FRAGMENTO DE ADN DE *Streptomyces resistomycificus* ACTIVADOR DE LA BIOSINTESIS DE POLIQUETIDOS

Lázaro Carbó[1]; Miguel Fernández-Moreno[2]; Francisco Malpartida[2]; César R. Gómez[3]; Carlos Vallín[1].

[1]*Centro de Química Farmacéutica. Apartado 6990, Ciudad de La Habana, Cuba.* [2]*Centro Nacional de Biotecnología. Campus de Canto Blanco, 28049, Canto Blanco, Madrid, España.* [3]*Instituto Finlay. Apartado 16017, Ciudad de La Habana, Cuba.*

Recibido en mayo de 1994. Aprobado en noviembre de 1994.

Key words: *Streptomyces*, activator, polyketides.

SUMMARY

We made a genomic library of the *Streptomyces resistomycificus* SQF-40 and isolated a 5 kb DNA fragment which is able to activate the antibiotic actinorhodin biosynthetic pathway when cloned in *Streptomyces lividans* TK21. The presence of this DNA fragment in *S. resistomycificus* SQF-40 was confirmed by southern blot. The restriction mapping of this fragment was constructed and the activator DNA region was sequenced.

RESUMEN

Se construyó una genoteca de la cepa *Streptomyces resistomycificus* SQF-40 (aislada de suelos cubanos), encontrándose un fragmento de 5 kb capaz de activar la ruta biosintética de producción del antibiótico actinorrodina en *Streptomyces lividans* TK21. Se confirmó la presencia de este fragmento en el cromosoma de *S. resistomycificus* SQF-40 mediante southern blot. Se realizó un mapeo de restricción de este fragmento y parte del mismo fue secuenciado.

INTRODUCCION

La especie *Streptomyces* tiene un ciclo celular que involucra la formación, como resultado de un crecimiento vegetativo, de una trama multicelular compuesta de hifas ramificadas, que sirve como micelio substrato para el crecimiento de hifas aéreas capaces de fraccionarse en cadenas de esporas.

En *Streptomyces coelicolor* A3(2), las investigaciones genéticas se han utilizado extensamente para analizar la regulación de la diferenciación morfológica y fisiológica (formación de un micelio aéreo y la síntesis de metabolitos secundarios respectivamente). Estos dos procesos tienen lugar luego del período de más rápido crecimiento vegetativo (1-3). La producción de antibióticos generalmente acompaña estos procesos de diferenciación, comenzando usualmente en la transición entre el crecimiento vegetativo y el desarrollo del micelio aéreo.

En muchos de los reportes analizados, se describen genes reguladores que sirven como activadores de las vías biosintéticas de varios metabolitos como: bialaphos (4), estreptomicina (5), undecilprodigiosina (6) y actinorrodina (2). Para la metilenomicina se reporta un represor implicado en el proceso (7). La actinorrodina es un antibiótico del grupo de los poliquétidos producido por *S. coelicolor* (8). A pesar de que no tiene utilidad farmacológica, su biosíntesis ha sido muy estudiada por bioquímicos (9) y genetistas (10). La razón de esta atención radica en la coloración azul intensa de este metabolito secundario, que facilita mucho el trabajo experimental y la obtención de información muy difícil de conocer estudiando cepas productoras de poliquétidos no coloreados. Aunque *S. lividans* TK21 y *S. coelicolor* A3(2) poseen en su genoma el agrupamiento (*cluster*) de todos los genes implicados en la biosíntesis de actinorrodina, solo producen este pigmento en cantidades casi indetectables en las condiciones habituales de cultivo (11, 12). Esto ha permitido la utilización de estas cepas como modelos para el estudio de la activación de la biosíntesis de antibióticos bajo diferentes condiciones fisiológicas o como consecuencia de la transformación con ADNs de otros *Streptomyces*.

Para estudiar la existencia en *S. resistomycificus* SQF-40 (un streptomiceto no productor de actinorrodina, aislado de suelos cubanos) de ADN con capacidad para activar la síntesis de actinorrodina, se construyó una librería genómica de esta cepa en *S. lividans* TK21. Este trabajo describe el hallazgo de un fragmento de ADN con capacidad activadora.

MATERIALES Y METODOS

Cepas bacterianas y plasmidios

La cepa de *E.coli* utilizada fue JM101, *sup*E, thi, Δ(lac-proAB) [F', *tra*D36, *pro*AB, *lacI*^{q}, ZΔM15](13). Las cepas de *Streptomyces* utilizadas fueron *S. lividans* TK21 (cepa salvaje SLP2$^-$, SLP3$^-$) (14) como hospedera y *S. resistomycificus* SQF-40 (aislada de suelos cubanos) como cepa donadora.

Los plasmidios de *E. coli* utilizados fueron pUC19, *Amp*^{r}, βgal (13) y los plasmidios pIJ2925, Amp^r, βgal (colección John Innes) y pSU21, Cm^r, βgal (brindado amablemente por Eduardo Martínez)

Copyright © 1994, Sociedad Iberolatinoamericana de Biotecnología Aplicada a la Salud
La Habana, Cuba

que son derivados del pUC19. Para *Streptomyces* se utilizó el vector pIJ702, de alto número de copias, que confiere resistencia al antibiótico tioestreptona (tsr^r) y que presenta el gen de la tirosinasa como marcador para inactivación insercional detectable por colonias blancas (no productoras del pigmento oscuro melanina o tirosinasa (15).

Condiciones, medios de cultivo y procedimientos microbiológicos

Para *Streptomyces* se utilizaron los medios líquidos y con agar R2YE y YEME descritos, junto con las condiciones para el crecimiento y la transformación, por Hopwood *et al.*. (16). La tioestreptona (obtenida de S.J. Lucania, E.R. Squibb and Sons, Princeton, N.J.) fue usada a una concentración de 50 μg/mL en medios con agar y 10 μg/mL en medios de cultivo. Las cepas de *E. coli* fueron crecidas en LB agar o medio LB a 37°C. La ampicillina y el cloranfenicol se obtuvieron de Boehringer Mannheim y se utilizaron a concentraciones de 50 y 25 μg/mL respectivamente (17).

Enzimas, reactivos y materiales

Las enzimas de restricción, la T4 ADN ligasa, el fragmento Klenow de la ADN polimerasa y la fosfatasa alcalina (CIAP) fueron obtenidas de Boehringer Mannheim. Los isótopos radioactivos y la membrana Hybond-N (Nylon) fueron obtenidos de Amersham Int. (R.U.).

Técnicas de trabajo con ADN

Se utilizaron técnicas ya establecidas para el aislamiento, clonaje y manipulación de ácidos nucleicos, los métodos utilizados están descritos por Hopwood *et al.* (16) para *Streptomyces* y por Maniatis *et al.*. (17) para *E. coli*. El southern blot se realizó utilizando el Dig Labelling and Detection Kit de Boehringer Mannheim. Se utilizaron muestras de 10 μg de ADN cromosomal y de 100 ng de ADN plasmídico digeridas con la enzima BamHI (2 U/μg) durante una hora y corridas en un gel de agarosa al 0,8% en tampón Tris acetato. Posteriormente el ADN fue transferido a un filtro de Nylon Hybond-N según el procedimiento de Southern *et al.* (18). La hibridación se realizó a 68°C con el plasmidio pLE 2033 marcado con digoxina por el método de random primers (19). El marcaje, la hibridación y el revelado se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

El secuenciamiento del ADN se realizó por el método de Sanger *et al.* (20), utilizamos el Kit 7-deaza-dGTP de United States Biochemicals (num.cat.70750) siguiendo las recomendaciones del productor. El fragmento adecuado fue previamente clonado en los vectores M13 mp18 o M13 mp19. Se secuenciaron ambas cadenas y los resultados obtenidos en cada una se compararon para reducir la posibilidad de error.

La secuencia de ADN fue sometida a una búsqueda de marcos de lectura abierta utilizando el programa CODONPREFERENCE del paquete UWGCG (21). Las secuencias de aminoácidos fueron analizadas utilizando varios programas del mismo paquete. Todos los análisis fueron realizados teniendo en cuenta las reglas de uso de codones en los streptomicetos en virtud del alto contenido de G+ C que presentan sus genomas (22). Las comparaciones de secuencia fueron hechas contra la base de datos de genes EMBL y contra la base de datos de proteínas Swissprot.

RESULTADOS Y DISCUSION

Clonaje del fragmento activador

El ADN cromosomal de la cepa de *S. resistomycificus* SQF-40 fue purificado, digerido parcialmente con la enzima Sau3AI y ligado al vector pIJ702, previamente digerido con la enzima BglII y desfosforilado con fosfatasa alcalina. El resultado de la mezcla de ligamiento se usó para transformar *S. lividans* TK21 con selección para resistencia a tioestreptona. Esta cepa presenta características notables como son buena esporulación, alta frecuencia de transformación y restricción negativa, todo lo cual determina que sea utilizada preferiblemente como cepa hospedera para experimentos de aislamiento y expresión de clones de interés.

El 98% de las colonias resistentes a tioestreptona fueron de coloración blanca, lo que indica una alta frecuencia de inserción en la mezcla de ligamiento. Las colonias blancas que al terminar su fase de crecimiento vegetativo comenzaron a producir una pigmentación azul intensa fueron seleccionadas para purificarle ADN plasmidico. Los plasmidios purificados fueron retransformados en *S. lividans* TK21 para comprobar que el fenotipo detectado era dependiente de su presencia.

Al retransformar con el plasmidio nombrado pLE202 se obtuvo entre un 90-100% de colonias pigmentadas; esto confirmó la presencia de un fragmento de ADN con alguna función activadora de la síntesis de actinorrodina en *S.lividans* TK21.

Análisis de restricción y subclonaje del fragmento activador

El análisis de restricción del plasmidio pLE202 reveló un inserto de aproximadamente 5 kb que presentaba sitios de restricción para las enzimas BglII, SacI, BamHI, XbaI y HincII no presentando sitios para ClaI y KpnI (figura 1).

A partir de la determinación del mapa de restricción del pLE202, se realizaron algunos experimentos de subclonaje con el objetivo de acotar aun más la zona del fragmento en la cual estaba contenida la información genética para la activación de la producción de la actinorrodina (tabla I). El plasmidio nombrado pLE2033, portador del fragmento de 0,4 Kb flanqueado por los sitios HincII mantuvo la propiedad de estimular la síntesis del antibiótico, por lo que fue considerado el mejor candidato para ser secuenciado.

Análisis por southern blot

El objetivo de este experimento fue probar la procedencia del fragmento activador de la cepa *S.resistomycificus* SQF-40 y descartar la posibilidad de que su presencia en el plasmidio pLE202 se debiera a un artefacto de clonaje. Para esto fue necesario utilizar un plasmidio de *E. coli* con el fragmento de 0,4 kb clonado, lo que garantizaría que en caso de hibridación ésta solo

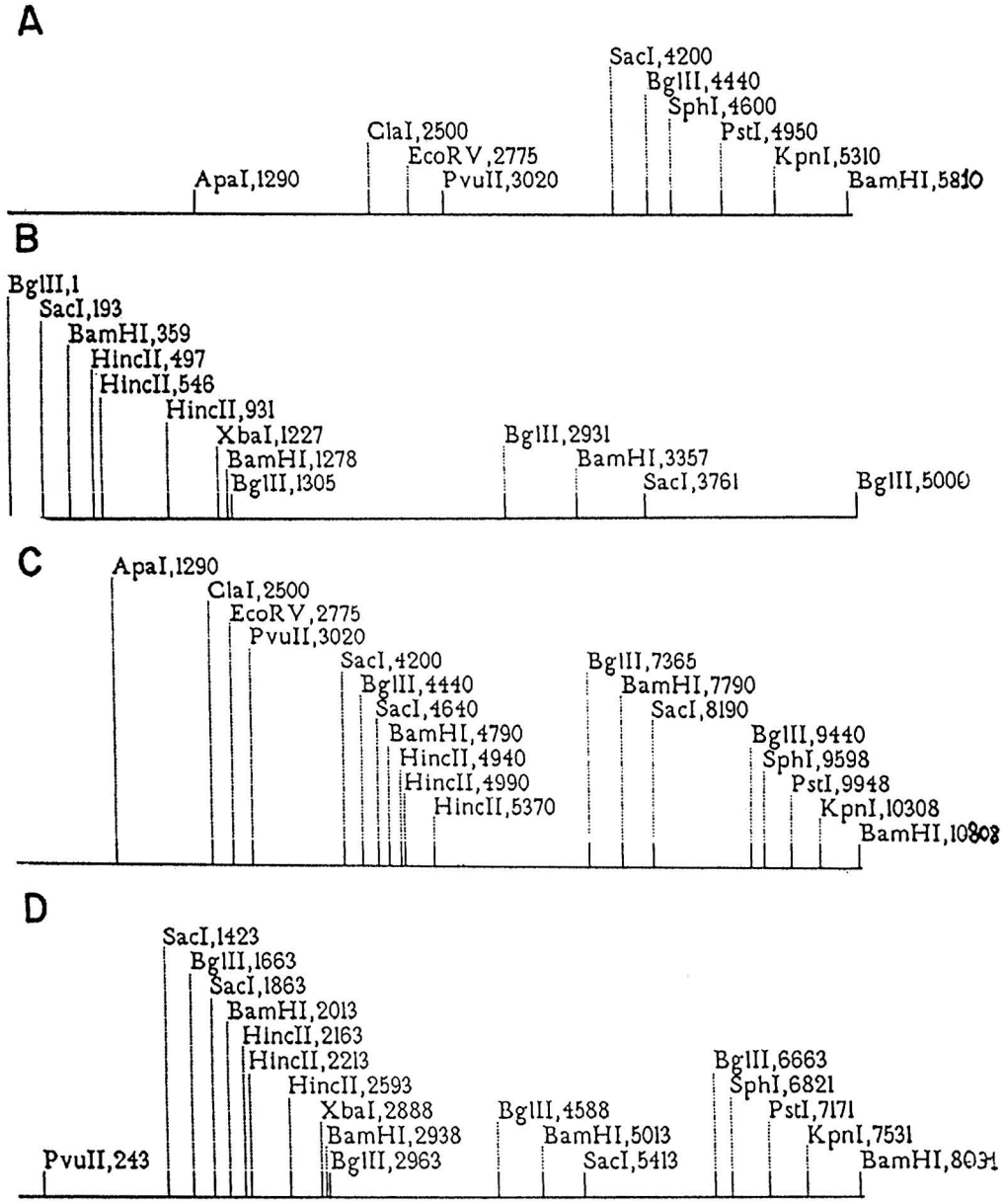

Fig. 1. Mapa de restricción del fragmento de 5 kb de *S. resistomycificus* clonado en el pIJ702. **A**, pIJ702 linearizado con XhoI. **B**, fragmento activador de 5 kb de *S. resistomycificus* flanqueado por los sitios BglII. **C**, pLE202 (pIJ702 con el fragmento activador clonado en su sitio BglII). **D**, fragmento XhoI/EcoRV del pLE202

pudiera ocurrir entre el inserto y otra secuencia de *Streptomyces* homóloga a éste. El plasmidio pLE2028, un derivado del plasmidio de *E. coli* pUC19, que contiene el inserto de 0,9 kb flanqueado por los sitios BamHI proveniente del plasmidio pLE2026, fue utilizado como sonda (tabla I).

La figura 2 muestra el resultado de la hibridación y permite asegurar que el fragmento activador proviene de *S. resistomycificus* SQF-40, y que no existe ninguna secuencia homóloga en *S. lividans* TK21. Otra conclusión que podemos inferir es que independientemente de cuál sea el mecanismo de la activación, ésta no depende del movimiento del fragmento activador hacia el cromosoma. La señal única que se detecta en la carrilera E a la altura del plasmidio indica que el ADN cromosomal de *S. lividans* TK21, transformado con el pLE2033, no muestra señal del inserto.

Tabla 1

Subclonaje del fragmento activador de 5 kb buscando la región más pequeña que conserve la capacidad para la activación. Los sitios de restricción están referidos a la figura 1C.

Plasmidio	Fragmento de restricción	Tamaño del Fragmento	Plasmidio receptor	Sitio de clonaje en el plasmidio receptor	Plasmidio obtenido	Activación
pLE202	BglII (4440) BglII (7365)	2925 pb	pIJ702	BglII	pLE2022	-
pLE202	EcoRV (2775) BglII (5740)	2965 pb	pIJ702	BglII-EcoRV	pLE2023	+
pLE202	BglII (5740) SphI (9598)	3858 pb	pIJ702	BglII-SphI	pLE2024	-
pLE202	EcoRV (2775) Sphi (9598)	6823 pb	pIJ702	HincII-SphI	pLE2025	+
pLE2023	SacI (4640) BglII (5740)	1100 pb	pUC19	SacI-BamHI	pLE2026	No ensayada
pLE202	SacI (4640) SacI (8190)	3550 pb	pUC19	SacI	pLE2027	No ensayada
pLE2026	BamHI (4790) BamHI (5715)	919 pb	pUC19	BamHI	pLE2028	No ensayada
pLE202	SacI (4640) BglII (5745)	1105 pb	pUC19	SacI/BglII	pLE2029	No ensayada
pLE2029	EcoRI (pUC19) HincII (4940)	500 pb	pUC19	EcoRI/HincII	pLE2030	No ensayada
pLE2028	HincII (4949) HincII (5334)	385 pb	pSU21	HincII	pLE2031	No ensayada
pLE2028	BamHI (4790) BamHI (5709)	919 pb	pIJ702	BglII	pLE2032	+
pLE2031	BamHI (pSU21) SphI (pSU21)	400 pb	pIJ702	BglII-SphI	pLE2033	+

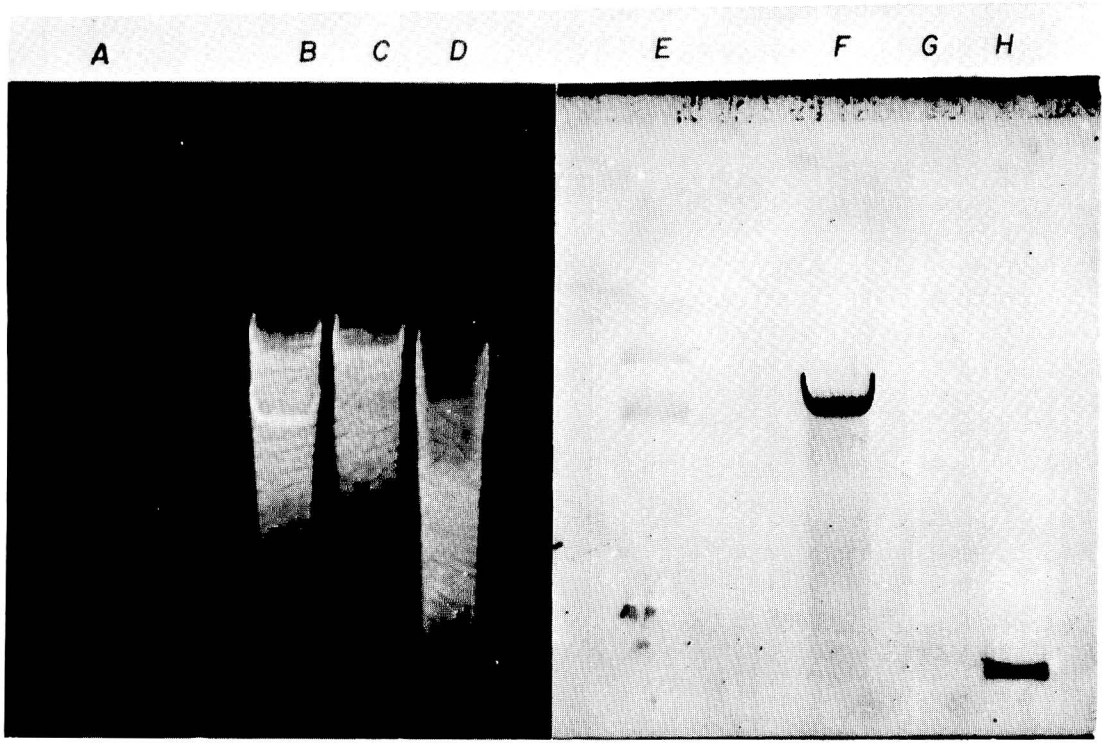

Fig. 2. Southern blot. A: Plasmidio pLE 2033, B: ADN total de *S. lividans* TK21 transformado con el pEL2033 y digerido con BamHI. C: ADN total de *S. lividans* TK21 digerido con BamHI. D: ADN total de *S. resistomysificus* digerido con BamHI. E, F, G y H muestran el resultado de la transferencia e hibridación de los ADNs anteriores con el plasmidio pEL2033 marcado con digoxina.

```
GTCAACAACA GCCCGGTCAC GCATCTGGCC ACGGCCGTGC
GCGAGTTGAT GGCGGGCAAC TGGCCCGCCC CCGACATAGC
CTGGTCGCTG GGCTGGTCGG CGGCGTTCGT CCTCGTCTTC
GGTGCGGTCA CCATGCGGTT GTACAACCGC AACTGAGGCC
GAGCGGGGCG GCGGCCGGTG GCTCCCACGG GGGTGGAACC
ACCGGCCGCC GTCCCGCCGG GTCCTGCTCT GATCAGAGCA
GGTGGTTGTA GGTCTCCCAG GCGTGGAAGA GCACCGAGCT
GCCCGTGCGG GCACGGAACG GAGCGCTCGC GCTGCCCGTG
CTCTCGTAGT AGTACGACGC GGCGTTGGGG CCGAACGCGT
AGAGATCGGG CCTGCCGTCG ACG
```

Fig. 3. Secuencia del fragmento de menor tamaño que conserva la capacidad activadora.

Análisis de la secuencia

La comparación contra las bases de datos de genes y proteínas no reveló la existencia de secuencias con homologías al fragmento activador.

El análisis de la secuencia de la región de 0.4 kb (figura 3), no reveló la existencia de un marco de lectura abierto (ORF). No se detectaron codones de iniciación y de terminación en la misma trama de lectura. El contenido de G+ C en la tercera posición fue por debajo del 50%, siendo el valor normal para *Streptomyces* de un 70%. El uso de los codones habituales para *Streptomyces* fue menor que el 40%, abundando los codones raros. Todo esto reduce mucho la posibilidad de que esta región sea una secuencia codificante y nos lleva a buscar una relación secuencia-función que no incluya la existencia de una proteína. Existen diversas explicaciones para la existencia de una secuencia nucleotídica con función reguladora que no implique un producto traduccional:

1- La secuencia clonada tenga capacidad para unir una proteína represora, con una afinidad mayor que la secuencia blanco en la cepa no transformada. De esta forma existe una competencia por la proteína represora entre la secuencia blanco en la cepa original y la secuencia clonada.

2- Codificación para un ARNt con capacidad reguladora.

3- Presencia de un ARN antisense.

4- Presencia de una Ribozima.

Se están realizando experimentos más profundos encaminados a dilucidar el mecanismo regulatorio.

La activación de rutas biosintéticas de antibióticos (algunas incluso silentes), por ADNs heterólogos es un hecho comprobado (23-26). En nuestro caso el fragmento clonado induce la producción de actinorrodina en la cepa no productora *S. lividans* TK21, sugiriendo la presencia de algún tipo de secuencia reguladora; esto abre nuevas posibilidades en el estudio de la regulacion de la sintésis de antibióticos por estos microorganismos de gran importancia industrial y ecológica.

REFERENCIAS

1. CHATER, K.F. (1984). Morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*. In: *Microbial development*. R. Losick and R. Shapiro (ed). Cold Spring Harbor, N.Y. pp.89-115.
2. CHATER, K.F (1990). Multilevel regulation of *Streptomyces* differentiation. *Trends Genet.* **5**:372-377.
3. HOPWOOD, D.A (1988). The Leeuwenhoek lecture, 1987. Towards an understanding of gene switching in *Streptomyces, the basis of sporulation and antibiotic production. Proc. R. Soc. Biol.* **235**:121-138.
4. ANZAI, H.; T. MURAKAMI; S. IMAI; A. SATOH; K. NAGAOKA and C.S. THOMPSON (1987). Transcriptional regulation of bialaphos biosinthesis in *Streptomyces* hygroscopicus. *J. Bacteriol.* **169**:3482-3488.
5. DISTLER, J.; A. EBERT; K. MANSOURI; K. PISSOWOTZKI; M. STOCKMAN and W. PIEPERSBERG (1987). Gene cluster for streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: nucleotide sequence of three genes and analysis of transcriptional activity. *Nucleic. Acids Res.* **15**:8041-8056.
6. MALPARTIDA, F.; J. NIEMI; R. NAVARRETE and D.A. HOPWOOD (1990). Cloning and expression in a heterologous host of the complete set of genes for biosynthesis of the *Streptomyces coelicolor* antibiotic undecylprodigiosin. *Gene.* **93**:91-99.
7. CHATER, K.F. and C.J. BRUTON (1985). Resistance, regulatory and production genes for the antibiotic methylenomycin are clustered. *EMBO J.* **4**:1893-1897.
8. BROCKMAN, H. and H. PINI (1947). Actinorhodin ein roter Farbstoff aus Actinomyceten. *Naturwissenschaften.* **34**: 190.
9. FLOSS, H.G.; S.P. COLE; X.-G. HE; B.A.M. RUDD; J. DUNCAN; I. FUJII; C.-J. CHANG and P. J. KELLER (1985). In: *Regulation of secondary metabolite formation. Biosynthesis of polyketide antibiotics.* H. Kleinkauf, H. von Dphren, H. Dornauer, and G. Nesemann (ed) VCH Verlaggsgesellschaft mbH. Weinheim. Federal Republic of Germany. pp. 283-304.
10. MALPARTIDA, F. and D.A. HOPWOOD (1984). Molecular cloning ofthe whole biosynthesis pathway of a *Streptomyces* antibiotic and its expression in a heterologous host. *Nature* (London). **309**:462-464.
11. SOON-KWANG, H.; K. MORIKAZU; B. TERUHIKO AND H. SUEHARU (1991). Phosphorilation of the AFsR product, a global regulatory protein for secondary-metabolite formation in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *J. of Bacteriology.* **173**: 2311-2318.
12. HOPWOOD, D.A.; F. MALPARTIDA and K.F. CHATER (1983). In: *Regulation of secondary metabolite formation*, Keinkauuf, H. ed. VCH. Weinheim Germany. pp. 23-33.
13. YANISCH-PERRON, C.; J. VIEIRA and J. MESSING (1985). Improved M13 cloning vector and host strains: nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19 vector. *Gene* **33**: 103-119.
14. HOPWOOD, D.A.; T. KIESER; H.M. WRIGHT and M.J. BIBB (1983). Plasmids, recombination and cromosome mapping in *Streptomyces lividans* 166. *J. Gen. Microbiol.* **129**:2257-2269.

15. KATZ, E.; C.J. THOMPSON and D.A. HOPWOOD (1983). Cloning and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans*. *J. Gen Microbiol.* **129**:2703-2714.
16. HOPWOOD, D.A.; M.J. BIBB; K.F. CHATER; T. KIESER; C.J. BRUTON, H.M. KIESER, D.J. LYDIATE, C.P. SMITH, J.M. WARD and H. SCHREMPF (1985). *Genetic manipulation of Streptomyces, a laboratory manual.* The John Innes Foundation, Norwich, England.
17. MANIATIS, T.; E.F. FRITSCH and J. SAMBROOK (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
18. SOUTHERN, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**:503-518.
19. FEINBERG, A.P. and B. VOGELSTEIN (1983). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemestry* **132**:6-13.
20. SANGER, F.; S. NICKLEN and A. R. COULSON (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA. **74**:5463-5467.
21. DEVEREUX, J.; P. HAEBERLI and O. SMITHIES (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the Vax. *Nucl. Acids Res.* **12**:387-395.
22. WRIGHT, A. and M.J. BIBB (1992). Codon usage in the G+ C rich Streptomyces genome. *Gene.* **113**:55-65.
23. HOPWOOD D.A. (1985). *Cloning and analysis of antibiotic biosynthesis genes in Streptomyces.* (eds) G. Szabo, S. Biro, M. Goodfellow, Sixth Int. Symp. on *Actinomycetes Biology.*
24. JONES, G.H. and D.A. HOPWOOD (1984). Activation of phenoxazinone synthase expression in *Streptomyces lividans* by cloned DNA sequences from *Streptomyces antibioticus. J. Biol. Chem.* **259**:14158-14164.
25. BINNIE, C.; M. WARREN and M.J. BUTLER (1989). Cloning and heterologous expression in *Streptomyces lividans* of *Streptomyces rimosus* genes involved in oxy-tetracycline biosynthesis. *J. Bacteriol.* **71**:887-895.
26. STANZAK, R.; P. MATSUSHIMA; R.H. BALZ and R. N. RAO (1986). Cloning and expression in Streptomyces lividans of clustered erythromycin biosynthesis genes from *Streptomyces erythreus. Biotechnology* **4**:229-232.