromosomal reservorio de agrupaciones biosintéticas de metabolitos secundarios en S. clavuligerus

Como se ha indicado anteriormente, *pSCL4* actúa como reservorio para la biosíntesis de aproximadamente la mitad de los metabolitos que potencialmente es capaz de producir *S. clavuligerus* (Medema y col., 2010).

La construcción de la cepa *S. clavuligerus* $pSCL4^-$ en este trabajo se ha basado en la estrategia descrita por Hsu y Chen (2010) quienes eliminaron el plásmido lineal SLP2 de 50 Kb en *Streptomyces lividans*. El plásmido *pSCL4* de *S. clavuligerus* posee en su zona central, próxima al *oriC* dos genes: *parA* (SCLAV_p0885) y *parB* (SCLAV_p0884). Las proteínas *ParA* y *ParB* permiten específicamente la segregación de este megaplásmido durante la división celular, en el proceso de esporulación. La obtención del mutante *S. clavuligerus* $\Delta parAB_{pSCL4::acc}$ y su posterior esporulación permitió seleccionar clones sensibles a apramicina de los que posteriormente se obtuvo la cepa carente de *pSCL4*. Con esta cepa hemos demostrado que *pSCL4* es un elemento extracromosomal que pese a su gran tamaño, resulta ser dispensable. El origen de este plásmido de gran tamaño, como ocurre en otras especies del género, puede explicarse mediante fenómenos de transferencia horizontal entre distintas especies (Kinashi, 2011). Aunque en condiciones experimentales la mayoría de las agrupaciones génicas presentes en *pSCL4* se encuentran silenciadas, su expresión en el hábitat natural

4. *Discusión*

pueden conferir a la cepa que las contiene ventajas ecológicas frente a otros organismos competidores (Brakhage and Schroeckh, 2011).

La activación de todas las agrupaciones crípticas de metabolitos secundarios presentes tanto en pSCL4 como en el cromosoma, mediante diferentes técnicas (*ver epígrafe 1.1.3.2*), supone un valioso potencial de esta especie a la hora de producir una amplia variedad de nuevos fármacos aún no descritos. Las predicciones bioinformáticas de las proteínas codificadas por los genes de las supuestas agrupaciones biosintéticas presuponen la naturaleza del metabolito por homología a las descritas en otras especies. Sin embargo, estas predicciones no dejan de ser meras especulaciones, pudiendo producirse compuestos con una estructura química que presente modificaciones distintas al compuesto inicialmente predicho, resultando en actividades biológicas diferentes.

El silenciamiento de agrupaciones crípticas de metabolitos secundarios puede ser debido al menos a tres mecanismos genéticos distintos (Martín y Liras, 2014). El primero consiste en el silenciamiento de agrupaciones biosintéticas mediante reguladores transcripcionales que actúan reprimiendo la expresión de los genes que la forman. La activación de estas agrupaciones crípticas puede tener lugar mediante inductores externos o modificaciones bioquímicas en el metabolismo celular. En este mecanismo de silenciamiento encajamos la regulación de producción de holomicina, donde la presencia de proteínas como CcaR, OppA2 o posibles represores codificados en pSCL4 regulan negativamente su producción. Una segunda clase de silenciamiento de agrupaciones biosintéticas para metabolismo secundario consiste en la pérdida de genes estructurales clave que participan en las reacciones catalíticas de síntesis del compuesto, denominándose a estas agrupaciones degeneradas. El tercer tipo de silenciamiento de agrupaciones biosintéticas se basa en fallos de las regiones promotoras de los genes estructurales o de los propios reguladores específicos de la ruta.

La agrupación de ácido clavulánico en Streptomyces flavogriseus: silenciamiento y transferencia horizontal génica

En el **Capítulo III de Resultados** analizamos la presencia de la agrupación del ácido clavulánico en *S. flavogriseus* ATCC 3331 y *Saccharomonospora viridis* DSM 43017, centrando nuestro estudio en *S. flavogriseus*. La presencia de la agrupación de ácido clavulánico en *S. flavogriseus* resulta ser un claro ejemplo de dos fenómenos frecuentes en las especies del género *Streptomyces*: el silenciamiento de una agrupación génica de un metabolito secundario y el fenómeno de transferencia horizontal de genes.

La agrupación génica de biosíntesis de ácido clavulánico en *S. flavogriseus* posee todos los genes de la agrupación de *S. clavuligerus* necesarios para la

producción del metabolito. Sin embargo, la disposición de los genes no es idéntica, existiendo una reorganización de distintos bloques o "subclusters". Además, la agrupación de ácido clavulánico en *S. flavogriseus*, contiene el gen regulador *ccaR* que en *S. clavuligerus* está presente en la agrupación de cefamicina C y es necesario en la producción de ácido clavulánico.

Debido a la ausencia de producción de ácido clavulánico por *S. flavogriseus*, empleando nueve medios de cultivo distintos en los que *S. clavuligerus* produce altas concentraciones, se ha considerado que en *S. flavogriseus* la agrupación de ácido clavulánico es críptica o silenciosa. Los resultados mediante RT-PCR cuantitativa de los genes biosintéticos en *S. flavogriseus* mostrados en la **Figura 3.3.5B** confirman el silenciamiento parcial de la agrupación, debido a diferentes niveles de expresión de los subclusters que la forman. Así, mientras el bloque de genes que codifica las enzimas implicadas en las etapas tempranas se expresan a un alto nivel, otros grupos de genes presentan tasas bajas de expresión. La correcta expresión de los reguladores específicos *ccaR* y *claR* sugiere que los genes no expresados han sufrido modificaciones en sus regiones promotoras que afectan a la correcta interacción de la RNA polimerasa y los activadores transcripcionales CcaR y ClaR.

S. flavogriseus posee en su genoma la agrupación de tienamicina, a 41 Kb aproximadamente de distancia de la agrupación de ácido clavulánico. Esta agrupación génica está aparentemente completa y conserva la misma organización que en *Streptomyces cattleya*, especie descrita como productora de tienamicina. Sin embargo, *S. flavogriseus* no produce tienamicina en diferentes medios de cultivo, tratándose de otra más agrupación críptica o silenciosa (Blanco, 2012).

Generalmente, la presencia de las mismas agrupaciones biosintéticas para metabolitos secundarios más o menos conservadas en distintas especies, alejadas filogenéticamente, responde al fenómeno de transferencia horizontal de genes. En el hábitat natural, las bacterias son capaces de "importar" e integrar en su genoma fragmentos de DNA exógeno de orígenes diversos (Eisen, 2000; Nakumura y col., 2004; Didelot y Maiden, 2010). Este hecho, conocido como transferencia horizontal genética es, junto con las mutaciones más o menos puntuales, la base de la evolución de los genomas bacterianos. Estos son vistos como procesos que ocurren continuamente en las poblaciones bacterianas. La introducción de este DNA exógeno suele ser deletéreo, aunque en circunstancias específicas pueden conferir un importante ventaja evolutiva a la población bacteriana que lo recibe (Towsend y col., 2003; Orr, 2005).

Aunque las modificaciones que tienen lugar en los genomas de especies del género *Streptomyces* por procesos de transferencia horizontal de genes son más drásticos, debido a los grandes fragmentos de DNA exógeno introducido y el consecuente cambio fenotípico a nivel metabólico (en el caso de incorporar una

4. Discusión

agrupación biosintética), las mutaciones puntuales pueden implicar importantes diferencias en el proceso evolutivo, como veremos más adelante.

Producción de naringenina en S. clavuligerus: mutación y divergencia en la función génica

En el **Capítulo IV de Resultados** estudiamos la producción de naringenina por *S. clavuligerus*; este es un metabolito de naturaleza flavonoide típicamente producido por plantas. La localización en el genoma y el análisis funcional de los genes implicados en su biosíntesis (*ncs*, *ncyP* y *tal*) revelan cómo se producen fenómenos de reordenación de genes y cómo mutaciones en la secuencia de algunos genes provoca cambios metabolómicos entre las diferentes especies de *Streptomyces*.

Como se ha indicado en el apartado de resultados, en *S. clavuligerus* los genes implicados en la biosíntesis de naringenina *ncs* (policétido sintasa tipo III) y *ncyP* (citocromo P₄₅₀) se localizan contiguos en el brazo derecho del cromosoma. Ambos genes aparecen conservados en diferentes especies del género, si bien ninguna otra especie ha sido descrita como productora de este flavonoide (**Figura 4.1B**). La ubicación relativa de un gen respecto al otro es diferente en cada especie, bien debido a reordenamientos en el proceso de especiación a partir del ancestro común o por reordenamientos producidos durante la transferencia horizontal génica. Dado que se trata de genes típicos del metabolismo secundario y se localizan en los extremos de los cromosomas de todas las especies, la segunda hipótesis parece tener mayor consistencia.

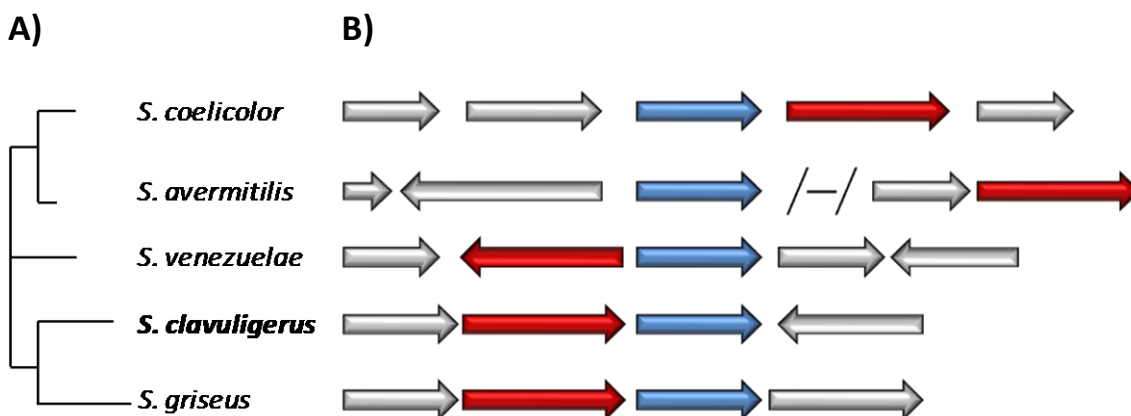


Figura 4.1. Organización genómica de los genes *ncs* y *ncyP* en *S. clavuligerus* y sus ortólogos en otras especies del género. A) Árbol filogenético en base a la secuencia de aminoácidos de la policétido sintasa tipo III. B) Organización genómica de los genes que codifican la policétido sintasa tipo III (flecha azul), el citocromo P₄₅₀ (flecha roja) y su entorno génico (flechas grises).

Cada una de las especies que contienen ambos genes han evolucionado de forma divergente, probablemente en base a pequeñas mutaciones en su secuencia, pero lo suficientemente relevantes como para que originen productos diferentes. Así, en *S. coelicolor* y *S. griseus*, no descritos como productores de naringenina, la policétido sintasa tipo III (RppA) y el citocromo P₄₅₀ (RppB) están implicados en la producción del pigmento 1,3,6,8 tetrahydroxynaphtalene (THN) (Funa et al., 2005). Aunque muy similares entre sí, las diferencias en la secuencia de aminoácidos entre RppA y Ncs conllevan un cambio en el mecanismo de ciclación del policétido debido a diferencias en el tamaño, polaridad y otros parámetros físico-químicos de la cavidad del centro activo de la PKS tipo III. Esto provoca diferencias en el empleo de una unidad iniciadora u otra y por ende, la obtención de metabolitos diferentes. En el caso de RppA la unidad iniciadora es malonyl-CoA, mientras que Ncs emplea como unidad iniciadora p-coumaroil-CoA.

Estudios de mutagénesis dirigida, han permitido determinar que la tirosina en la posición 224 (Y²²⁴) de la secuencia de estas PKSs es el residuo que marca el empleo del malonyl-CoA como unidad iniciadora. La Ncs de *S. clavuligerus* posee conservada esta Y²²⁴, lo cual no parece suponer un problema para que utilice el p-coumaroil-CoA como unidad iniciadora (*ver Discusión del Capítulo IV de resultados*) (Li et al., 2007).

Dada la aparente plasticidad en el empleo de una unidad iniciadora u otra por estas PKSs, parece indicar que la capacidad para producir un metabolito u otro depende en gran medida de la disponibilidad o capacidad de biosíntesis de la unidad iniciadora por parte del microorganismo productor. La presencia en *S. clavuligerus* del gen *tal* que codifica una tirosina amonio liasa que cataliza la transformación de tirosina a p-cumárico, ausente en otras especies del género, le confiere la exclusividad en la capacidad de producir naringenina.

La producción de naringenina por un procarionta resulta ser de gran interés industrial, dada la facilidad relativa de producción de metabolitos secundarios en procesos fermentativos a diferencia de los laboriosos y costosos métodos de extracción a partir de tejidos vegetales. La producción de naringenina ha sido referida empleando el hongo *Aspergillus niger* IB-56, que cataliza la bioconversión de naringina a naringenina (Rubio y col., 2011), y en *E. coli* (Wu y col., 2014) en el que se han clonado todos los genes de biosíntesis si bien con baja eficiencia en la producción. Sin embargo, nunca había sido descrita la producción de este metabolito en bacterias sin el empleo de intermediarios estructurales.

BIBLIOGRAFÍA

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.

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(1): 15-22.

de la Fuente JL, Rumbero A, Martín JF, Paloma Liras. (1997). Delta-1-piperideine-6-carboxylate dehydrogenase, a new enzyme that forms alpha-amino adipate in *Streptomyces clavuligerus* and other cephamycin C-producing actinomycetes. *Biochem J.* 327: 59-64.

Didelot, X., and Maiden, M. C. (2010). Impact of recombination on bacterial evolution. *Trends Microbiol.* 18: 315-322.

Eisen, J. (2000). Horizontal gene transfer among microbial genomes: new insights from complete genome analysis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10: 606-611.

Fuente A, Lorenzana LM, Martin JF, Liras P. (2002). Mutants of *Streptomyces clavuligerus* with disruptions in different genes for clavulanic acid biosynthesis produce large amounts of holomycin: possible cross-regulation of two unrelated secondary metabolic pathways. *J Bacteriol.* 184: 6559-6565.

Higgins CE, Kastner RE. (1971). *Streptomyces clavuligerus* sp. nov., a beta-lactam antibiotic producer. *Int J Syst Bacteriol* 21(4): 326-331.

Hsu CC, Chen CW. (2010). Linear plasmid SLP2 is maintained by partitioning, intrahyphal spread, and conjugal transfer in *Streptomyces*. *J Bacteriol.* 192(1): 307-15.

Kinashi H. (2011). Giant linear plasmids in *Streptomyces*: a treasure trove of antibiotic biosynthetic clusters. *J Antibiot (Tokyo).* 64(1): 19-25.

Liras P, Demain AL. (2009). Chapter 16. Enzymology of β -lactam compounds with cephem structure produced by actinomycete. *Methods Enzymol.* 458: 401-429.

Liras P, Gómez-Escribano JP, Santamarta I. (2008). Regulatory mechanisms controlling antibiotic production in *Streptomyces clavuligerus*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 3(5): 667-676.

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(Pt 8): 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 β -lactamase inhibitor. *J Bacteriol*. 186: 3431-3438.

Martín JF, Liras P. (2014). Novel antimicrobial and other bioactive metabolites obtained from silent gene clusters. In *Antibiotics Current Innovations and Future Trends*. Sanchez, S. and Demain, A.L. (eds). Caister Academic Press, pp. 275-292.

Medema MH, Trefzer A, Kovalchuk A, van den Berg M, Muller U, Heijne W y col. (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.

Nakamura, Y., Itoh, T., Matsuda, H., and Gojobori, T. (2004). Biased biological functions of horizontally transferred genes in prokaryotic genomes. *Nat. Genet*. 36: 760-766.

Orr, H. A. (2005). The genetic theory of adaptation. *Nat. Genet*. 6: 119-127.

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.

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 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(3): 633-45.

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(4): 968-981.

4. *Discusión*

Townsend, J. P., Nielsen, K. M., Fisher, D. S., and Hartl, D. L. (2003). Horizontal acquisition of divergent chromosomal DNA: consequences of mutator phenotypes. *Genetics*. 164: 13-21.

Wu J, Zho T, Du G, Zhou J, Chen J. (2014). Modular Optimization of Heterologous Pathways for De Novo Synthesis of (2S)-Naringenin in *Escherichia coli*. *PlosOne*. 9: e101492.

5. Conclusiones

1. El análisis transcriptómico de cultivos de la cepa *S. clavuligerus* $\Delta ccaR::tsr$ crecidos en medio SA muestra un descenso de expresión en los genes de biosíntesis de cefamicina C y ácido clavulánico y un aumento de expresión en los genes de biosíntesis de holomicina, respecto de los observados en la cepa control, lo que concuerda con los niveles de producción de dichos antibióticos por ambas cepas.
2. La ausencia del regulador CcaR afecta negativamente la expresión de los genes para el metabolismo del nitrógeno (*amtB*, *glnB*, *gln1*, *gln2* y *gln3*) y de los genes de biosíntesis de arginina, lo que se interpreta como una adaptación a la menor demanda de estos compuestos que son necesarios para la producción de cefamicina C y ácido clavulánico.
3. La cepa con fenotipo “bald” *S. clavuligerus* *oppA2::aph*, superproductora de holomicina, no productora de ácido clavulánico, presenta un número de copias de los plásmidos pSCL1, pSCL2 y pSCL4 10^4 veces inferior al de *S. clavuligerus* ATCC 27064 redenominándose dicha cepa *S. clavuligerus oppA2::aph* pSCL^{Low}.
4. El megaplásmido pSCL4 de 1.8 Mb es dispensable. La ausencia de pSCL4 en la cepa *S. clavuligerus* pSCL4⁻, impide la esporulación y contribuye a la superproducción de holomicina.
5. La ausencia de la oligopéptido permeasa OppA2 en el mutante *S. clavuligerus* $\Delta oppA2::acc$ pSCL⁺, que posee niveles normales de todos los plásmidos, origina la pérdida de la producción de ácido clavulánico y el aumento de la producción de holomicina, pero no afecta la esporulación.
6. El análisis bioinformático del genoma de *Streptomyces flavogriseus* ATCC 33331 muestra la presencia de una agrupación génica para ácido clavulánico reorganizada respecto a la de *S. clavuligerus*.
7. Se ha detectado mediante RT-PCR la expresión de los genes para los reguladores específicos de la producción de clavulánico (*ccaR*, *claR*) y de algunos genes biosintéticos; sin embargo, la agrupación es silenciosa probablemente debido a la ausencia de transcripción de otros genes esenciales (*cyp*, *orf12*, *orf13*, *orf14* y *oppA2*).
8. La expresión heteróloga del gen funcional *ccaR_C* de *S. clavuligerus* no es suficiente para producir clavulánico en *S. flavogriseus*. La introducción en esta cepa de la agrupación completa de ácido clavulánico de *S. clavuligerus* conduce a la producción de bajos niveles de ácido clavulánico por *S. flavogriseus*::[SCos-

5. Conclusiones

CA], probablemente por aumentar el nivel de las proteínas cuyos genes (*cyp*, *orf12*, *orf13*, *orf14* y *oppA2*) se expresan pobremente en *S. flavogriseus*.

9. Los cultivos de *S.clavuligerus* ATCC 27064 crecido en medio TSB contienen naringenina, como se demuestra mediante espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear, siendo esta la primera vez que se describe la producción de este compuesto por un cultivo microbiano.
10. El análisis bioinformático del genoma de *S. clavuligerus* ha permitido detectar los genes contiguos *ncs*, que codifica una chalcona sintasa, y *ncyP*, que codifica un citocromo P₄₅₀. La delección de cada uno de estos genes conduce a niveles de producción de naringenina de entre el 2 y el 10 % respecto de los producidos por la cepa parental.
11. La adición de tirosina o fenilalanina al medio de cultivo TSB triplica la producción de naringenina, probablemente por aumentar el nivel intracelular de ácido p-cumárico, un precursor de la naringenina. El análisis bioinformático del genoma de *S. clavuligerus* ha permitido detectar el gen *tal* (SCLAV_5457) que codifica una tirosina/fenilalanina amonio liasa, cuya delección da lugar a niveles de producción del 8% respecto a los de la cepa control, lo que muestra que es esencial para la producción de naringenina.

6. *Anexos*

Table 3.1.1. *S. clavuligerus* Δ ccaR::tsr gene expression as compared to *S. clavuligerus* ATCC 27064

CODE	GENE	PRODUCT	EXPONENTIAL PHASE		STATIONARY PHASE		
			Mc	FDR	Mc	FDR	
<i>Clavulanic acid Biosynthesis</i>							
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>	Penicilin binding protein	-0,49	7,48E ⁻⁰⁴	-0,58	2,02E ⁻⁰⁵	
SCLAV_4179	<i>orf19</i>	Penicilin 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 amidinohidrolase 2	-6,66	<1E ⁻⁰⁶	-6,01	<1E ⁻⁰⁶	
<i>Cephamicin C Biosynthesis</i>							
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	

CODE	GENE	PRODUCT	EXPONENTIAL PHASE		STATIONARY PHASE	
			Mc	FDR	Mc	FDR
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 prot	-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>	Cepahalosporin 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>	Piperideine 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>	Penicilin binding protein	-0,51	2,25E ⁻⁰³	-0,63	4,27E ⁻⁰⁵
Proteins BLIP						
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 prot	-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>	Proclavaminat amidinohidrolase 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>	Clavaminic 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
<i>Holomycin Biosynthesis</i>						
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 sp.</i> 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
<i>Arginine Biosynthesis</i>						
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
<i>Drugs Resistance</i>						
SCLAV_0793	<i>epeA</i>	Transmembrane-transport protein	-0,19	8,42E ⁻⁰¹	-1,59	2,42E ⁻⁰³

CODE	GENE	PRODUCT	EXPONENTIAL PHASE		STATIONARY PHASE	
			Mc	FDR	Mc	FDR
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		Mono-phosphatase	-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>gylR</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	gap2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2	-2,61	$<1E^{-06}$	-1,75	$<1E^{-06}$
SCLAV_4529	glcP	Glucose permease	1,79	$<1E^{-06}$	-0,60	$7,97E^{-02}$
SCLAV_p0975		Ribulose-phosphate 3-epimerase	-1,25	$<1E^{-06}$	-1,36	$<1E^{-06}$
<i>Nitrogen Metabolism</i>						
SCLAV_4534	amtB	Ammonium transporter	-4,10	$<1E^{-06}$	-5,04	$<1E^{-06}$
SCLAV_4535	glnB	Putative nitrogen regulatory protein P-II	-4,39	$<1E^{-06}$	-5,09	$<1E^{-06}$
SCLAV_p1452	glnIII	Glutamine synthetase III	-0,60	$3,33E^{-02}$	-1,54	$<1E^{-06}$
SCLAV_1431	glnA3	Glutamine synthetase (Glutamate-ammonia ligase)	-4,67	$<1E^{-06}$	-5,32	$<1E^{-06}$
SCLAV_1416	glnA2	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	gluD1	Glutamate transporter permease	-0,84	$1,62E^{-02}$	-1,28	$4,14E^{-05}$
SCLAV_0834	glnA1	Putative glutamine synthetase	-1,77	$<1E^{-06}$	-2,41	$<1E^{-06}$
<i>Phosphate Metabolism</i>						
SCLAV_1719	phoH	Phosphate starvation-induced protein	1,25	$1,37E^{-04}$	-0,06	$8,67E^{-01}$
SCLAV_3166	pstB	PstB protein - Phosphate import ATP-binding	-0,93	$1,41E^{-02}$	-1,50	$1,14E^{-05}$
SCLAV_3167	pstA	PstA protein - Permease component	-1,12	$4,84E^{-05}$	-1,61	$<1E^{-06}$
SCLAV_3168	pstC	PstC protein - Permease component	-1,11	$2,41E^{-02}$	-1,77	$4,12E^{-05}$
SCLAV_3169	pstS	PstS protein precursor- Periplasmic component	-0,93	$3,10E^{-02}$	-1,41	$1,66E^{-04}$
SCLAV_3220	phoU	Putative phosphate transport system regulatory protein	-1,01	$3,52E^{-04}$	-1,23	$<1E^{-06}$
<i>Lipid Metabolism</i>						
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	$<1E^{-06}$
<i>Transcriptional and Regulatory Proteins</i>						
SCLAV_p0826		Putative AraC-family transcriptional regulator	0,88	$2,87E^{-05}$	-0,05	$8,17E^{-01}$

CODE	GENE	PRODUCT	EXPONENTIAL PHASE		STATIONARY PHASE	
			Mc	FDR	Mc	FDR
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
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	YD repeat protein	-1,01	<1E ⁻⁰⁶	-1,77	<1E ⁻⁰⁶
<i>pSCL2 Plasmid</i>					
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

CODE	PRODUCT	EXPONENTIAL PHASE		STATIONARY PHASE	
		Mc	FDR	Mc	FDR
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
<i>pSCL1 Plasmid</i>					
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

Table 3.1.S1. Expression of *S. clavuligerus* genes as detected by hybridization in microarrays with *S. coelicolor* probes

CODE	ORTHOLOG	GENE	PRODUCT	EXPONENTIAL PHASE		STATIONARY PHASE		
				Mc	FDR	Mc	FDR	
Energy								
SCO5106	SCLAV_3969	dhsB2*	Putative succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit	-1,60	5,81E ⁻⁰³	-1,34	3,10E ⁻⁰³	
SCO5107	SCLAV_3970	dhsA2*	Putative succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	-1,19	3,60E ⁻⁰²	0,00	9,93E ⁻⁰¹	
SCO4566	SCLAV_3568	nuoE	NuoE, NADH dehydrogenase subunit E	-1,10	3,99E ⁻⁰²	-1,06	4,50E ⁻⁰³	
SCO4567	SCLAV_3569	nuoF	NuoF, NADH dehydrogenase subunit F	-1,14	4,13E ⁻⁰²	-0,32	3,43E ⁻⁰¹	
SCO4571	SCLAV_3571	nuoJ	NuoJ, NADH dehydrogenase subunit J	-1,10	2,87E ⁻⁰²	-0,51	1,07E ⁻⁰¹	
SCO4572	SCLAV_3574	nuoK	NuoK, NADH dehydrogenase subunit K	-1,27	8,21E ⁻⁰³	-0,17	6,06E ⁻⁰¹	
SCO4573	SCLAV_3575	nuoL	NuoL, NADH dehydrogenase subunit L	-1,09	4,93E ⁻⁰²	-0,15	6,59E ⁻⁰¹	
SCO4574	SCLAV_3576	nuoM	NuoM, NADH dehydrogenase subunit M	-1,14	1,28E ⁻⁰²	-0,55	7,32E ⁻⁰²	
SCO4575	SCLAV_3577	nuoN	NuoN, NADH dehydrogenase subunit N	-1,14	6,13E ⁻⁰³	-0,10	7,35E ⁻⁰¹	
Carbon Metabolism								
SCO4380	SCLAV_3405		Putative acetyl/propionyl CoA carboxylase, beta subunit	-1,54	2,36E ⁻⁰⁴	-2,16	<1E ⁻⁰⁶	
SCO7040	SCLAV_5509	gap2*	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-2,12	<1E ⁻⁰⁶	-1,44	2,22E ⁻⁰⁵	
SCO6497	SCLAV_5490	tktA2	Transketolase A	2,58	7,76E ⁻⁰⁴	3,18	<1E ⁻⁰⁶	
Nitrogen Metabolism								
SCO1613	SCLAV_0834		Putative glutamine synthetase	-1,56	1,28E ⁻⁰²	-1,61	9,83E ⁻⁰⁴	
SCO2198	SCLAV_1416	glnA	Glutamine synthetase I	-3,67	1,52E ⁻⁰⁵	-3,18	3,02E ⁻⁰⁵	
SCO2210	SCLAV_1431	glnII	Glutamine synthetase	-5,01	4,01E ⁻⁰⁴	-5,11	4,66E ⁻⁰⁵	
SCO5525	SCLAV_4473	ureAB	Fusion of urease beta and gamma subunits	-1,47	3,47E ⁻⁰⁵	-1,12	2,02E ⁻⁰⁴	
SCO6247	SCLAV_5009		Putative allantoinase	2,59	6,27E ⁻⁰⁵	1,85	6,12E ⁻⁰⁴	
Transport Protein								
SCO0742	SCLAV_1387		ABC transporter, putative ABC transporter	-1,06	2,71E ⁻⁰²	-0,02	9,60E ⁻⁰¹	

CODE	ORTHOLOG	GENE	PRODUCT	EXPONENTIAL PHASE		STATIONARY PHASE	
				Mc	FDR	Mc	FDR
SCO1900	SCLAV_1521		Putative integral membrane sugar transport protein	-1,20	2,91E ⁻⁰³	-0,90	4,84E ⁻⁰³
SCO2463	SCLAV_1669		Putative ABC transporter	1,21	1,99E ⁻⁰²	1,32	7,85E ⁻⁰⁴
SCO2631	SCLAV_1802		Putative amino acid permease	-1,83	1,89E ⁻⁰⁴	-2,08	<1E ⁻⁰⁶
SCO4148	SCLAV_1662		Putative ABC transport system ATP-binding protein	2,00	8,19E ⁻⁰³	2,20	2,89E ⁻⁰⁴
SCO4964	SCLAV_3858		Putative integral membrane transport protein	1,68	6,98E ⁻⁰⁴	1,42	6,06E ⁻⁰⁴
SCO5400	SCLAV_4310		Putative transport system kinase	1,30	7,39E ⁻⁰⁴	0,59	3,80E ⁻⁰²
SCO6054	SCLAV_p0702		Putative transmembrane transport protein	-1,11	4,57E ⁻⁰³	-1,09	5,69E ⁻⁰⁴
SCO6512	SCLAV_3668		ABC transporter ATP-binding protein	2,29	<1E ⁻⁰⁶	2,57	<1E ⁻⁰⁶
Membrane Protein							
SCO0384	SCLAV_5647		Putative membrane protein	1,25	3,18E ⁻⁰²	1,42	8,15E ⁻⁰⁴
SCO0390	SCLAV_5652		Putative membrane protein	2,40	1,52E ⁻⁰⁵	0,68	8,66E ⁻⁰²
SCO0399	SCLAV_5661		Putative membrane protein	2,52	<1E ⁻⁰⁶	1,53	9,61E ⁻⁰⁴
SCO5108	SCLAV_3971		putative integral membrane protein	-2,07	2,24E ⁻⁰³	-0,59	2,08E ⁻⁰¹
SCO5123	SCLAV_3987		Putative small membrane protein	-1,16	1,74E ⁻⁰²	-1,82	1,13E ⁻⁰⁵
SCO6427	SCLAV_1492		Putative integral membrane transport protein	1,80	7,39E ⁻⁰⁴	1,83	9,07E ⁻⁰⁵
Secreted Protein							
SCO0677	SCLAV_4996	<i>csn</i>	Secreted chitosanase	1,66	7,58E ⁻⁰³	1,64	8,55E ⁻⁰⁴
SCO7432	SCLAV_4112	<i>mprA2</i>	Secreted extracellular small neutral protease.	-1,98	1,16E ⁻⁰²	-2,32	2,06E ⁻⁰⁴
SCO7532	SCLAV_5381		Putative secreted protein.	1,95	6,12E ⁻⁰⁴	1,26	5,93E ⁻⁰³
Stress							
SCO4325	SCLAV_3305	<i>cspB</i>	Cold shock protein B	-1,14	4,15E ⁻⁰³	-1,49	2,21E ⁻⁰⁵
SCO5032	SCLAV_3935	<i>ahpC</i>	Alkyl hydroperoxide reductase	1,87	2,97E ⁻⁰³	1,86	3,46E ⁻⁰⁴
Translation							
SCO3961	SCLAV_2841	<i>serS</i>	Seryl-tRNA synthase	1,24	2,63E ⁻⁰²	0,20	5,61E ⁻⁰¹

SCO5708	SCLAV_4604		Putative ribosome-binding factor	1,02	4,93E ⁻⁰²	-0,16	6,13E ⁻⁰¹
SCO5709	SCLAV_4605		Probable tRNA pseudouridine synthase	1,28	9,16E ⁻⁰³	-0,22	5,10E ⁻⁰¹
SCO5699	SCLAV_4595	proS	Prolyl tRNA synthetase	1,14	4,93E ⁻⁰²	0,08	8,35E ⁻⁰¹
Transcriptional Regulator							
SCO1200	SCLAV_2714		Putative regulatory protein	1,18	1,85E ⁻⁰³	0,71	1,51E ⁻⁰²
SCO2508	SCLAV_1702	zur	Putative metal uptake regulation protein	-1,41	5,73E ⁻⁰⁵	-0,99	6,89E ⁻⁰⁴
SCO2792	SCLAV_1957	adpA	AraC-family transcriptional regulator (ArpA target)	-1,14	4,67E ⁻⁰²	-1,25	1,77E ⁻⁰³
SCO5351	SCLAV_4247		Putative regulatory protein	1,06	4,93E ⁻⁰²	0,48	1,39E ⁻⁰¹
SCO6770	SCLAV_5241		Putative DNA-binding protein	-1,14	1,19E ⁻⁰²	-1,38	1,54E ⁻⁰⁴
SCO7533	SCLAV_5379		Two-component system response regulator	1,20	1,79E ⁻⁰²	-0,34	2,99E ⁻⁰¹
Unknown Function							
SCO0382	SCLAV_5645		UDP-glucose/GDP-mannose family dehydrogenase	3,36	<1E ⁻⁰⁶	1,80	1,93E ⁻⁰⁴
SCO1612	SCLAV_0833		Putative aldehyde dehydrogenase	-1,67	6,46E ⁻⁰⁴	-2,64	<1E ⁻⁰⁶
SCO1611	SCLAV_0832		Putative dehydrogenase	-1,90	1,85E ⁻⁰³	-2,12	5,98E ⁻⁰⁵
SCO1761	SCLAV_0974		Putative cyclohexadienyl dehydrogenase	1,29	3,63E ⁻⁰²	1,86	7,39E ⁻⁰⁵
SCO0392	SCLAV_5654		Putative methyltransferase	2,56	1,49E ⁻⁰⁷	1,65	5,03E ⁻⁰⁵
SCO0393	SCLAV_5655		Putative transferase	2,28	4,20E ⁻⁰⁶	0,89	1,81E ⁻⁰²
SCO0398	SCLAV_5660		Putative glycosyl transferase	2,14	4,46E ⁻⁰⁴	2,94	1,11E ⁻⁰⁶
SCO0401	SCLAV_5663		Putative aminotransferase	2,63	2,36E ⁻⁰⁸	1,63	1,81E ⁻⁰⁵
SCO1250	SCLAV_0535		Putative acetyltransferase	1,71	9,55E ⁻⁰⁵	0,26	3,93E ⁻⁰¹
SCO7447	SCLAV_p0264		Putative acetyltransferase.	1,61	6,12E ⁻⁰⁴	1,17	2,26E ⁻⁰³
SCO0383	SCLAV_5646		Hypothetical protein SCF62.09	3,18	1,71E ⁻⁰⁷	1,32	5,28E ⁻⁰³
SCO0387	SCLAV_5650		Hypothetical bi-domain oxidoreductase	1,96	6,81E ⁻⁰⁴	1,05	1,89E ⁻⁰²
SCO0388	SCLAV_5651		Hypothetical protein SCF62.14	3,08	1,70E ⁻⁰⁷	1,78	1,98E ⁻⁰⁴
SCO0395	SCLAV_5657		Putative epimerase/dehydratase	2,38	3,88E ⁻⁰⁵	0,82	5,40E ⁻⁰²
SCO1695	SCLAV_0924		Hypothetical protein	-1,79	3,92E ⁻⁰³	-1,81	3,56E ⁻⁰⁴
SCO1726	SCLAV_0935		Putative ATPase	1,07	3,78E ⁻⁰²	0,86	1,48E ⁻⁰²

CODE	ORTHOLOG	GENE	PRODUCT	EXPONENTIAL PHASE		STATIONARY PHASE	
				Mc	FDR	Mc	FDR
SCO1898	SCLAV_1523		Putative substrate binding protein	-1,41	8,62E ⁻⁰⁴	-1,06	2,23E ⁻⁰³
SCO2397	SCLAV_1635		Putative oxidoreductase	1,12	3,66E ⁻⁰²	1,36	4,90E ⁻⁰⁴
SCO2460	SCLAV_2637		Conserved hypothetical protein SCC24.31c	1,75	2,75E ⁻⁰³	1,65	5,53E ⁻⁰⁴
SCO2547	SCLAV_1722		Putative hydrolase	-1,03	1,09E ⁻⁰²	-0,51	6,33E ⁻⁰²
SCO2966	SCLAV_2075	<i>smpB</i>	Small protein B homologue	1,15	6,21E ⁻⁰³	-0,78	1,46E ⁻⁰²
SCO2978	SCLAV_2084		Putative secreted protein	-1,16	1,82E ⁻⁰²	-2,19	1,11E ⁻⁰⁶
SCO3581	SCLAV_2575		Conserved hypothetical protein	1,46	1,85E ⁻⁰³	0,06	8,62E ⁻⁰¹
SCO3636	SCLAV_2638		Putative cytochrome P-450 hydroxylase	1,13	4,39E ⁻⁰³	0,73	1,57E ⁻⁰²
SCO5191	SCLAV_4055		Hypothetical protein 2SC3B6.15	2,87	5,28E ⁻⁰⁶	-0,05	9,21E ⁻⁰¹
SCO5285	SCLAV_4136	<i>lon</i>	ATP-dependent protease	1,16	1,28E ⁻⁰²	0,31	3,11E ⁻⁰¹
SCO5376	SCLAV_4288	<i>chiC</i>	Chitinase C (putative secreted protein)	-1,07	7,58E ⁻⁰³	-1,77	2,07E ⁻⁰⁶
SCO5796	SCLAV_4676		Conserved hypothetical protein SC4H2.17	1,74	2,06E ⁻⁰⁴	0,31	3,43E ⁻⁰¹

Table 3.1.S2. Oligonucleotides used in this work

Name	Sequence (5' to 3')	Product size (bp)	Annealing temperature (°C)
<i>QpcbC-D</i>	GACCGACCAGGAGAAGCAC		
<i>QpcbC-R</i>	CGGGTTGAGGTAACAGAAGG	127	62
<i>Qpcd-D</i>	CTGGGCGTGGTCGGTGT		
<i>Qpcd-R</i>	GCGGTCAGCGGGGTCAG	128	64
<i>Qblip-D</i>	GTCGTTCCGGGACAGCA		
<i>Qblip-R</i>	AACTTGCGGAGGGTGAG	162	64
<i>Qgap2-D</i>	ATCCTCAAGACCCACCGTTT		
<i>Qgap2-R</i>	GTGAACTCCTCCACCGTCAG	179	62
<i>QglnA2-D</i>	GGACGGGAGTAGGAGGAGTT		
<i>QglnA2-R</i>	AAACCACGGATGGACGAG	192	64
<i>QglnA1-D</i>	GACGGCTCCAGGGCAAG		
<i>QglnA1-R</i>	GACGGTGTTTCATCTCGGTGT	113	64
<i>QSclav_4359-D</i>	ACGCCTTCTGGACCGACA		
<i>QSclav_4359-R</i>	CCCCGCTGTAGATGAGACC	144	62
<i>QSclav_3668-D</i>	GAGCCCGACAACATCTGGA		
<i>QSclav_3668-R</i>	CGTGCGAGACGAAGAGGAC	91	64
<i>QmprA2-D</i>	CAGGCGGTTCGTCAAGTC		
<i>QmprA2-R</i>	CTATCTGGGTGCGGAAGGT	109	64
<i>QSCLAV_5661-D</i>	CGGCGAACTCTTCAAATGG		
<i>QSCLAV_5661-R</i>	GCGTGGGCGAGGATGAC	108	62
<i>QhlmA-D</i>	GGAGTTCATACGGGGTGAGG		
<i>QhlmA-R</i>	TACGGGCAGTGGAGCAGA	195	64
<i>Qhlml-D</i>	GCCGTCTCCATCGTCAAC		
<i>Qhlml-R</i>	AACCCGTGCGTCTCGTAGT	178	62
<i>QceaS2-D</i>	GCCGAGCGCCTGAACATCC		
<i>QceaS2-R</i>	GCGGTCCACCGGGCAACAT	153	60
<i>QclaR-D</i>	CGGGCGGCGGTTCTT		
<i>QclaR-R</i>	TCGTCGAGCAGGGGTCC	123	60
<i>QhrdB-D</i>	CGCGGCATGCTCTTCCT		
<i>QhrdB-R</i>	AGGTGGCGTACGTGGAGAAC	109	60
<i>argR-lux_D</i>	CGCGGATCCATCTCGGAGCATCTGAC		
<i>argR-lux_R</i>	CTGCATATGAGACAGCGACGTCTCATT	147	60 to 55
<i>phoH-lux_D</i>	CGCGGATCCCGCGCTGCGCCGCTACGCCTT		
<i>phoH-lux_R</i>	GCGCATATGTCCCGTTGCAGGGTTCTCG	277	60 to 55
<i>amtB_lux_D</i>	CGCGGATCCCTTCGTCACCCCCGTGAA		
<i>amtB_lux_R</i>	GAGCATATGCGACTCCTCGTCGTCGGTGCG	146	60 to 55
<i>Sc_p1123_lux_D</i>	CGCGGATCCTGGCCACGTCGGGGACG		
<i>Sc_p1123_lux_R</i>	CCGCATATGCGGAACGAGGCGGCACCAC	244	60 to 55

Table 3.2.2. Expression of genes located in pSCL2 in mutants *S. clavuligerus oppA2::aph* pSCL^{Low} and *S. clavuligerus ΔccaR* in relation to the control strain.

GENE	PRODUCT	EXPONENTIAL PHASE				STATIONARY PHASE			
		<i>S.clavuligerus oppA2::aph</i>		<i>S.clavuligerus ΔccaR</i>		<i>S.clavuligerus oppA2::aph</i>		<i>S.clavuligerus ΔccaR</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
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

Table 3.2.3. Expression of genes located in pSCL4 in *S. clavuligerus oppA2::aph* pSCL^{Low} and *S. clavuligerus ΔccaR* in relation to the wild type strain.

GENE	PRODUCT	EXPONENTIAL PHASE				STATIONARY PHASE			
		<i>S. clavuligerus oppA2::aph</i>		<i>S. clavuligerus ΔccaR</i>		<i>S. clavuligerus oppA2::aph</i>		<i>S. clavuligerus ΔccaR</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 (Putative regulatory 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 family protein	-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 dehydrogenase	-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

(DevB. Pgl)									
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 - Rhodococcus ruber	-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 staurosporina	-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. LuxR:TPR repeat	-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/pfpl 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 (EC 6.3.1.2)	-3.39	3.70E ⁻²⁸	-0.60	3.33E ⁻⁰²	-4.50	2.24E ⁻³⁸	-1.54	1.60E ⁻⁰⁹
SCLAV_p1461	Response regulator receiver: Transcriptional regulatory protein. C terminal	-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 foyl/polyglutamate 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

Table 3.2.S3. Oligonucleotides used in this work

Oligonucleotide	Secuence (5' → 3')	Description
pSCL4_0032_D	GTTCTCCACCCGCCATC	Forward for <i>SCLAV_p0032</i> PCR and RT-PCR
pSCL4_0032_R	GTACCGACAGCAGTGCGAAG	Reverse for <i>SCLAV_p0032</i> PCR and RT-PCR
pSCL4_0126_D	GGGAGGAGCCTTTGTGC	Forward for <i>SCLAV_p0126</i> PCR and RT-PCR
pSCL4_0126_R	TCTCCGAAGATCTCGTCCAC	Reverse for <i>SCLAV_p0126</i> PCR and RT-PCR
pSCL4_0353_D	GCCAGTACGACACCACACC	Forward for <i>SCLAV_p0353</i> PCR and RT-PCR
pSCL4_0353_R	GTCGGTGTACGACAGGAAGG	Reverse for <i>SCLAV_p0353</i> PCR and RT-PCR
pSCL4_0528_D	GACGGGGTGGAGCAGAC	Forward for <i>SCLAV_p0528</i> PCR and RT-PCR
pSCL4_0528_R	CATGACCGGCGACGATAC	Reverse for <i>SCLAV_p0528</i> PCR and RT-PCR
pSCL4_0713_D	GGCTGATGTCCCTGATGAC	Forward for <i>SCLAV_p0713</i> PCR and RT-PCR
pSCL4_0713_R	ATGGCCTCGTGATTGCTG	Reverse for <i>SCLAV_p0713</i> PCR and RT-PCR
pSCL4_0828_D	ACCCTGTCCGGCAGAAC	Forward for <i>SCLAV_p0828</i> PCR and RT-PCR
pSCL4_0828_R	GGAGGAGACATTGACGATCC	Reverse for <i>SCLAV_p0828</i> PCR and RT-PCR
pSCL4_1090_D	GACCATCAGGGAGCTGTACC	Forward for <i>SCLAV_p1090</i> PCR and RT-PCR
pSCL4_1090_R	GAAGCTGCGGGACTTGAC	Reverse for <i>SCLAV_p1090</i> PCR and RT-PCR
pSCL4_1250_D	CACCCCTTGCCCTTCC	Forward for <i>SCLAV_p1250</i> PCR and RT-PCR
pSCL4_1250_R	CAGCAGGTTCCGTTGGTC	Reverse for <i>SCLAV_p1250</i> PCR and RT-PCR
pSCL4_1328_D	GAAGCCTTCGCCTTCGTC	Forward for <i>SCLAV_p1328</i> PCR and RT-PCR
pSCL4_1328_R	CCTCGTCCCCTGTGGTG	Reverse for <i>SCLAV_p1328</i> PCR and RT-PCR
pSCL4_1452_D	CCACCGTGAACGGAACAG	Forward for <i>SCLAV_p1452</i> PCR and RT-PCR
pSCL4_1452_R	GCGTCCGGTGAACCTCG	Reverse for <i>SCLAV_p1452</i> PCR and RT-PCR
pSCL4_1539_D	CACAGACATCCTCGCAAAGG	Forward for <i>SCLAV_p1539</i> PCR and RT-PCR
pSCL4_1539_R	CTTCGATCTTGGCCTGAGTG	Reverse for <i>SCLAV_p1539</i> PCR and RT-PCR
QparA_D	GCCGAAATCCTTCACAGC	Forward for <i>parA</i> quantitative RT-PCR
QparA_R	AGTCCTCCTCGTCCAGCAT	Reverse for <i>parA</i> quantitative RT-PCR
Q-staD_D	GGACGGGAGCGGGAACG	Forward for <i>staD</i> quantitative RT-PCR
Q-staD_R	CGGGTCGCAGGGCAGAT	Reverse for <i>staD</i> quantitative RT-PCR

Q-traA_D	GACCCACCGAGACACC	Forward for <i>traA</i> quantitative RT-PCR
Q-traA_R	CGAGCAGGACGAAGACG	Reverse for <i>traA</i> quantitative RT-PCR
Q-parB_D	GACGGAGCAGCAGGAGAA	Forward for <i>parB</i> quantitative RT-PCR
Q-parB_R	AAGCGACTGGAGCGACTG	Reverse for <i>parB</i> quantitative RT-PCR
Q-hrdB_D	CGCGGCATGCTCTTCTT	Forward for <i>hrdB</i> quantitative RT-PCR
Q-hrdB_R	AGGTGGCGTACGTGGAGAAC	Reverse for <i>hrdB</i> quantitative RT-PCR
parAB_D	TCCAGCGAGGTCAGTAGTTG	Forward for <i>parAB</i> _{-pSCL4} PCR
parAB_R	GTTCTCATTTGTCGGCGTGT	Reverse for <i>parAB</i> _{-pSCL4} PCR
pSCL1q_27570_D	GACCAGGCGGACGACGAG	Forward for SclaA2_010100027570 quantitative RT-PCR
pSCL1q_27570_R	ACGCAGCAACAGCGACTT	Reverse for SclaA2_010100027570 quantitative RT-PCR
pSCL1q_27590_D	CCGAGAACCTGTGGGTGAT	Forward for SclaA2_010100027590 quantitative RT-PCR
pSCL1q_27590_R	GACAACCGCTCTTCTTCTCG	Reverse for SclaA2_010100027590 quantitative RT-PCR
pSCL2q_27690_D	TGCCGTCCCACAGTAGC	Forward for SclaA2_010100027690 quantitative RT-PCR
pSCL2q_27690_R	CACCACCGAACCGAAGAAT	Reverse for SclaA2_010100027690 quantitative RT-PCR
pSCL2q_27930_D	ACGAAGGTCCCCAGGTAGTC	Forward for SclaA2_010100027930 quantitative RT-PCR
pSCL2q_27930_R	GCGGCTCAGGAAGATGGA	Reverse for SclaA2_010100027930 quantitative RT-PCR
pSCL2q_28210_D	CGACCGCCTTCTTCTCTCC	Forward for SclaA2_010100028210 quantitative RT-PCR
pSCL2q_28210_R	GCTCCTGCCCCCTCTGAT	Reverse for SclaA2_010100028210 quantitative RT-PCR
parAB_D	TCCAGCGAGGTCAGTAGTTG	Forward for <i>parAB</i> _{-pSCL4} PCR
parAB_R	GTTCTCATTTGTCGGCGTGT	Reverse for <i>parAB</i> _{-pSCL4} PCR
parAB_RD.D	CTTCACATGATCTTGTGAGTTAGTAAGGTATC CCCCATGATTCCGGGGATCCGTCGACC	Forward for <i>parAB</i> _{-pSCL4} deletion
parAB_RD.R	ACGGCGTAATAAGGCGGTCCGGTCCGGGCG CTGCTACATTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Reverse for <i>parAB</i> _{-pSCL4} deletion
RDoppA2_D	CGGCACCACCGACACCGATCAGAAGAGG ACCGCACCATGATTCCGGGGATCCGTCGACC	Forward for <i>oppA2</i> deletion
RDoppA2_R	GGGTGGGCCGTCCCCCGCCGGGCCCGGT GATCCACCTATGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Reverse for <i>oppA2</i> deletion

Table 3.3.2. Comparative analysis of clavulanic acid biosynthesis genes in *S. clavuligerus* ATCC 27064, *S. flavogriseus* ATCC 33331 and *Sac. viridis* DSM 43017. 1) Number of amino acids in the protein. 2) Amino acids identity to the orthologous *S. clavuligerus* protein.

<i>S. clavuligerus</i> ATCC 27064	Gene	Product	Size (aa) ¹	<i>S. flavogriseus</i> ATCC 33331	Size (aa) ¹	Identity/ Similarity (%) ²	<i>Sac. viridis</i> DSM 43017	Size (aa) ¹	Identity/ Similarity (%) ²
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 amidinohydrolase 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>	Clavaldehyde 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	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	---	---	---

Table 3.3.S1. Oligonucleotides used in this work.

Name	Sequence 5' -> 3'	Amplified Fragment (bp)	Amplified Gene
RTfla_ceaS2_D	CCAACGACACGCACCACT	487	<i>ceaS2</i> (Sfla_0555)
RTfla_ceaS2_R	GCGGGGAAGGACAGGATG		
RTfla_claR_D	GGGACGAGAAGCTGGGTGTC	518	<i>claR</i> (Sfla_0548)
RTfla_claR_R	GTTGATGCTGCCGTGGTC		
RTfla_ccaR_D	CACCGCCCTCGCACTTGT	446	<i>ccaR</i> (Sfla_0552)
RTfla_ccaR_R	CCTCTCGTATTGACCCAGA		
RTfla_gcas_D	GCCGATTACGCACAGTTC	381	<i>gcas</i> (Sfla_0539)
RTfla_gcas_R	CAGGTGGTCCTTGATGTTGG		
RTfla_orf16_D	GCTGGGGGCGGAGGACTT	471	<i>orf16</i> (Sfla_0540)
RTfla_orf16_R	GAGGGGTGGTGGCGGTAG		
RTfla_orf14_D	ACGGAGAGCGCCGAGGAC	412	<i>orf14</i> (Sfla_0542)
RTfla_orf14_R	GGTCCAGGTCGAGCCACT		
RTfla_cyp_D	ATGACGCAGGACGCAGCA	500	<i>cyp</i> (Sfla_0546)
RTfla_cyp_R	GACACGCCGAAGAGCAGT		
RTfla_orf12_D	GAAGGTCGGTCTCCAAGG	551	<i>orf12</i> (Sfla_0553)
RTfla_orf12_R	GTAGTCCTGCTGCCTGCTGT		
RTfla_car_D	CGTCGCACTCGTCACAGG	304	<i>car</i> (Sfla_0547)
RTfla_car_R	GGTCCAGTCGGTGGTGTC		
RTfla_oppA1_D	GGTAGCCCCGACCGACGA	321	<i>oppA1</i> (Sfla_0549)
RTfla_oppA1_R	GTGCCGTAGTTGCTCCTG		
RTfla_oat2_D	GACACCCGCCCAAGGAG	320	<i>oat2</i> (Sfla_0554)
RTfla_oat2_R	GCGATGTTCTTCACCAAGG		
RTfla_cas2_D	GACGGCTACCTCTGCTG	481	<i>cas2</i> (Sfla_0558)
RTfla_cas2_R	GCTTACCTCGGCTATCG		
Sfla_hrdB_D	GAGGAAGAGGGTGTGACGCTGATGG	415	<i>hrdB</i> (Sfla_1538)
Sfla_hrdB_R	CGTCGTCCTCGTCCTCGTCGG		
ceaS2_qSFLA_D	CCAACGACACGCACCACT	163	<i>ceaS2</i> (Sfla_0555)
ceaS2_qSFLA_R	ACGGGGACGGAGATGAA		
bls2_qSFLA_D	CTCTCCTGGGCATCTACGAC	124	<i>bls2</i> (Sfla_0556)
bls2_qSFLA_R	GTGTAGAGCGGGACGGAAC		
pah2_qSFLA_D	CCGCTTCTGATGCTC	119	<i>pah2</i> (Sfla_0557)
pah2_qSFLA_R	GGGGTTGGTGTCGGAGT		
cas2_qSFLA_D	CGCCCCCTGCTGACCAT	178	<i>cas2</i> (Sfla_0558)
cas2_qSFLA_R	CCATCTCCGTGTGGAACCTC		
oat2_qSFLA_D	ATGGACCGCACCTCAAC	161	<i>oat2</i> (Sfla_0554)
oat2_qSFLA_R	TCGGAGGCGATGTTCTTC		
oppA1_qSFLA_D	GAGGGACATGGAGACCACTC	177	<i>oppA1</i> (Sfla_0549)
oppA1_qSFLA_R	CGGAGGAAGTTCCAGGTGTA		
cyp_qSFLA_D	GTGCGGTGCTCGGTGAC	113	<i>cyp</i> (Sfla_0546)
cyp_qSFLA_R	GATGAAGGAGGCGGTGTG		
car_qSFLA_D	CGACATCCTGGTCAACAACG	156	<i>car</i> (Sfla_0547)
car_qSFLA_R	ATCGTCCCCTGGTTCTCTG		
claR_qSFLA_D	ACCACTGATGGAGGATCTGG	101	<i>claR</i> (Sfla_0548)
claR_qSFLA_R	CGTCGAGCTGTCTGAGCAC		
orf12_qSFLA_D	GACCCTCTGCGACACGAC	129	<i>orf12</i> (Sfla_0553)
orf12_qSFLA_R	AACACCTCCACGCTGTATCC		

6. Anexos

orf13_qSFLA_D	CTGTGGATGGCGGTGGT	138	<i>orf13</i> (Sfla_0543)
orf13_qSFLA_R	GATGTAGACGAGTGCACGA		
orf14_qSFLA_D	CTCCGGCTGGTGCTTCC	91	<i>orf14</i> (Sfla_0542)
orf14_qSFLA_R	CGGTCCCTATGCCCTGAC		
oppA2_qSFLA_D	CTCCGGCTGGTGCTTCC	91	<i>oppA2</i> (Sfla_0541)
oppA2_qSFLA_R	CGGTCCCTATGCCCTGAC		
orf16_qSFLA_D	CGGTGGTTTCGAGCAGTT	157	<i>orf16</i> (Sfla_0541)
orf16_qSFLA_R	GAGGTTGGCGTCGAGTTCT		
gcas_qSFLA_D	AGGTGTGGCTGCTGACG	113	<i>gcas</i> (Sfla_0539)
gcas_qSFLA_R	GTCCAGTCCGGTGGTGTC		
ccaR_qSFLA_D	GGATGCCCTCGCCCTCTG	95	<i>ccaR</i> (Sfla_0552)
ccaR_qSFLA_R	CGACCCGCTCCTTTCCA		
ceaS2_qSCLAV_D	GCCGAGCGCCTGAACATCC	153	<i>ceaS2</i> (SCLAV_4197)
ceaS2_qSCLAV_R	GCGGTCCACCGGGGCAACAT		
bls2_qSCLAV_D	GAGCTCTACAACCGGGACGA	101	<i>bls2</i> (SCLAV_4196)
bls2_qSCLAV_R	TCGCTCATCGATCGCTCCT		
pah2_qSFLA_D	CCTACGACGGGGGGCACCAG	168	<i>pah2</i> (SCLAV_4195)
pah2_qSFLA_R	TCATGTGGAACGGCGTCAGATTG		
cas2_qSCLAV_D	GCAAGCGGCTGGTGATGG	143	<i>cas2</i> (SCLAV_4194)
cas2_qSCLAV_R	GGTCTCCGAGGACAGGTAGTGC		
oat2_qSCLAV_D	CACCGTCCTCGCCTCCAC	176	<i>oat2</i> (SCLAV_4193)
oat2_qSCLAV_R	CGTTCTCCTCGCCCTCCAG		
oppA1_qSCLAV_D	CAGGAGGTGGCGGAAGTAGG	126	<i>oppA1</i> (SCLAV_4192)
oppA1_qSCLAV_R	CGGAGGAAGTTCCAGGTGTA		
car_qSCLAV_D	GGTGTGATCATCCGGGTCCAGT	183	<i>car</i> (SCLAV_4190)
car_qSCLAV_R	ATCCGCTGCTCGTACATCTCCTT		
claR_qSCLAV_D	CGGGCGGCGGTTCTT	123	<i>claR</i> (SCLAV_4191)
claR_qSCLAV_R	TCGTGAGCAGGGGTTCC		
cyp_qSCLAV_D	ACGAACTCGACGGCTATCTG	132	<i>cyp</i> (SCLAV_4189)
cyp_qSCLAV_R	ACATCGGGACCATCTCCTC		
orf12_qSCLAV_D	GGCGATGGGGCTGCTGAC	160	<i>orf12</i> (SCLAV_4187)
orf12_qSCLAV_R	GTGCGCGACGGGGTGTA		
orf13_qSCLAV_D	CTGCGCTGGCTGCTGGTGTA	174	<i>orf13</i> (SCLAV_4186)
orf13_qSCLAV_R	CTGCCGCCGGGAGATGC		
orf14_qSCLAV_D	CGAACGACGACGAAACG	107	<i>orf14</i> (SCLAV_4785)
orf14_qSCLAV_R	CAGCGAGCCGACCATGT		
oppA2_qSCLAV_D	GCAAGCGGCTGGTGATGG	95	<i>oppA2</i> (SCLAV_4183)
oppA2_qSCLAV_R	GCAGTACGCGGCGGACAAGAT		
gcas_qSCLAV_D	GGACAACCTGGAGCCTGTGTA	100	<i>gcas</i> (SCLAV_4181)
gcas_qSCLAV_R	CCGCGAACTTGGCATAGTC		
orf16_qSFLA_D	GTCCTGTACTACCGGGTGCT	130	<i>orf16</i> (SCLAV_4182)
orf16_qSFLA_R	GCAGCAGGAACGAGTGCT		
ccaR_qSCLAV_D	TCGCGGACTCCATCGACCTTT	131	<i>ccaR</i> (SCLAV_4204)
ccaR_qSCLAV_R	GGCGGGCCCTTCCACAG		
hrdB_D	CGCGGCATGCTCTTCT	109	<i>hrdB</i>
hrdB_R	AGGTGGCGTACGTGGAGAAC		
Sfla_0552_D	ATCATACCATGGTCGGCGTGCAGATTCGTAT	854	<i>ccaR_F</i> (SFLA_0552)
Sfla_0552_R	AATGACAAGCTTCGTCCGCCCTGACACAC		
SCLAV_ccaR_D	ATCATACCATGGACACCTGGAATGATGT	783	<i>ccaR_C</i> (SCLAV_4204)
SCLAV_ccaR_R	AATGACAAGCTTTCAGGCCGGGTACCGAC CC		

<i>ceaS2_D</i>	TGGGGAAGGTGTTTGGGGTTGT	502	<i>ceaS2</i> (SCLAV_4197)
<i>ceaS2_R</i>	GGTTTCGCCGGGGTGTTCG		
<i>orf18-gcaS_D</i>	ACGAGCCCCGGGAGATGAGC	516	Intergenic region
<i>orf18-gcaS_R</i>	ACGCGGTGTGCATAGGCTGTG		

Table 3.4.S1. Oligonucleotides used in this work

Oligonucleotide	Sequence 5' to 3'	Description
<i>ncs_RD_F</i>	GTCAGAGGGGCCATCCTGCGCTAGAAGA AGACTCCCATGATTCCGGGGATCCGTCGA CC	Forward for <i>ncs</i> deletion
<i>ncs_RD_R</i>	TCGACAACGTCTTCGGCGCCTACTGACCG ACCGGGCTCATGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Reverse for <i>ncs</i> deletion
<i>ncyP_RD_F</i>	GCGCCCCGGGGCCGCCCGTTGCGCAGCA CGGATGAATGATTCCGGGGATCCGTCGAC C	Forward for <i>ncyP</i> deletion
<i>ncyP_RD_R</i>	GCGGGCACGGCGGGGCCCGGGCCCCGC C CGGCCGTCCTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Reverse for <i>ncyP</i> deletion
SCLAV_ <i>ncs_F</i>	TCTCCTATCTGACCGCCAAC	Forward for <i>ncs</i> PCR
SCLAV_ <i>ncs_R</i>	TCAACGACTGGGACATCAAC	Reverse for <i>ncs</i> PCR
SCLAV_ <i>ncyP_F</i>	CGTTGCGCAGCACGGATGAATGAGG	Forward for <i>ncyP</i> PCR
SCLAV_ <i>ncyP_R</i>	AGCGCACCGCGTAGGAGATCCACTC	Reverse for <i>ncyP</i> PCR
<i>ncs_CP_F</i>	CATGCCATGGCAGTACTGTGCAAAC	Forward for <i>ncs</i> complementation
<i>ncs_CP_R</i>	CCCAAGCTTCTACGGCTCCATCGACAAC	Reverse for <i>ncs</i> complementation
<i>ncyP_CP_F</i>	ATGAGGGGCGGCCATCCG	Forward for <i>ncyP</i> complementation
<i>ncyP_CP_R</i>	TCACCAGGTGACGGGCAG	Reverse for <i>ncyP</i> complementation
RT_ <i>ncs_F</i>	GAGAGACCCGTCATGTCCAC	Forward for <i>ncs</i> RT- PCR
RT_ <i>ncs_R</i>	AGGAGTCCTCCGCCATCC	Reverse for <i>ncs</i> RT- PCR
RT_ <i>ncyP_F</i>	AACGAGGAGACCCTCGAACT	Forward for <i>ncyP</i> RT- PCR
RT_ <i>ncyP_R</i>	CTGGTAGCACAGCGAACAGA	Reverse for <i>ncyP</i> RT- PCR
RT_ <i>91_92_F</i>	GCTCGCACAGGCCGAGATGGAGACCGCCT TCAGGACGCT	Forward for coexpression RT-PCR
RT_ <i>91_92_R</i>	TGCAGTCTCCGAGCCAGTTCGAGGG	Reverse for coexpression RT-PCR
<i>tal_RD_F</i>	CTAGCCTTGGCCGTCTCACGTCCGAGGTG ATGCGATATGATTCCGGGGATCCGTCGAC C	Forward for <i>tal</i> deletion
<i>tal_RD_R</i>	TTCCGCTGATGAACGCGACCTTGCCTTCGA GGCGACCGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Reverse for <i>tal</i> deletion
SCLAV_ <i>tal_F</i>	GTGCGGAGTGAGGGCTTC	Forward for <i>tal</i> PCR

6. Anexos

SCLAV_tal_R	AGCGTCTTGTCGGAGGTCT	Reverse for <i>tal</i> PCR
tal_CP_D	ATGTCTGCGATCGAAGTCGGC	Forward for <i>tal</i> complementation
tal_CP_R	TTGCCTTCGAGGCGACCG	Reverse for <i>tal</i> complementation
Q_tal_D	GGTGTGACGACGGGTTTC	Forward for <i>tal</i> quantitative RT-PCR
Q_tal_R	CGTTGAGGTGGTAGGTGATG	Reverse for <i>tal</i> quantitative RT-PCR
Q_ncyP_D	ACCGCGACCACAGCAC	Forward for <i>ncyP</i> quantitative RT-PCR
Q_ncyP_R	GCATAGTCGAAGGGGCAGTA	Reverse for <i>ncyP</i> quantitative RT-PCR
Q_ncs_D	TCCTGGCTCGTCAACACC	Forward for <i>ncs</i> quantitative RT-PCR
Q_ncs_R	GTAGGCGGTGCAGAAGTCAT	Reverse for <i>ncs</i> quantitative RT-PCR
Q-hrdB_D	CGCGGCATGCTCTTCCT	Forward for <i>hrdB</i> quantitative RT-PCR
Q-hrdB_R	AGGTGGCGTACGTGGAGAAC	Reverse for <i>ncs</i> quantitative RT-PCR
Q-hrdB_D	CGCGGCATGCTCTTCCT	Forward for <i>hrdB</i> quantitative RT-PCR
Q-hrdB_R	AGGTGGCGTACGTGGAGAAC	Reverse for <i>ncs</i> quantitative RT-PCR