

ACTIVACION DE LA BIOSINTESIS DE ANTIBIOTICOS EN *STREPTOMYCES* POR UN FRAGMENTO DE ADN PROVENIENTE DE *MYCOBACTERIUM bovis* BCG

K. Marrero, R. del Sol, C. Vallín y C. Gómez.

Departamento de Biotecnología, Centro de Química Farmacéutica, Calle 200 y Avenida 21, Atabey, Apartado Postal 6990, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 13 de diciembre de 1996.

RESUMEN. A partir de una genoteca de *Mycobacterium bovis* BCG en *Streptomyces lividans* TK54, se aisló un fragmento de ADN capaz de activar la biosíntesis de la actinorrodina. Para estudiar su efecto, se introdujo en cepas de *S. coelicolor* mutadas en diferentes genes reguladores relacionados con la producción de antibióticos y con la esporulación. Se comprobó que en una de estas cepas aumentaba la producción de otro antibiótico: la undecilprodigiosina y se puso en evidencia un efecto pleiotrópico de regulación.

ABSTRACT. The isolation and partial characterization of a DNA fragment from *M. bovis* BCG genomic library capable of activating actinorhodin biosynthesis in *S. lividans* and *S. coelicolor* is described. The effect of this fragment on mutants *S. coelicolor* was studied and the activation of undecylprodigiosin biosynthesis, on one of them, was observed.

INTRODUCCION

Los *Streptomyces* son bacterias filamentosas Gram positivas del suelo, que se diferencian morfológicamente para formar esporas.¹ Son importantes desde el punto de vista comercial porque producen más del 60% de los antibióticos conocidos,² por lo que han sido objeto de numerosos estudios con vistas a mejorar su productividad. Asimismo, se ha llegado a establecer que la producción de antibióticos en este género está bajo una complicada regulación genética.³

S. coelicolor, la especie genéticamente más estudiada del género, produce cuatro antibióticos: actinorrodina,⁴ undecilprodigiosina,⁵ metilfenamicina⁶ y el antibiótico dependiente de calcio.⁷ En este microorganismo se han identificado diferentes genes reguladores: unos que están unidos al agrupamiento (*cluster*) de los genes biosintéticos específicos para cada antibiótico^{8,9} y otros, que están alejados del *cluster*, los que pueden tener actividad pleiotrópica, ya que no sólo regulan la producción de diferentes antibióticos en la misma cepa,^{10,11} sino también la esporulación,¹² procesos que están aparejados temporalmente.

Dada la importancia de los estudios de la regulación de la producción de antibióticos en diferentes especies de *Streptomyces*, tanto desde el punto de vista científico como comercial, fue propósito de este trabajo clonar y caracterizar fisiológica y molecularmente de forma parcial, un fragmento proveniente de *M. bovis* BCG, capaz de activar la producción de antibióticos en *S. lividans* y *S. coelicolor*.

MATERIALES Y METODOS

Cepas bacterianas y plasmidios

S. lividans TK54¹³ se utilizó para la transformación de la genoteca de *M. bovis* BCG (Moreau) en el vector pIJ702.¹⁴ Otros hospederos empleados fueron: *S. lividans* TK21,¹³ *S. coelicolor* ATCC 10147 (salvaje) y los mutantes JF1 (*redD42*, *act1177*, *argA1*, *guaA1*)¹⁵ y J1703 (*hisA1*, *uraA1*, *strA1*, *pgf*, *bldA16*, *SCP1*^{NF}, *SCP2*).¹⁶ El inserto del pMS541 fue subclonado en el vector de *E. coli* pJ2925 (John Innes Collec-

tion) **obteniéndose** el pME541 y con vistas a su propagación se utilizó la *E. coli* JM101.¹⁷ En la realización de un análisis de "Southern blot" se usaron como fuentes de ADN cromosomales *S. resistomyticifus* SQF-40,¹⁸ *S. clavuligerus* ATCC 2764, *M. smegmatis* mc² 155,¹⁹ *M. fortuitum* ATCC 6842, *S. lividans* TK21, *S. coelicolor* ATCC 10147 y *M. bovis* BCG.

Medios de cultivo y métodos utilizados

Los medios, las condiciones de cultivo y los métodos empleados para el crecimiento de las cepas de *Streptomyces* han sido descritos anteriormente.²⁰ En el caso de la formación de protoplastos y obtención de plasmidios se usó como medio líquido el YEME, mientras que para la determinación de la actinorrodina y de la undecilprodigiosina se utilizó el medio mínimo; en tanto que como medio sólido se usó el R2YE para la regeneración de los protoplastos y la preparación de las suspensiones de esporas.

En la selección de los transformantes se utilizó agar nutriente blando.

En los casos que fue necesario, se añadió tiostreptona (Calbiochem, Novabiochem Corporation, La Jolla, CA 92039) a una concentración final de 5 µg/mL para medio líquido y de 50 µg/mL, para medio sólido.

En el cultivo de *E. coli* los medios y métodos empleados fueron los descritos por Sambrook y col.²¹ Para la obtención de plasmidios y células competentes, se utilizó el medio LB líquido, mientras que como medio sólido para la selección de los transformantes, se utilizó LB con agar al 2%. Cuando fue necesario, se empleó ampicilina a una concentración final de 50 µg/mL tanto en medio líquido como en medio sólido.

En micobacterias se utilizó el medio Sauton²² como medio de cultivo para la purificación de ADN cromosomal según el procedimiento reportado por Ausubel y colaboradores.²³

La determinación de la actinorrodina se realizó según el procedimiento de Helen Kieser²⁴ y la de la undecilprodigiosina, según Tsao y colaboradores.⁵

Manipulación del ADN

Los métodos utilizados para la purificación, clonación y manipulación de plasmidios y aislamientos de ADN cromosomales de las cepas de *Streptomyces* fueron los reportados por Hopwood y col.²⁰ y para *E. coli* los de Sambrook y col.²¹ En las digestiones realizadas, se emplearon endonucleasas de restricción de Amersham y Bøehringer Mannheim.

La desfosforilación y el ligamiento de los fragmentos de ADN se desarrollaron con fosfatasa alcalina (CIAP, Amersham) y T4 DNA ligasa (Amersham), respectivamente. Para la realización del análisis de "Southern blot" se utilizó un sistema de detección DIG-ADN (Bøehringer Mannheim). En todos los casos, para su empleo se siguieron las instrucciones del fabricante.

RESULTADOS Y DISCUSION

Librería genómica de *M. bovis* BCG en *S. lividans* TK54

Se digirieron 10 µg de ADN cromosomal de *M. bovis* BCG se digirió con Sau3A para obtener fragmentos de aproximadamente 5 kb. El ADN digerido se ligó con 300 ng del vector pLJ702 previamente cortado con BglII y desfosforilado. La mezcla de ligamiento se transformó en protoplastos de *S. lividans* TK54, el cual constituía un buen hospedero para la clonación de fragmentos que activaran la biosíntesis de la actinorrodina, ya que presenta esta vía biosintética completa, pero

su expresión era muy baja. Se obtuvieron cerca de 1 000 transformantes resistentes a tioestreptona. De ellos, una colonia mostró una intensa coloración azul, típica de la producción de actinorrodina. Se le aisló el plasmidio y se retransformó en *S. lividans* TK21 y se obtuvieron mayoritariamente colonias azules, lo que confirmó que la activación se debía al plasmidio introducido. Se utilizó esta cepa porque presenta igual fenotipo que *S. lividans* TK54 en cuanto a la producción del antibiótico y es la más usada como hospedero en experimentos de clonación. Al plasmidio se le denominó pMS541.

Análisis de restricción del pMS541

Un análisis de restricción del pMS541 con las enzimas SacI/KpnI, reveló un inserto de aproximadamente 600 pb. Diferentes análisis de restricción del fragmento no mostraron sitios internos para las enzimas EcoRI, BstEII, XhoI, SmaI, HincII, Sall, SstI, SstII, BamHI, KpnI, PstI. Una digestión BglII/PstI demostró que el ligamiento SaU3A/BglII regeneró un sitio BglII más cercano al sitio SacI del pLJ702 (Fig. 1).

Subclonaje en *E. coli*

Con el objetivo de aumentar el rendimiento del inserto activador, se extrajo el fragmento del pMS541 con SacI-KpnI y se subclonó en el pLJ2925 digerido con las mismas enzimas, lo que dio lugar al plasmidio pME541 (Fig. 1).

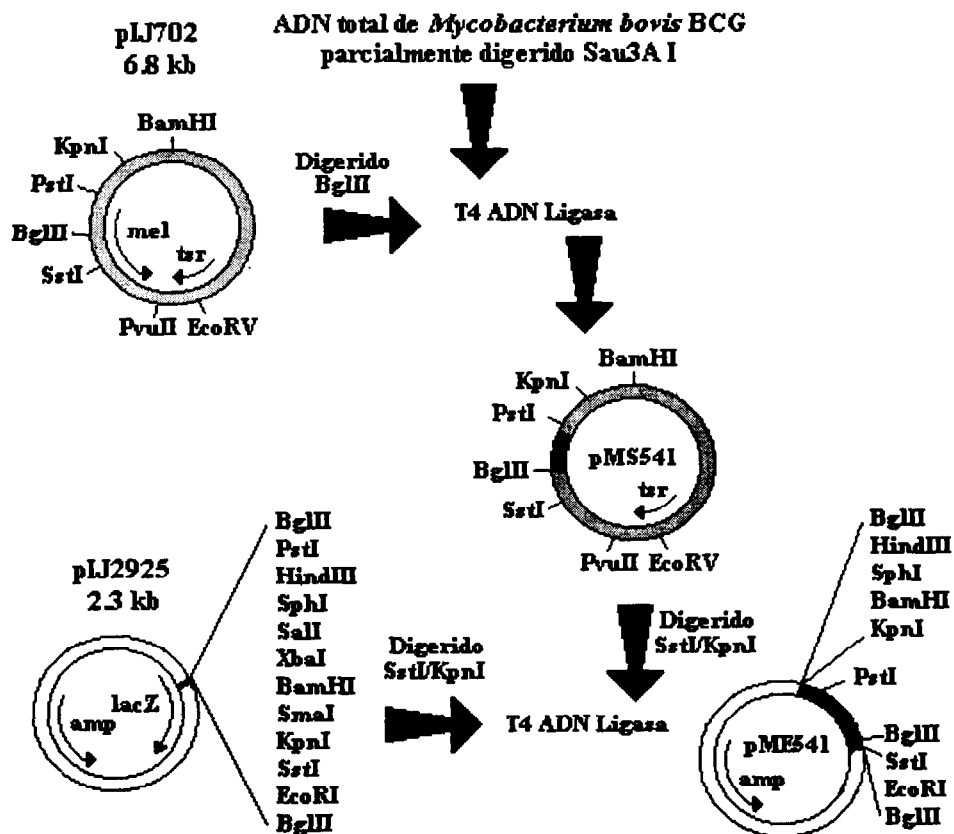


Fig. 1. Representación esquemática de digestiones y ligamientos realizados para la obtención del pMS541 y pME541.

Hibridización de "Southern blot"

Para comprobar si el fragmento activador provenía de *M. bovis* BCG, se realizó una hibridación de "Southern blot". Para esto, se utilizó como sonda al pME541, marcado con digoxigenina y se corrieron los ADN cromosomales digeridos con BamHI siguientes: *S. lividans* TK21, *S. coelicolor* ATCC 10147, *S. clavurigerus*, *M. smegmatis*, *M. fortuitum*, *M. bovis* BCG, *S. resistomyces* y como control positivo el pMS541. Se usó el pME541 como sonda para evitar una hibridación debida al vector, ya que los vectores de *E. coli* no presentan homología con ADN de *Actinomycetales*. Con la sonda, se obtuvieron dos señales: una, pertenecía al control positivo y la otra, al ADN correspondiente al *M. bovis* BCG con lo cual, se corroboró el origen del fragmento.

Determinación cuantitativa del efecto activador

Se determinó la actinorrodina en transformantes de *S. coelicolor* ATCC 10147 y *S. lividans* TK54 con el pMS541. Se usaron como controles las cepas salvajes respectivas (Fig. 2 y 3). No se estudió la producción de antibióticos en transformantes de estas cepas con el vector pLJ702, porque la producción de melanina impide la determinación colorimétrica de la actinorrodina. Los resultados confirmaron lo apreciado cualitativamente en medio sólido y pueden emplearse como un índice comparativo en la evaluación del efecto activador de otras secuencias en relación con la estudiada.

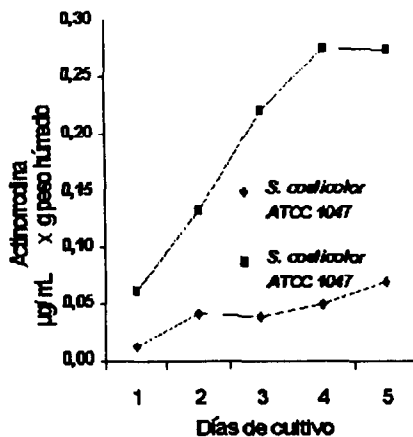


Fig. 2. Producción de actinorrodina en medio líquido por *S. coelicolor* ATCC 10147 y *S. coelicolor* con pMS541.

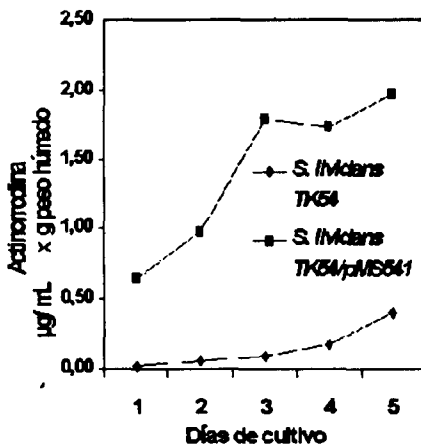


Fig. 3. Producción de actinorrodina en medio líquido por *S. lividans* TK54 y *S. lividans* TK54 con pMS541.

Transformaciones con el pMS541 de cepas de *S. coelicolor* mutadas en genes reguladores

Se transformaron con pMS541 protoplastos de *S. coelicolor* JF1, cepa que tiene mutados los genes *redD* y *actII-ORF4*, los cuales constituyen los reguladores específicos de la transcripción de los genes estructurales para la undecilprodigiosina y actinorrodina respectivamente. Se obtuvieron transformantes similares a la cepa no transformada con fenotipo no productor. A seis de estos transformantes, se les realizó el aislamiento de plasmidios y por un análisis de restricción se comprobó, que en efecto pertenecían al pMS541. De aquí se infirió que el fragmento clonado no es capaz de complementar el defecto provocado por la falta de los genes *redD* y *actII-ORF4* en este mutante, por lo que debe actuar sobre ellos o en un nivel superior de regulación.

Cuando se transformaron los protoplastos de *S. coelicolor* J1703, cepa con mutación en el gen *bldA*, el que regula conjuntamente la producción de antibióticos y la formación del micelio aéreo, no se observó recuperación ni del micelio aéreo, ni de la producción de la actinorrodina, pero sí de la undecilprodigiosina (Fig. 4). Se comprobó que los transformantes contenían al pMS541.

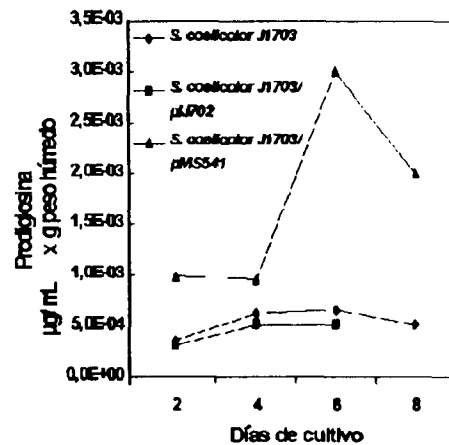


Fig. 4. Producción de undecilprodigiosina en medio líquido por *S. coelicolor* J1703, *S. coelicolor* J1703 con pLJ702 y con pMS541.

Al no ocurrir la activación de la producción de la actinorrodina en ninguno de los transformantes de las cepas mutadas, se dedujo que el fragmento clonado requiere los productos de los genes *bldA* (un ARN_t para un codón raro en *Streptomyces* que codifica para la leucina) y *actII-ORF4* para ejercer su efecto activador en la cepa salvaje. Para el caso de la undecilprodigiosina por el contrario, es otro el mecanismo, ya que en los transformantes de *S. coelicolor* J1703 se activó su biosíntesis, resultado paradójico porque en las cepas salvajes en ningún caso se observó la activación de este antibiótico.

Para intentar explicar estos resultados se formuló la hipótesis siguiente: La secuencia clonada podría actuar en un nivel intermedio entre el gen *bldA* y *actII-ORF4* y *redD*, ya que se requiere que estos dos últimos sean funcionales para activar la biosíntesis de la actinorrodina (en la cepa salvaje) y prodigiosina (en la cepa *bldA*) respectivamente, hecho este confirmado por los resultados de la transformación con el fragmento en la cepa JF1.

Asumiendo que *bldA* regula *redD* a través de un gen "x", no caracterizado aún y cuya existencia ha sido sugerida por otros autores,²⁵ el producto de "x" podría constituir un factor de transcripción de *redD*, dependiente del producto de *bldA*

para ser traducido, que en un mutante de dicho gen no es expresado y por lo tanto, no se transcribe *redD* y no se produce la undecilprodigiosina.

Un modelo simple propondría que la secuencia clonada codificara para un factor de transcripción que sea utilizable por *actII-ORF4*, lo que explicaría la activación de la producción de la actinorrodina a través de un incremento en la transcripción de *actII-ORF4*, factor que también activa la expresión por *redD*, pero de forma menos efectiva que el producto del

gen "x". Esto último, explicaría el mantenimiento del nivel basal de la síntesis de la undecilprodigiosina en la cepa salvaje (el efecto de la secuencia clonada es enmascarado por la actividad del gen nativo "x") mientras que el incremento de la producción en un mutante *bldA* se debería a la actividad del producto de la secuencia clonada; que si bien es menos afín a *redD*, cuando puede ejercer su efecto sobre este (en ausencia del producto del gen "x"), restaura parcialmente la producción de undecilprodigiosina (Fig. 5).

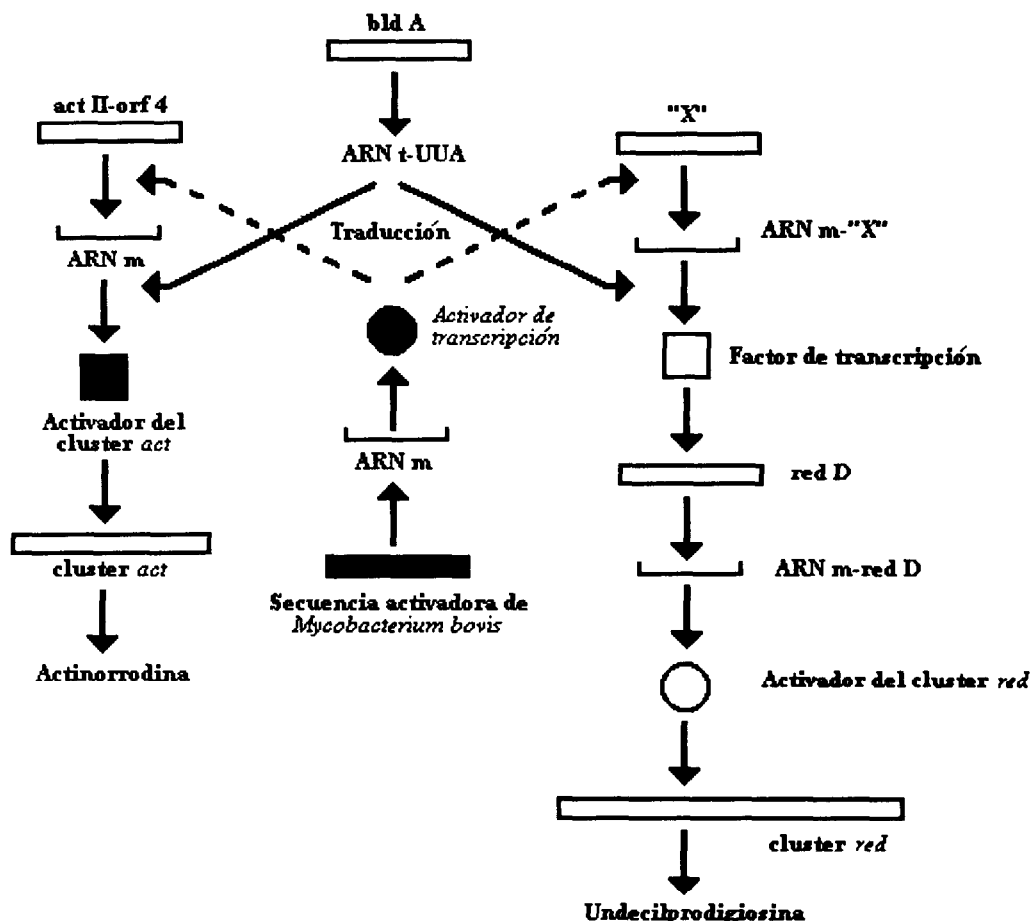


Fig. 5. Hipótesis sobre el funcionamiento de la secuencia clonada proveniente de *M. bovis* BCG.

CONCLUSIONES

Existe una secuencia de ADN de *M. bovis* BCG, capaz de activar la biosíntesis de metabolitos secundarios en *Streptomyces*, mostrando un carácter pleitrópico de regulación. Además, para ejercer su efecto activador sobre la biosíntesis de la actinorrodina, requiere que los genes *actII-ORF4* y *bldA* sean funcionales, por el contrario para activar la de la undecilprodigiosina no necesita de *bldA*, pero sí de *redD*.

BIBLIOGRAFIA

- Chater K. Microbial Development. Ed. Losick R. y Shapiro, L. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, 89-115, 1984.
- Hopwood D. Proc. R. Soc. London B. Biol. Sci., 235, 121, 1988.
- Chater K. Secondary metabolites: their function and evolution, Ciba Foundation Symposium 171. Ed. Chadwick, D.J. and Whelan, J. Chichester. Wiley & Sons, 144-156, 1992.
- Brockman H., Zeeck A., Van der Merve K. and Muller W. Justus Liebig's Annln Chem., 698, 3575, 1966.5.
- Tsao S., Rudd B., He X., Chang C. and Floss H. J. Antibiot., 38, 128, 1985.
- Chater K and Bruton C. Eur. Mol. Biol. Organ. (EMBO), 4, 1893, 1985.
- Chater K. and Hopwood D. Genetics of bacterial diversity. Ed. Hopwood D. and Chater K. Academic Press, London, 129-150, 1989.
- Narva K. and Feitelson J. J. Bacteriol., 172, 326, 1990.
- Fernández-Moreno M., Caballero J., Hopwood D. and Malpartida F. Cell, 66, 769, 1991.
- Horinouchi S., Hara O. and Beppu T. J. Bacteriol., 155, 1238, 1983.
- Adamidis T. and Champness W. J. Bacteriol., 174, 4622, 1992.
- Champness W. J. Bacteriol., 170, 1168, 1988.
- Hopwood D., Keiser T., Wright H. y Bibb M. J. Gen. Microbiol., 129, 2257, 1983.
- Katz E., Thompson C. and Hopwood D. J. Gen. Microbiol., 129, 2703, 1983.
- Feitelson J. and Hopwood D. Mol. Gen. Genet., 190, 394, 1983.
- Lawlor E., Baylis H. and Chater K. Genes Dev., 1, 1305, 1987.

17. Yanisch-Perron C., Vieira J. and Messing J. **Gene**, **33**, 103, 1985.
 18. Niebla A., González I., González L., Montes N. y Vallín C. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, **45**, 20, 1994.
 19. Snapper S., Milton R., Mustafa S., Kieser T. and Jacobs W. **Mol. Microbiol.**, **4**, 1911, 1990.
 20. Hopwood D., Bibb M., Chater K., Kieser T., Bruton C., Kieser H., Lydiate D., Smith C., Ward J. and Schrempf H. Genetic manipulation of *Streptomyces*: a laboratory manual. Norwich: John Innes Foundation. U. K, 1985.
 21. Maniatis T., Fritsch E. and Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982.
 22. Kieser T., Moss M., Dale J. and Hopwood D. **J. Bacteriol.**, **168**, 72, 1986.
 23. Ausubel F., Brent R., Kingston R., Moore D., Seidman G. and Struhl K. Current Protocols in Molecular Biology, 1992.
 24. Carbó L., Gómez C., Del Sol R., Vallín C. and Benítez J. **Biotech. Letters**, **17**, 351, 1995.
 25. Guthrie E. y Chater K. **J. Bacteriol.**, **172**, 6189, 1990.
-