

Vector de clonación para la transferencia conjugativa de ADN de *E. coli* a *Streptomyces* spp.

Grisel Rosabal, Ricardo del Sol, Caridad Rodríguez, Elsa Pimienta, Karen Marrero,* Leonora González, Ileana Otero, Alfredo Figarola y Carlos Vallín.

Departamento de Biotecnología, Centro de Química Farmacéutica, Avenida 21 y 200, Atabey, Playa, Apartado Postal 6412, Ciudad de La Habana. *Departamento de Biología Molecular, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Cubanacán, Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 26 de septiembre del 2000. Aceptado: 21 de febrero del 2001.

Palabras clave: *Streptomyces*, conjugación, clonación, vector bifuncional.
Key words: *Streptomyces*, conjugation, cloning, shuttle vector.

RESUMEN. A partir del vector bifuncional y multicopia **pUWL-218** se construyó un vector de clonación **pRET-1**, para la transferencia conjugativa de ADN de *E. coli* a *Streptomyces* spp. Este vector contiene el fragmento **oriT** de 760 pb, proveniente del plasmidio **RK2 (INcP)**, el cual permite la conjugación. Además de ser bifuncional y conjugativo-replicativo, este vector presenta ventajas tales como: amplio espectro de hospederos en *Streptomyces*, multicopia con replicación autónoma, gen marcador **tsr** confiriendo resistencia a tioestreptona en *Streptomyces*, gen marcador **bla** confiriendo resistencia a ampicilina en *E. coli*, posee múltiples sitios de clonación, permite secuenciación directa de fragmentos de ADN y su expresión heteróloga. Su efectividad y funcionalidad fue comprobada con la clonación de un fragmento activador pleiotrópico aislado en el laboratorio. Se obtuvo el plasmidio recombinante conjugativo-replicativo **pRKT-1**, el cual permite obtener en un breve plazo y con gran eficiencia conjugantes de varias especies de *Streptomyces*: *S. fradiae*, *S. ambofaciens* y *S. rimosus*. Estas son cepas productoras de antibióticos poliquétidos de interés comercial, pero al trabajarlas genéticamente presentan una dificultad notoria para formar y transformar protoplastos, procesos que ocurren con muy baja eficiencia. Se obtuvieron con ambos plásmidos construidos porcentajes elevados de conjugantes y además, cepas recombinantes de *Streptomyces* genéticamente más estables que las obtenidas por el procedimiento convencionalmente utilizado, quedando demostrado las ventajas de la conjugación sobre la transformación en este género.

ABSTRACT. A cloning vector **pRET-1**, for the conjugal transfer of DNA from *E. coli* to *Streptomyces* spp., was built starting from the multicopy shuttle vector **pUWL-218**. This vector contains the 760 bp **oriT** fragment from the **INcP** plasmid, **RK2**, which allows the conjugation. Besides being conjugal and bifunctional, this vector has advantages like: wide-host-range in *Streptomyces*, vector multicopy with autonomous replication, marker **tsr** gene conferring resistance to thioestrepton in *Streptomyces*, marker **bla** gene conferring resistance to ampicillin in *E. coli*, it possesses multiple cloning sites, it allows direct sequencing of fragments of DNA and expression of heterologous proteins. The effectiveness of this vector was proven with the cloning of a pleiotropic activator fragment isolated in the laboratory. The conjugal recombinant plasmid **pRKT-1** was obtained, which allowed to obtain in a brief term and with high efficiency conjugants of several species of *Streptomyces*: *S. fradiae*, *S. ambofaciens* and *S. rimosus*. These three strains produce poliketide antibiotics by commercial attractive, but it is very difficult working genetically because it is not an easy form and transform protoplasts with them. Both processes take a place with low effectiveness. High per cent of conjugants with both plasmids and recombinants strains of *Streptomyces* genetically more stable were obtained in this work.

INTRODUCCION

Los *Streptomyces* son bacterias Gram positivas, conocidas por su habilidad de sintetizar metabolitos secundarios útiles con un amplio espectro de actividad biológica. El 70 % de los antibióticos conocidos en el mundo son producidos por *Streptomyces*. Dentro de estos, se destacan los del grupo de los poliquétidos que abarcan compuestos tales como los macrólidos: tilosina (producido por *S. fradiae*)¹ y espiramicina (producido por *S. ambofaciens*)² usada en medicina humana y veterinaria; y las tetraciclinas: oxitetraciclina (producido por *S. rimosus*) administrada en el forraje como alimento al ganado vacuno para prevenir infecciones, entre otros ejemplos.

Los trabajos genéticos en *Streptomyces* son llevados a cabo con vectores que están disponibles, pero para ser introducidos en la bacteria se requiere de la transformación de protoplastos mediada por PEG. Este procedimiento no ha sido muy eficiente³ aún con el aislamiento de mutantes de baja restricción,⁴ debido a la baja frecuencia de transformación con ADN aislado de *E. coli*, y por el tiempo y la ardua labor que necesita la preparación de protoplastos.⁵

La transferencia inter-genérica de plásmidos de *E. coli* a *Streptomyces* fue demostrada inicialmente por Mazodier y col.⁶ que incorporaron **oriT** desde **RK2** a un plasmidio replicativo **ppM803** y luego, por Smokvina y col.⁷ que construyeron el

vector integrativo **pSAM-2** basado en vectores integrativos que incorporaron la región *oriT*. A partir de entonces, la conjugación ha demostrado ser un proceso más efectivo y eficiente que la transformación,⁸ a pesar de que en muchos laboratorios se sigue el protocolo de preparación y transformación de protoplastos. En el caso bajo estudio, se continuaba con el proceso de transformación de protoplastos por la poca disponibilidad de vectores, ya que ninguna firma los comercializa. Se necesitaba además que fuese un vector adecuado para hacer efectiva la conjugación, ya que con los que se contaba eran integrativos o presentaban resistencia a apramicina, antibiótico no disponible en el mercado internacional.

El presente trabajo tuvo como objetivo obtener un vector de clonación para la transferencia conjugativa de ADN de *E. coli* a *Streptomyces*, así como demostrar su utilidad en el clonaje y expresión de fragmentos de ADN de naturaleza heteróloga.

MATERIALES Y METODOS

Cepas bacterianas y plasmidios

S. lividans TK21 (str-6 SLP2⁻, SLP3⁻)⁸ (colección John Innes).

S. ambofaciens SQF 183: productora de espiramicina y netropsina (cepario CQF).

S. fradiae SQF 121: productora de tilosina (cepario CQF).

S. rimosus SQF 4: productora de oxitetraciclina (cepario CQF).

E. coli JM109: K-12 *recA1* Δ (*lac-pro*) *endA1* *gyrA96* *thi-1* *hsdR17* *supE44* *relA1*.

(F⁻ *traD36* *proAB*⁺ *lacI*^q Δ 15).⁹

E. coli ET12567: cepa donante para la conjugación.¹⁰

pUZ8002: cloranfenicol^R, kanamicina^R, interviene en el proceso de conjugación.¹⁰

pUWL-218: ampicilina^R, β gal, tioestreptona^R, multicopia y bifuncional.¹¹

pIJ2925: ampicilina^R, β gal (colección John Innes).

pIJ4090¹²: **pIJ487** que contiene el fragmento KpnI-BamHI *ermEp* de 280 pb, promotor del gen de resistencia a eritromicina proveniente de *Saccharopolyspora erythraea*.¹³

pLE2031¹⁴: plasmidio que contiene el fragmento de 400 pb, activador de la producción de compuestos de naturaleza poliquétida.

pSET-152: ampicilina^R, apramicina^R, integrativo-conjugativo, contiene el fragmento *oriT* (cortesía del

Dr. Paul Dayson, School of Biological Sciences, University of Wales, Swansea, UK).

Condiciones de cultivo, procedimientos microbiológicos y manipulaciones genéticas

La formación y transformación de células competentes, así como el aislamiento de ADN plasmídico en *E. coli*, se hicieron como está descrito en el Manual de Maniatis y colaboradores.¹⁵ Se crecieron en LB agar o LB a 37 °C y cuando fue necesario, se empleó como suplemento ampicilina 100 μ g/mL (Empresa Farmacéutica "8 de Marzo", Ciudad de La Habana), ácido nalidixico 100 μ g/mL (SIGMA), kanamicina 50 μ g/mL (SIGMA) y/o cloranfenicol 25 μ g/mL (Boehringer Mannheim).

Para *Streptomyces* se utilizaron los medios líquidos y con agar TSB y YEME para el aislamiento de ADN plasmídico, descritos por Hopwood y colaboradores.¹⁶ Se emplearon además los medios con agar SYM (almidón soluble 0,6 %, extracto de levadura 0,1 %, extracto de malta 0,1 %, K₂HPO₄ 0,1 %, MgSO₄ · 7H₂O 0,1 %, NaCl 0,3 %, agar 2,0 %, pH 7,0) para crecer esporas y MS (manitol 2 %, harina de soya 2 % y agua corriente) para la siembra de la mezcla de conjugación. Para la pre-germinación de esporas se empleó el medio apropiado.¹⁶ Se adicionó a los medios tioestreptona como suplemento (S.J. Lucania, E.R. Squibb and Sons, Princeton, N.J.) cuando fue necesario. Para la manipulación de ácidos nucleicos se emplearon las técnicas descritas.¹⁶

Las digestiones enzimáticas y ligamientos de ADN, se hicieron de acuerdo con las indicaciones de los suministradores (Amersham y Boehringer). Como patrón de tamaño se utilizó el ADN del fago Lambda digerido con Hind III.

Conjugación *E. coli*-*Streptomyces*

Se empleó una modificación del método de Mazodier y colaboradores.⁸ Se prepararon células competentes de ET12567 (**pUZ8002**) bajo selección de cloranfenicol y kanamicina. Se transformaron con los plasmidios obtenidos en LB con ampicilina. Se inocularon a partir de una suspensión de las cepas donantes de *E. coli* a un pre-cultivo de 3 mL de LB con Amp, Km, Cm y se crecieron toda la noche a 37 °C. Se centrifugó el cultivo y al precipitado respectivo se le hicieron lavados con LB. La biomasa obtenida se resuspendió en 0,3 mL del mismo medio. Una ali-

cuota (0,1 mL) de las suspensiones de esporas de *Streptomyces* se lavaron dos veces con una disolución isotónica, y se resuspendieron en 0,5 mL de dicha disolución. Se incubaron a 50 °C durante 10-15 min. Se añadieron 0,5 mL de medio de pre-germinación 2X y se incubaron a 37 °C en zaranda rotatoria a 260 r/min de 1 a 2 h. Finalmente, se mezclaron las esporas pre-germinadas con la cepa donante de *E. coli*. Esta mezcla se sembró en placas con medio MS y MgCl₂ 10 mmol/L y se incubaron a 30 °C en tres casos y en uno (*S. fradiae*) a 37 °C.

A las 24 h se añadió a las placas 1 mL de agua que contenía 0,5 mg de ácido nalidixico y la concentración adecuada de tioestreptona. Los conjugantes de *Streptomyces* obtenidos se replicaron a placas de SYM con ácido nalidixico y tioestreptona a 50 μ g/mL para *S. lividans* TK21, 15 μ g/mL para *S. rimosus* y 25 μ g/mL para *S. fradiae* y *S. ambofaciens*.

RESULTADOS Y DISCUSION

Construcción del vector de clonación conjugativo-replicativo pRET-1

Se utilizó el plasmidio bifuncional **pUWL-218**¹¹ donde se clonó EcoRI/BamHI el promotor del gen de resistencia a eritromicina *ermEp*, que posee una capacidad promotora fuerte.¹² A este plasmidio resultante se le denominó **pE9**. El vector **pRET-1** se obtuvo por la clonación en el **pE9** del fragmento de 760 pb *oriT* Pst I proveniente del **pSET-152** (plasmidio integrativo-conjugativo que contiene el fragmento *oriT*), ya que la transferencia conjugativa de ADN de *E. coli* a *Streptomyces* spp. requiere del mencionado fragmento y este proceso necesita ser llevado a cabo en "trans" por la cepa *E. coli* donante. Este plasmidio sirve como vector de clonación de diversos genes, para construcciones que se realicen en *E. coli*, las cuales pueden ser transferidas por conjugación a las más variadas especies de *Streptomyces* (Fig. 1).

Construcción del plasmidio recombinante pRKT-1

A partir del **pLE2031**¹⁴ se extrajo la banda activadora pleiotrópica de 400 pb proveniente de *S. rochei* y se clonó en el **pIJ2925** (Hinc II). Del plasmidio recombinante obtenido **pIJ2934**, se eluyó la banda Bgl II que contenía al activador. Se ligó al vector en prueba **pRET-1** y al plasmidio recombinante construido se le denominó **pRKT-1** (Fig. 2).

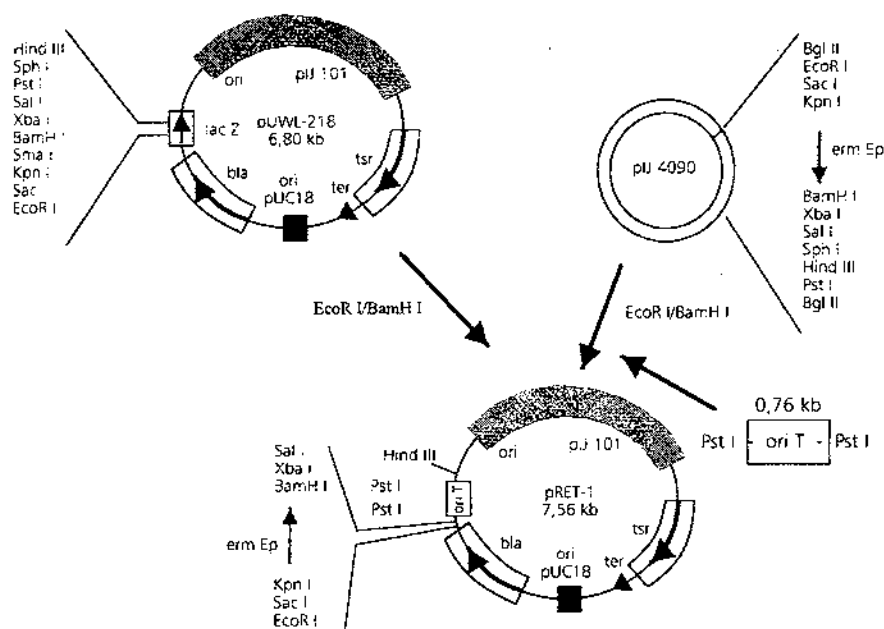


Fig. 1. Esquema de construcción del vector conjugativo-replicativo **pRET-1**.

ADN heterólogo ya es un hecho comprobado.^{19,20} *S. lividans* es además una de las cepas más empleadas para trabajos genéticos, ya que es fácil su manipulación, la formación y transformación de protoplastos, posee un sistema de restricción "dócil", entre otras características que hacen a la especie idónea para este tipo de trabajo.

Los conjugantes de *S. lividans* TK21 con el vector **pRET-1** mantuvieron su fenotipo normal, mientras que con el plasmidio **pRKT-1** hubo una visible activación de la coloración azul. En ambos casos, se obtuvieron las placas con agar cubiertas de conjugantes. Una vez que se chequeó la presencia de los plasmidios por aislamiento y restricción y se mantuvieron los fenotipos estables después de varios pases de replicación a medio fresco con antibiótico, se decidió probar la efectividad de esos plasmidios en otras cepas de *Streptomyces*. En el caso de trabajo, el fragmento clonado en el vector obtenido pRET-1 (proveniente de *S. rochei*), activó la producción en *S. lividans* TK21 del poliquétido actinorrodina, lo cual corroboró que el vector conjugativo-replicativo es potencialmente útil en la expresión de fragmentos de ADN de naturaleza heteróloga.

Conjugantes de *Streptomyces* spp.

S. fradiae, *S. ambofaciens* y *S. rimosus* son cepas productoras de antibióticos poliquétidos y presentan una dificultad notoria para formar y transformar protoplastos mediados por PEG, ocurriendo ambos procesos con muy baja eficiencia^{3,5} por lo que conjugadas era una alternativa tentadora. En las tres especies de *Streptomyces* se usaron esporas para la conjugación, ya que este proceso morfo-fisiológico lo tienen bien desarrollado.

Frecuencias de conjugantes que se conocen^{21,22} para estas especies de *Streptomyces* conjugadas con otros plasmidios, son similares o inferiores a las obtenidas en este trabajo.

Se obtuvieron conjugantes estables (Tabla 1), a pesar de que en el caso del plasmidio recombinante **pRKT-1** el número de conjugantes obtenidos por placa era menor que con el **pRET-1**. Esto pudo deberse a que el activador pleiotrópico se encontraba clonado en un vector de elevado número de copias pudiendo resultar tóxico a la célula y al propio mecanismo por el cual actúa este fragmento heterólogo, ya que está comprobado que la naturale-

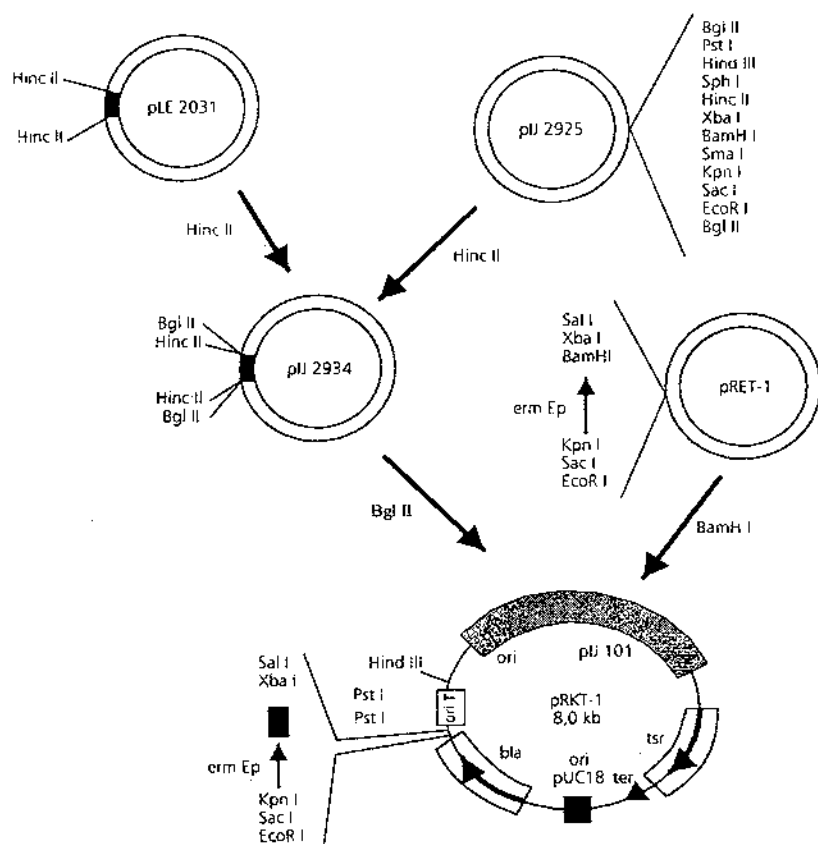


Fig. 2. Esquema de construcción del plasmidio conjugativo recombinante **pRKT-1**.

Conjugantes de *Streptomyces lividans* TK21

Para comprobar el buen funcionamiento de los plasmidios obtenidos, se conjugó primeramente *S. lividans* TK21, conociendo de antemano que debía existir activación de actinorrodina en el caso específico

del plasmidio recombinante **pRKT-1**. Este compuesto de naturaleza poliquétida, de color azul, se produce en esta cepa en niveles basales por lo que necesita un activador u otro elemento que dispere su ruta biosintética considerada "silente"^{17,18} y la activación de rutas biosintéticas por

Tabla 1. Frecuencia de conjugantes de *Streptomyces* spp.

Cepas de <i>Streptomyces</i>	pRET-1	pRKT-1
	(%)*	
<i>S. fradiae</i> SQF-121	10-15	5-8
<i>S. ambofaciens</i> SQF-183	20-25	10-15
<i>S. rimosus</i> SQF-4	10-15	3-5

* Valor referido a la población viable inicial de esporas.

za del ADN a expresar afecta la frecuencia de conjugación.^{14,23} Los conjugantes fueron chequeados también por aislamiento de los plasmidios, corte de restricción y varios pases de replicación en medio agar con tioestreptona. Se comprobó, de esta forma, que el vector pRET-1 tiene potencialmente amplio espectro de hospederos.

Las ventajas de la conjugación sobre la transformación en este trabajo fueron amplias como, que no dio lugar a tanta manipulación, por lo que las probabilidades de contaminación fueron mínimas; demostró ser un proceso eficiente pues representó un ahorro considerable tanto de material como de tiempo, para finalmente aportar mejores resultados. Disponer en el laboratorio de estos vectores conjugativos-replicativos permitió además, obtener cepas recombinantes de *Streptomyces* genéticamente más estables que las obtenidas por el procedimiento convencionalmente utilizado.

CONCLUSIONES

Se fabricó un vector conjugativo-replicativo pRET-1 de elevado número de copias con amplio espectro de hospederos en *Streptomyces*. Se comprobó su viabilidad y efectividad con la clonación de un fragmento de ADN de naturaleza heteróloga pRKT-1.

Se obtuvieron conjugantes estables de *Streptomyces* spp. con estos plasmidios en breve tiempo y con mucha eficiencia y se logró el establecimiento de la técnica de conjugación en el laboratorio para trabajos futuros.

AGRADECIMIENTOS

Al Lic. Esteban Pérez Fernández (Director de Redacción de esta Revista) y a los Técnicos Osmin Gordo y Simón Chang por la colaboración prestada.

BIBLIOGRAFIA

- Baltz R.H., Seno E.T. Propiedades of *Streptomyces fradiae* mutants blocked in biosynthesis of the macrolide antibiotic tylosin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 20, 214, 1981.
- Richardson A., Kchloss S., Huber M., Ford L., Godfrey O., Turner J.R., and Rao R. N. Cloning of Spiramycin Biosynthetic Genes and their use in constructing *Streptomyces ambofaciens* mutants defective in Spiramycin Biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, 172, 3790, 1990.
- Matsushima M. and Baltz R.H. Efficient Plasmid Transformation of *Streptomyces ambofaciens* and *Streptomyces fradiae* protoplasts. *Journal of Bacteriology*, 163, 180, 1985.
- Matsushima M., McHenry A. and R.H. Baltz Transduction and Transformation of Plasmid DNA in *Streptomyces fradiae* Strains That Express Different Levels of Restriction. *Journal of Bacteriology*, 171, 3080, 1989.
- Rao R.N., Richardson M.A. and Kuhstoss, S.A. Cosmid shuttle vectors for cloning and analysis of *Streptomyces* DNA. *Methods Enzymol.*, 157, 166, 1987.
- Mazodier P., Petter R. and Thompson C. Intergeneric conjugation between *Escherichia coli* and *Streptomyces* species. *Journal of Bacteriology*, 171, 3583, 1989.
- Smokvina T., Mazodier P., Boccard E., Thompson C.J., and Guerineau M. Construction of a series of pSAM2-based integrative vectors for use in actinomycetes. *Gene*, 94, 53, 1996.
- Hopwood D.A., Kieser T., Wright H.M. and Bibb M.J. Plasmids, recombination and chromosome mapping in *Streptomyces lividans*. *J. Gen. Microbiol.*, 129, 2257, 1994.
- Yanisch-Perron C., Vieira J. and Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 33, 103, 1985.
- Ward M., Janssen G.R., Kieser T., Bibb M.J., Buttner M.J. and Bibb M.J. Construction and characterization of a series of multi-copy promoter-probe

plasmid vectors for *Streptomyces* using the aminoglycoside phosphotransferase gene from Tn5 as indicator. *Mol. Gen. Genet.*, 203, 468, 1986.

- Wehmeier F. New multifunctional *Escherichia coli*-*Streptomyces* shuttle vector allow blue-white screening on X-gal plates. *Gene*, 165, 149, 1995.
- Bibb M.J., Janssen G.R. and Ward J.M. Cloning and analysis of the promoter region of the erythromycin-resistance gene (*ermE*) of *Streptomyces erythraeus*. *Gene*, 38, 215, 1985.
- Tuan S., Weber J.M., Staver M.J., Leung J.O., Donadio S. and Katz L. Cloning of genes involved in erythromycin biosynthesis from *Saccharopolyspora erythraea* using a novel actinomycete-*Escherichia coli* cosmid. *Gene*, 90, 21, 1990.
- Rodríguez C., Carbó L., Rosabal G. y Vallín C. Efecto activador de un fragmento de ADN proveniente de *Streptomyces rochei* sobre la biosíntesis de antibióticos. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 24, 1996.
- Maniatis T., Fritsh E.F. and Sambrook J. Molecular cloning: A Laboratory Manual 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.
- Hopwood D.A. et al. Genetic Manipulation of *Streptomyces* a Laboratory Manual. John Innes Foundation, Norwich, England, 1985.
- Chater K.F. Multilevel regulation of *Streptomyces* differentiation. *Trends Genet.*, 5, 372, 1990.
- Soon-Kwang H., Morikazu K., Teruhiko B. and Suerharu H. Phosphorylation of the AfsR product, a global regulatory protein for secondary-metabolite formation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*, 173, 2311, 1991.
- Hopwood D.A. Cloning and analysis of antibiotic biosynthesis genes in *Streptomyces*. (ed.) G. Szabó, S. Biro, M. Goodfellow; Sixth Int. Symp. on Actinomycetes Biology, 1985.
- Binnie C., M. Warren and M.J. Butler Cloning and heterologous expression in *Streptomyces lividans* of *Streptomyces rimosus* genes involved in oxytetracycline biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, 71, 887, 1989.
- Bierman R., Logan K., O'Brien R., Nagajara Rao and Schoner B.E. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA to *Streptomyces* spp. *Gene*, 3, 43, 1992.
- Motamedi A. Shafiee and Sheng-Jian Cai. Integrative vectors for heterologous gene expression in *Streptomyces*. *Gene*, 160, 25, 1995.
- Carbó L., Fernández-Moreno M., Malpartida F., Gómez C.R. y Vallín C. Fragmento de ADN de *Streptomyces resistomicificus* activador de la biosíntesis de poliquétidos. *Biotecnología Aplicada*, 4, 213, 1994.