

CLONACION Y EXPRESION DE UN FRAGMENTO DE ADN ACTIVADOR DE LA BIOSINTESIS DE ANTIBIOTICOS POLIQUETIDOS EN *Streptomyces lividans* Y *Streptomyces peucetius* VAR CAESIUS

Silvia Planas¹, Caridad Rodríguez¹, Carlos Vallín¹ y Francisco Malpartida².

¹Centro de Química Farmacéutica. Ave. 25 y 158 apartado 6880, Cubanacán. Playa. Ciudad Habana, Cuba.

²Centro de Investigaciones Biomédicas. CSIC. Arzobispo Morcillo 4 Madrid, España.

Recibido en noviembre de 1991. Aprobado en junio de 1993.

Key words: anthracyclines; antibiotic production, *Streptomyces peucetius* var caesius.

SUMMARY

We made a genomic library of the anthracyclines producer strain *Streptomyces peucetius* var caesius SQF-15 and we isolated a 6 kb DNA fragment which activates both, the actinorhodin antibiotic production in *Streptomyces lividans* TK-21 strain and the anthracyclines antibiotic production in the SQF-15 strain. The presence of this DNA fragment in the producer strain SQF-15 was confirmed. The chromosome mapping of this fragment was constructed through the digestion with several restriction enzymes. The quantification of anthracycline by HPLC in the culture broth shown an increase of the antibiotic production because of the presence of the cloned fragment.

RESUMEN

A partir de una genoteca de la cepa productora de antraciclina *Streptomyces peucetius* var caesius SQF-15, se aisló un fragmento de ADN de 6 kb activador de la producción del antibiótico actinorrodina en *Streptomyces lividans* Tk-21 y de antraciclina en la cepa SQF-15. Se confirmó la presencia de este fragmento en el ADN cromosómico de la cepa productora y se realizó el mapeo cromosómico del mismo, utilizando varias enzimas de restricción. La cuantificación de antraciclina por HPLC del caldo fermentado demostró un aumento de la producción del antibiótico en presencia del fragmento clonado.

INTRODUCCION

En los últimos años se han obtenido grandes avances en la aplicación de la metodología del ADN recombinante en el género *Streptomyces* con vistas al incremento de la producción de compuestos de interés industrial, como son los antibióticos, mediante la clonación de los genes que codifican para las enzimas claves de sus rutas biosintéticas en plasmidios multicopias o bajo el control de promotores eficientes. Se pueden originar incluso nuevos antibióticos híbridos por introducción de genes de distinto origen en una misma especie (Hopwood *et al.*, 1985).

Los poliquétidos son un gran grupo de compuestos con actividad antibiótica, producidos por actinomicetos, hongos y plantas superiores

que tienen en común estar formados por condensaciones sucesivas de unidades de pocos átomos de carbono (Packter, 1980).

La elevada homología que presentan las sintetasas de diferentes poliquétidos abre atractivas posibilidades de intercambio de subunidades procedentes de sistemas diferentes.

Dentro de la clasificación de los antibióticos poliquétidos se encuentra, el grupo de antibióticos de las antraciclina, como son la daunorrubicina y la doxorubicina, las cuales, a pesar de su alta toxicidad, son muy útiles en el tratamiento de algunos tipos de tumores y comercialmente son muy importantes debido a la mezcla de metabolitos que se obtienen de la cepa productora que encarecen el proceso de obtención del antibiótico (Grein, 1987).

En el presente trabajo se reporta la clonación de un fragmento de ADN cromosómico activador de la biosíntesis de antraciclina en la cepa productora *Streptomyces peucetius* var caesius SQF-15, y de actinorrodina en *S. lividans* TK-21.

MATERIALES Y METODOS

Cepas bacterianas y vectores

S. lividans TK-21, cepa hospedera (Hopwood *et al.*, 1983).

S. coelicolor JF-1, mutante regulador de actinorrodina. (Malpartida y Hopwood, 1986).

S. peucetius var caesius SQF-15, cepa productora de antraciclina (Colección UH).

S. peucetius var caesius SQF-127, cepa productora de antraciclina (Colección UH).

E. coli JM 101 [F' traD36 lacI^q (lacZ) M15 proAB/supE thi (lac-proAB)] (Yanish-Perron *et al.*, 1985).

pIJ680 y pIJ2921 (Hopwood *et al.*, 1985).

Medios de cultivo

Medio YEME, para la formación de protoplastos de *Streptomyces*. (Hopwood *et al.*, 1985).

Medio R5, para la regeneración de protoplastos de *Streptomyces*. (Hopwood *et al.*, 1985).

Medio LB, para el crecimiento de *E. coli* (Maniatis *et al.*, 1982).

Medio SY, para la producción de antraciclinas (Arcamone, 1984; Pandey y Toussaint, 1980).

Reactivos químicos, enzimas y suministradores

Tioestreptona (tsr) (S.J. Lucania Squibb Institute for Medical Research, Princeton NJ, USA). Enzimas de restricción y T4 ADN ligasa (Boehringer Mannheim, RFA) y Heber Biotec (CIGB, Apartado 6162, La Habana, Cuba) utilizadas según las condiciones recomendadas por la casa comercial, daunorrubicina y doxorubicina (Farmitalia Carlo Erba, Italia).

Transformación

Los protoplastos de *Streptomyces* fueron transformados siguiendo el método de Thompson *et al.* (1982). Para la cepa *E. coli* JM 101 se siguió el procedimiento del CaCl₂ de Lederberg y Cohen (1972). La detección de la actividad de la β -galactosidasa se llevó a cabo en placas de LBA conteniendo 40 μ g/ml X-gal. (BRL) y 11.9 μ g/ml de IPTG.

Purificación y manipulación *in vitro* del ADN

La preparación de ADN cromosómico y plasmídico de las cepas de *Streptomyces* y *E. coli* se llevó a cabo según los procedimientos publicados (Hopwood *et al.*, 1985).

Procedimiento de clonación

El ADN cromosómico de la cepa SQF-15 fue digerido parcialmente con Sau 3A y los fragmentos entre 8 y 18 kb fueron obtenidos mediante la técnica de fraccionamiento de ADN por centrifugación en gradiente de sacarosa (Hopwood *et al.*, 1985), 1 μ g del vector pIJ 680 totalmente digerido con Bam HI y tratado con fosfatasa alcalina se mezcló con 5 μ g del inserto en tampón de ligazón conteniendo una unidad de la enzima ADN T4 ligasa. El producto de ligazón obtenido se utilizó en la transformación de protoplastos de la cepa *S. lividans* TK-21.

Entre la población de colonias resistentes al antibiótico tioestreptona, fue aislada una colonia muy pigmentada superproductora del antibiótico poliquétido actinorrodina y después de ser purificada se realizó la determinación de ADN plasmídico a partir del cultivo líquido en el medio adecuado.

Determinación del mapa de restricción del plasmidio pCV3

Se llevó a cabo el mapeo del fragmento mediante digestión enzimática utilizando varias enzimas de restricción. El tamaño de cada fragmento fue determinado mediante corrida electroforética en agarosa al 0.8% en tampón tris-borato, empleando el ADN del fago λ digerido con Hind III como patrón de peso molecular.

Southern-blot

La detección de secuencias específicas de ADN dentro de fragmentos mayores o del genoma se llevó a cabo por la técnica de transferencia descrita por Southern, 1975.

Determinación de la producción de antraciclinas

A partir de un cultivo de la cepa en medio SY crecido durante 48 h, se inoculó un fermentador de 2.5 l conteniendo 1.5 l de medio de producción, empleando como criterio un 5% (v/v). El proceso fermentativo tuvo una duración de 72 h manteniendo el valor de la temperatura en 30°C y el pH en 7.4. La cuantificación de los extractos se realizó de acuerdo al método descrito por Arcamone (1984) y Pandey y Toussaint (1980).

RESULTADOS Y DISCUSION

Aislamiento de colonias pigmentadas portadoras del plasmidio pCV3 conteniendo un fragmento de ADN activador de la biosíntesis de actinorrodina en *S. lividans* TK-21

La cepa *S. lividans* TK-21 presenta características notables como son buena esporulación, alta frecuencia de transformación, y restricción negativa; todo lo cual determina que sea utilizada como cepa hospedera para la expresión y aislamiento de clones de interés.

Al llevar a cabo la expresión de la genoteca de la cepa productora de antraciclinas SQF-15 en TK-21, del total de colonias transformantes tsr obtenidas, se aisló una colonia muy pigmentada productora del antibiótico poliquétido actinorrodina que mantuvo este fenotipo estable después de diez pases de replicación en medio fresco. El aislamiento del plasmidio confirmó la presencia de un fragmento de ADN de 6 kb clonado en el vector original pIJ680.

Se confirmó la presencia de un gen activador en el fragmento clonado al llevar a cabo la retransformación de protoplastos de TK-21 con pCV3, obteniéndose un 90-100% de colonias con este fenotipo.

Determinación del mapa de restricción del plasmidio recombinante pCV3

En la figura 1 se muestra el mapa de restricción del plasmidio pCV3. El fragmento clonado no presenta sitio para las enzimas Bgl II, Cla I y Kpn I.

Subclonación de fragmentos más pequeños del pCV3 en plasmidios de *E. coli* y *Streptomyces*

A partir de la determinación del mapa de restricción del pCV3, se llevaron a cabo algunos experimentos de subclonación con el objetivo de determinar el fragmento más pequeño que contiene la información genética para la activación de la producción del antibiótico y posteriormente realizar su secuenciación. Solamente el fragmento Sst I de 5 kb subclonado en el plasmidio de *E. coli* pIJ 2921 (pSP1) y luego transferido al pIJ680 provocó la activación del antibiótico.

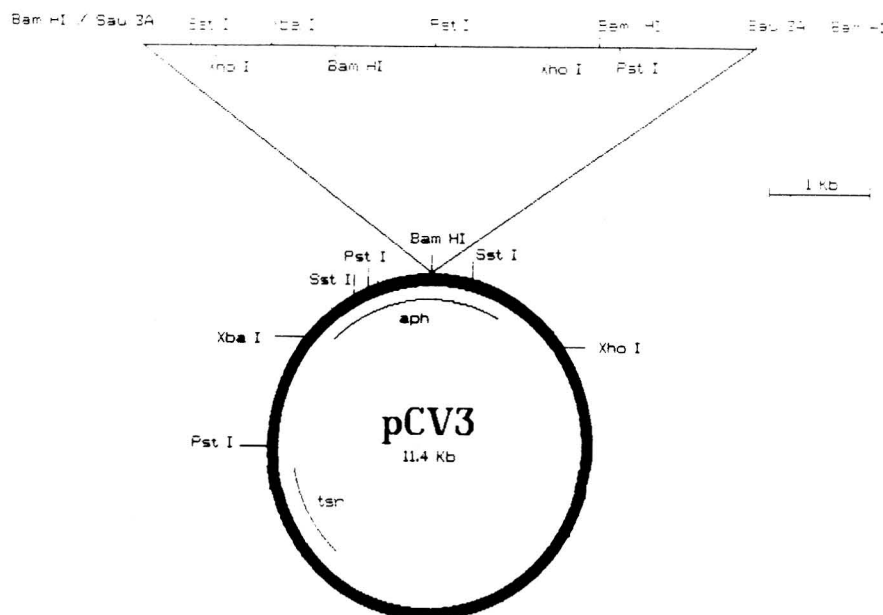


Fig. 1 Mapa de restricción del plasmidio recombinante pCV3. *-tsr:* gen de resistencia al antibiótico tioestreptona. *-aph:* gen de resistencia al antibiótico neomicina.

Prueba de homología mediante la técnica del Southern-blot

El plasmidio pSP1 sin digerir se utilizó como sonda para la determinación de homología con el ADN cromosómico de las cepas productoras SQF-15 y SQF-127. En la figura 2 se demuestra la presencia de la secuencia del fragmento Sst I del pCV3 en el ADN cromosómico de ambas cepas debido a la obtención de tres bandas de homología.

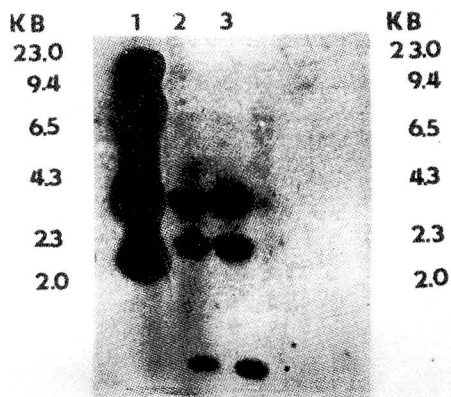


Fig. 2 Determinación de homología mediante la técnica del Southern-blot. Hibridación del plasmidio pSP1 con el ADN cromosómico de las cepas de *S. peuceitius* var *caesius* productoras de antraciclina, 127 y SQF-15.1:pSP1; 2:SQF-15/PstI; 3:127/PstI. Para la transferencia se realizó la corrida electroforética en gel de agarosa al 0,8% y la sonda previamente marcada con ³²P

Transformación de la cepa SQF-15 con pCV3

Con el objetivo de conocer la influencia del pCV3 en la producción de antraciclina, se llevó a cabo la transformación de protoplastos de la cepa SQF-15 con este plasmidio. Entre la población de transformantes obtenidos se observaron colonias que presentaban una pigmentación roja intensa correspondiente a una superproducción de antraciclina.

La preparación de plasmidio de algunas de estas colonias, así como su análisis de restricción permitió comprobar el patrón de bandas correspondientes al pCV3 (Resultados no mostrados).

La determinación de la producción de antraciclina en fermentadores de 2.5 l y bajo las condiciones descritas anteriormente, permitió comprobar un aumento de la producción del antibiótico en la cepa SQF-15 en presencia del fragmento de 6 kb clonado.

En la figura 3 se muestran los cromatogramas obtenidos mediante el análisis por HPLC del producto de la fermentación para la cepa salvaje SQF-15 y después de transformada con el pCV3.

CONCLUSIONES

En trabajos publicados recientemente se ha podido comprobar la existencia de homología genómica entre diferentes especies de *Streptomyces* productoras de antibióticos poliquétidos, como es el caso de *S. coelicolor*



Fig. 3 Cromatogramas obtenidos mediante el análisis por HPLC de los extractos en metanol del producto de la fermentación. (A) cepa salvaje SQF-15, (B) SQF-15 transformada con el plasmidio pCV3. Se utilizó una columna RP 18 y un detector uv a 254 nm. El sistema de solvente utilizado fue metanol:gua (75:25) pH 2 con ácido fosfórico, y un flujo de 2.5 ml/min. dox: doxorubicina.

(Hallan *et al.*, 1988) y *S. glaucescens* (Motamedi y Hutchinson, 1987), en las cuales los genes para la producción del antibiótico se encuentran agrupados en clusters. En nuestro trabajo el fragmento de ADN clonado está fuertemente relacionado con la producción de antibióticos poliquétidos, debido a su expresión fenotípica de producción del pigmento azul correspondiente al antibiótico actinorrodina en la cepa huésped TK-21, posteriormente se demostró su influencia como activador de la producción de antraciclinas en la cepa SQF-15. Al transformar la cepa *S. coelicolor* JF-15 mutante regulador actinorrodina negativo, no se obtuvo producción el antibiótico, por lo que se puede concluir que el fragmento clonado no contiene la información para complementar esta mutación (resultados no publicados).

En la actualidad se continúa el trabajo de subclonación de fragmentos a partir del pCV3, con el objetivo de localizar el fragmento más pequeño codificador de la secuencia activadora a través de su expresión en TK-21 y llevar a cabo su secuenciación.

REFERENCIAS

ARCAMONE, F. (1984). Antitumor anthracyclines: recent developments. *Med. Res. Rev.* 4 :153-188.
 GREIN, A. (1987). Antitumor anthracycline produced by *Streptomyces peuceiius*. *Advances in Applied Microbiology* 32:203-214.
 HALLAN, S.E; F. MALPARTIDA and D.A. HOPWOOD (1988). DNA sequence, transcription and deduced function of a gene involved in poliketide antibiotic synthesis in *Streptomyces coelicolor*. *Gene* 74:305-320.

HOPWOOD, D.A; T. KIESER; H.M. WHRIGTH and M.J. BIBB (1983). Plasmids, recombination and chromosome mapping in *Streptomyces lividans* 66. *J. Gen. Microbiol.* 129: 2257-2269.
 HOPWOOD, D.A.; M.J. BIBB; K.F. CHATER; T. KIESER; C.J. BRUTON; D.J. LYDIATE; C.P. SMITH; J.M. WARD and H. SCHREMPF (1985). *Genetic manipulation of Streptomyces: A laboratory manual*. John Innes Foundation. Ed. F. Crowe & Sons Ltd., Norwich, United Kingdom.
 LEDERBERG, E.M. and S.N. COHEN (1972). Transformation of *Salmonella thyphimorium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 119:1072-1074.
 MALPARTIDA, F and D.A. HOPWOOD (1986). Physical and genetic characterization of the genes cluster for the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Gen. Genet.* 205: 66-73.
 MANIATIS, T.; E.F. FRISCH and J. SAMBROOK (1982). *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
 MOTAMEDI, H. and C.R. HUNCHINSON (1987). Cloning and heterologous expression of a gene cluster for the biosynthesis of the tetracenomyein C, the anthracycline antitumor antibiotic of *Streptomyces glaucescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:4445-4449.
 PACKTER, N. M. (1980). Biosynthesis of acetate-derived phenols (poliketides). *The biochemistry of plants. Academic Press, Inc.* 4:535-570.
 PANDEY, R.C. and M.W. TOUSSAINT (1980). High performance liquid chromatography and thin layer chromatography of anthracycline. *Au. J. Chron.* 198 :407-420.
 SOUTHERN, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragment separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
 THOMPSON, C.J.; J.M. WARD and D.A. HOPWOOD (1982a). Cloning of antibiotic resistance and nutritional genes in *Streptomyces*. *J. Bact.* 151:668-677.
 YANISH-PERRON, C.; J. VIERA and J. MESSING (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13p18 and pUC 19 vectors. *Gene* 33:103-199.



Fig. 3 Cromatogramas obtenidos mediante el análisis por HPLC de los extractos en metanol del producto de la fermentación. (A) cepa salvaje SQF-15, (B) SQF-15 transformada con el plasmidio pCV3. Se utilizó una columna RP 18 y un detector uv a 254 nm. El sistema de solvente utilizado fue metanol:gua (75:25) pH 2 con ácido fosfórico, y un flujo de 2.5 ml/min. dox: doxorubicina.

(Hallan *et al.*, 1988) y *S. glaucescens* (Motamedi y Hutchinson, 1987), en las cuales los genes para la producción del antibiótico se encuentran agrupados en clusters. En nuestro trabajo el fragmento de ADN clonado está fuertemente relacionado con la producción de antibióticos poliquétidos, debido a su expresión fenotípica de producción del pigmento azul correspondiente al antibiótico actinorrodina en la cepa huésped TK-21, posteriormente se demostró su influencia como activador de la producción de antraciclinas en la cepa SQF-15. Al transformar la cepa *S. coelicolor* JF-15 mutante regulador actinorrodina negativo, no se obtuvo producción el antibiótico, por lo que se puede concluir que el fragmento clonado no contiene la información para complementar esta mutación (resultados no publicados).

En la actualidad se continúa el trabajo de subclonación de fragmentos a partir del pCV3, con el objetivo de localizar el fragmento más pequeño codificador de la secuencia activadora a través de su expresión en TK-21 y llevar a cabo su secuenciación.

REFERENCIAS

ARCAMONE, F. (1984). Antitumor anthracyclines: recent developments. *Med. Res. Rev.* 4 :153-188.
 GREIN, A. (1987). Antitumor anthracycline produced by *Streptomyces peuceiius*. *Advances in Applied Microbiology* 32:203-214.
 HALLAN, S.E; F. MALPARTIDA and D.A. HOPWOOD (1988). DNA sequence, transcription and deduced function of a gene involved in poliketide antibiotic synthesis in *Streptomyces coelicolor*. *Gene* 74:305-320.

HOPWOOD, D.A; T. KIESER; H.M. WHRIGTH and M.J. BIBB (1983). Plasmids, recombination and chromosome mapping in *Streptomyces lividans* 66. *J. Gen. Microbiol.* 129: 2257-2269.
 HOPWOOD, D.A.; M.J. BIBB; K.F. CHATER; T. KIESER; C.J. BRUTON; D.J. LYDIATE; C.P. SMITH; J.M. WARD and H. SCHREMPF (1985). *Genetic manipulation of Streptomyces: A laboratory manual*. John Innes Foundation. Ed. F. Crowe & Sons Ltd., Norwich, United Kingdom.
 LEDERBERG, E.M. and S.N. COHEN (1972). Transformation of *Salmonella thyphimorium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 119:1072-1074.
 MALPARTIDA, F and D.A. HOPWOOD (1986). Physical and genetic characterization of the genes cluster for the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Gen. Genet.* 205: 66-73.
 MANIATIS, T.; E.F. FRISCH and J. SAMBROOK (1982). *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
 MOTAMEDI, H. and C.R. HUNCHINSON (1987). Cloning and heterologous expression of a gene cluster for the biosynthesis of the tetracenomyein C, the anthracycline antitumor antibiotic of *Streptomyces glaucescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:4445-4449.
 PACKTER, N. M. (1980). Biosynthesis of acetate-derived phenols (poliketides). *The biochemistry of plants. Academic Press, Inc.* 4:535-570.
 PANDEY, R.C. and M.W. TOUSSAINT (1980). High performance liquid chromatography and thin layer chromatography of anthracycline. *Au. J. Chron.* 198 :407-420.
 SOUTHERN, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragment separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
 THOMPSON, C.J.; J.M. WARD and D.A. HOPWOOD (1982a). Cloning of antibiotic resistance and nutritional genes in *Streptomyces*. *J. Bact.* 151:668-677.
 YANISH-PERRON, C.; J. VIERA and J. MESSING (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13p18 and pUC 19 vectors. *Gene* 33:103-199.