
Expresión de genes de *Streptomyces* en hongos filamentosos

C. Patiño, S. Morales, Y. Jean-Mairet, C. del Moral y V. Rubio

Centro Nacional de Biotecnología.

Introducción

Actualmente se considera a los hongos filamentosos microorganismos de gran valor potencial como alternativa para expresar por ingeniería genética genes heterólogos, especialmente genes de mamífero de interés médico-farmacéutico.

Comparativamente con otros sistemas eucariotas, como células de mamífero, de plantas o de insectos en cultivo, o bien animales o plantas transgénicas, los hongos filamentosos poseen ciertas ventajas, entre ellas su economía y su enorme capacidad secretora, que facilita los procedimientos de purificación, así como la experiencia existente en fermentación y procedimientos de purificación.

La capacidad secretora mencionada, muy superior en términos generales a la de las levaduras, ofrece una ventaja potencial de los hongos filamentosos sobre *Saccharomyces cerevisiae*, organismo modelo en eucariotas inferiores, porque por lo que se conoce hasta el momento, el plegamiento funcional y la glicosilación ligados al proceso de secreción es, en hongos filamentosos, más parecido a lo que ocurre en células de mamífero que en *Saccharomyces*¹.

Por otra parte, la presencia y procesamiento de intrones en hongos parece más próxima a eucariotas superiores que en levadura y definitivamente ofrecen una ventaja sobre sistemas procarióticos alternativos.

Junto con estos hechos, desde el punto de vista de su utilización en el laboratorio, contamos con unos 30 años de experiencia en genética clásica en sistemas modelo de hongos (*Aspergillus nidulans* y *Neurospora crassa*), así como con el desarrollo reciente de sistemas de transformación y manipulación genética para unos 20 géneros diferentes que comprenden hongos de interés industrial, agroalimentario o patógenos de animales y plantas.

Finalmente, queremos señalar que muchas especies son comestibles o se han utilizado en

la industria de la alimentación desde la antigüedad, o modernamente en la industria farmacéutica, lo que simplifica los requisitos que deben ser demostrados para su aplicación como microorganismos productores de proteínas heterólogas por manipulación genética.

La posibilidad de usar los hongos filamentosos para la expresión heteróloga supone el previo desarrollo del conocimiento de los pasos limitantes en el procesamiento de la información genética. Bajo este enfoque elegiremos como sistema modelo la expresión de genes de *Streptomyces* relacionados con la biosíntesis de actinorhodina por varias razones. En primer lugar, este antibiótico no se produce en el hongo que hemos elegido para los experimentos iniciales (*Penicillium chrysogenum*). Por otra parte, los genes que codifican para la biosíntesis de actinorhodina en *Streptomyces coelicolor* están físicamente agrupados en el cromosoma en un segmento de 20 kb aproximadamente² y la caracterización molecular de todos los genes que intervienen en el proceso de biosíntesis se encuentra muy avanzada y en la actualidad se está trabajando de manera muy activa en ella^{3,4}. Como enfoque inicial elegimos los genes *act I* y *act III* que codifican respectivamente para la sintetasa y deshidrogenasa de la biosíntesis de actinorhodina y que fueron insertados en *Penicillium chrysogenum* mediante el uso de un vector conocido⁵.

Material y métodos

Cepas y medios

Los plásmidos se propagan en *E. coli* K12, cepa DH1, *P. chrysogenum* auxótrofo para triptófano que se utilizó en los experimentos de transformación y fue obtenido en nuestro laboratorio.

El medio mínimo usado es el descrito por Anné y Peberdy⁶. El medio de regeneración es

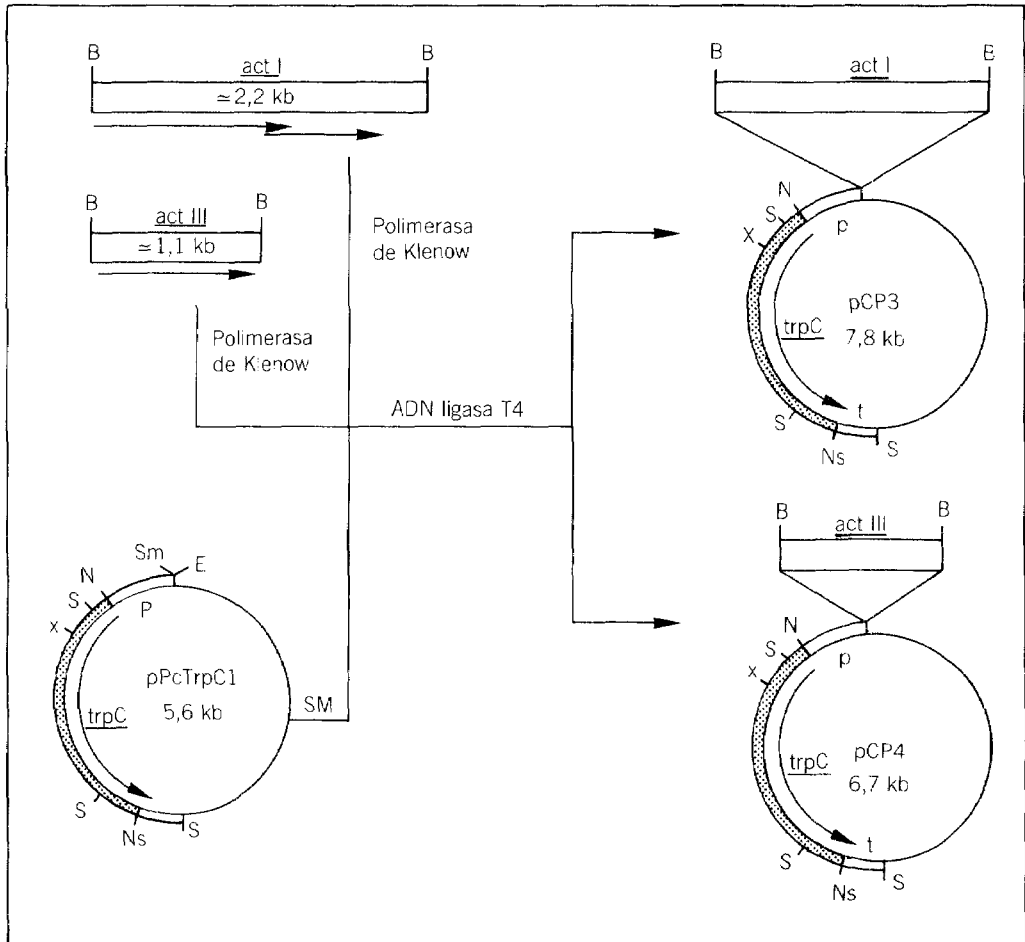


Fig. 1. Inserción de los fragmentos de extremos BamHI conteniendo los genes *act I* y *act III* de *Streptomyces coelicolor*³ en el vector pPcTrpC1 de *Penicillium chrysogenum*⁴. Los extremos cohesivos BamHI de los fragmentos de *Streptomyces* fueron convertidos en romos rellenando con Pol IK (Klenow) y se efectuó la reacción de enlace a extremos romos¹¹ con ADN ligasa del fago T4 en el sitio SmaI del vector. Los plásmidos obtenidos pCP3 y pCP4 contienen respectivamente *act I* y *act III*.

medio mínimo suplementado con 1.2 M KC1. El medio semidefinido es el medio mínimo de Pontecorvo et al⁷ suplementado con extracto de levadura y casaminocidos al 0,5 %. El medio sólido contiene agar al 2 %.

Métodos para ADN

Las enzimas se obtuvieron de Amersham, Boehringer y New England Biolabs y se usaron de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.

Los plásmidos de *E. coli* se aislaron según el método descrito por Birnboim y Doly⁸. Los análisis de Southern y las condiciones de hibridación, así como la preparación de ADN se efectuaron tal y como se ha descrito previamente^{9,10}. El marcaje de las sondas se realizó usando el Multiprime DNA labelling system (Amersham) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para llevar a cabo la transformación de *Penicillium chrysogenum* se utilizó el método de Sánchez et al⁵.

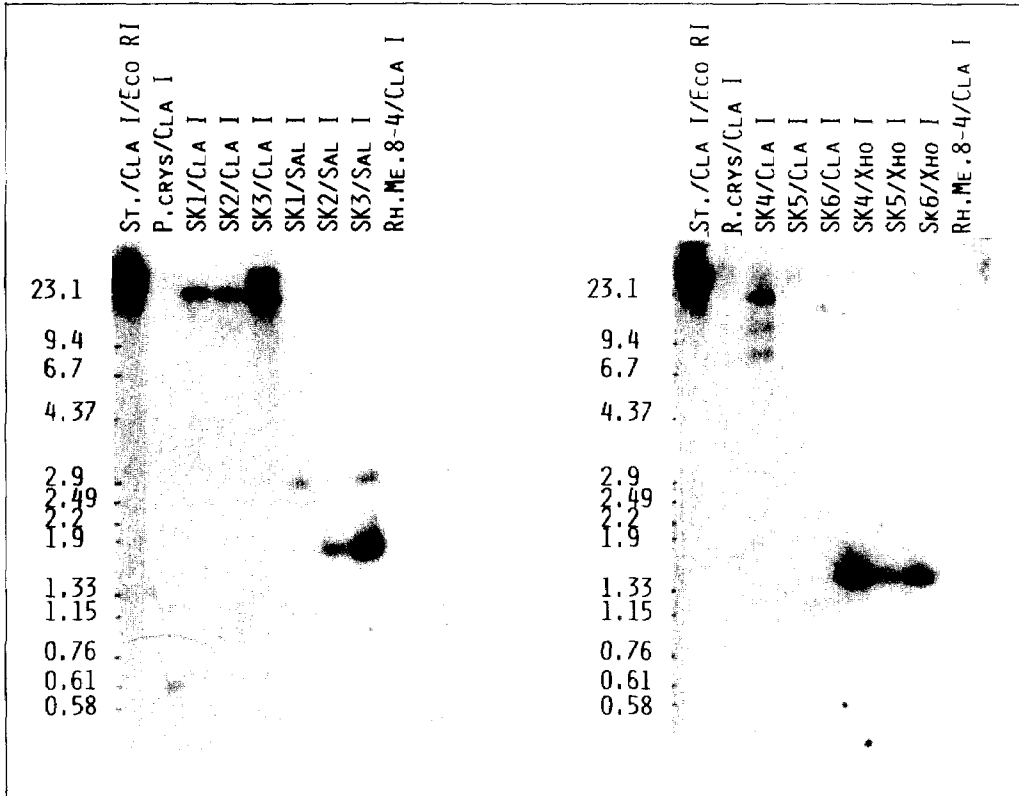


Fig. 2. Análisis por el método de Southern de la presencia de *act I* y *act III* en los transformantes de *Penicillium chrysogenum*. Los dos primeros canales son ADN de *Streptomyces* y de *Penicillium*, respectivamente. SK1 a SK3 son transformantes que contienen el gen *act I* y SK4 a SK6 transformantes conteniendo el gen *act III*. El último canal es el control negativo con ADN de *Rhizoctonia solani*. Las enzimas usadas para digerir el ADN genómico están especificadas en cada canal. Los marcadores de peso molecular estándar están expresados en kb en el margen izquierdo. Se han utilizado como sondas los fragmentos BamHI marcados. La sonda del panel de la izquierda contiene *act I* y la de la derecha *act III*.

Resultados y discusión

Inserción de los fragmentos de ADN conteniendo *act I* y *act III* en el vector de *Penicillium*

Dentro del agrupamiento de genes que codifican para las enzimas de biosíntesis de actinorhodina, hay dos fragmentos con extremos BamHI que contienen uno el gen *act I* (fragmento de un tamaño de 2,2 kb) y otro el gen *act III* (1,1 kb). Dichos fragmentos contienen los genes estructurales y las señales de promotor y terminador para cada gen. Antes de pensar en cambios de promotores, decidimos probar si los genes de *Streptomyces* se expresan con

sus señales propias en hongos. La estrategia de inserción de los fragmentos en un plásmido pPctrp C1 de 5,6 kb⁵ consistió en rellenar los extremos de los fragmentos BamHI con PolIk (Klenow) y enlazar los extremos romos en el sitio SmaI del vector¹¹. En ambos casos se obtuvieron clones en las dos orientaciones, sin que la posición relativa afectase la estabilidad del ADN en los transformantes.

Tanto el fragmento que contiene *act I* como el que contiene *act III* no hibridan con el ADN de *Penicillium* sin transformar en condiciones de baja astringencia (resultados no publicados).

Los plásmidos obtenidos pCP3 y pCP4 (fig. 1) que contienen *act I* y *act III*, respectivamente se utilizaron para transformar *Penicillium chrysogenum*.

Transformación de *P. chrysogenum* con pCP3 y pCP4 y análisis de los transformantes

Una vez comprobado que no existía homología entre el ADN de *Penicillium chrysogenum* y los fragmentos BamHI que contienen act I y act III, se marcaron como sondas dichos fragmentos, tal y como se indica en el apartado «Material y métodos», y se analizaron tres transformantes de cada una de las construcciones. El ADN genómico de los transformantes se dirigió en el caso de transformantes con act I (pCP3) con las enzimas ClaI y Sall y el de los transformantes con act III (pCP4) con ClaI y XhoI (fig. 2).

Los resultados obtenidos indican que el ADN de *Streptomyces* se mantiene en los transformantes de *Penicillium* de una forma estable. Esporas de los transformantes siguen conteniendo el ADN de *Streptomyces* después de varios ciclos de crecimiento y esporulación.

Los transformantes SK1 y SK2 parecen muy similares y sugieren que ha habido un único sitio de integración, mientras que SK3 parece que contiene un mayor número de copias y dos sitios de integración (análisis con ClaI, que no corta el plásmido pCP3). El análisis de los transformantes con act III parece indicar que SK4 tiene mayor número de copias y de sitios de integración que SK5 y SK6 (análisis con ClaI).

En el extremo izquierdo de los dos filtros (fig. 2) se encuentra el ADN de *Streptomyces coelicolor* A3² control positivo y *Penicillium chrysogenum* sin transformar, control negativo; la banda que se observa a 0,61 kb en el panel de la izquierda es posiblemente artefactual dado que en experimentos previos el ADN de act I no hibrida con el ADN de *Penicillium*. En el margen derecho se observa el control negativo con un hongo no relacionado, *Rhizoctonia solani*, aislado de melón en Almería.

Conclusiones

De los resultados expuestos podemos concluir que el ADN de *Streptomyces* que contiene los genes act I y act III se mantiene establemente en *Penicillium chrysogenum* integrado en el genoma del hongo con el vector usado para transformarlo.

Actualmente estamos aislando ADN de los transformantes con el fin de saber si el ADN de *Streptomyces* se está transcribiendo. En caso de que no se transcriba trataremos de cambiar las señales reguladoras procarióticas a señales

de *Penicillium* y si estos genes se transcriben trataremos de clonar todo el conjunto de genes que codifican para la biosíntesis de actinorrodina y el gen regulador afs B de *Streptomyces*⁴. Actualmente se está trabajando en la obtención de anticuerpos contra cada uno de los productos de los genes de biosíntesis que nos pueden permitir en el futuro detectar su aparición en hongos, y saber si estos genes pueden sintetizar el antibiótico cuando dispongamos de transformantes con todos los genes implicados en su biosíntesis.

Agradecimiento

Este trabajo está subvencionado dentro del Biotechnology Action Program (BAP) de la Comunidad Europea, Grant 388E (JR). Agradecemos a Susana Ayerdi el trabajo mecanografiado, y a Flora Sánchez la lectura crítica del manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA

1. Salovuori J, Makarow M, Rauvala H, Knowles J, Kääriäinen L. Low molecular weight high-mannose types glycans in a secreted protein of the filamentous fungi *Trichoderma reesei*. *Biotechnology* 1987; 5: 152-156.
2. Malpartida F, Hopwood DA. Molecular cloning of the whole biosynthetic pathway of a *Streptomyces* antibiotic and its expression in a heterologous host. *Nature* 1984; 309: 462-464.
3. Hallam SE, Malpartida F, Hopwood DA. Nucleotide sequence, transcription and deduced function of a gene involved in polyketide antibiotic synthesis in *Streptomyces coelicolor*. *Gene* 1988; 74: 305-320.
4. Horinouchi S, Malpartida F, Hopwood DA, Beppu T. afs B stimulates transcription of the actinorhodin biosynthetic pathway in *Streptomyces coelicolor* A3² and *Streptomyces lividans*. *Mol Genet* 1989; 215: 355-357.
5. Sánchez F, Lozano M, Rubio V, Peñalva MA. Transformation in *Penicillium chrysogenum*. *Gene* 1987; 51: 97-102.
6. Anné J, Peberdy JF. Induced fusion of fungal protoplasts following treatment with polyethylene glycol. *J Gen Microbiol* 1976; 92: 413-417.
7. Pontecorvo G, Roper JA, Hemmons DW, MacDonald KD, Bugton AW. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet* 1953; 5: 141-238.
8. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979; 7: 1.513-1.523.
9. Sánchez F, Touriño A, Traseira S, Pérez-Aranda A, Rubio V, Peñalva MA. Molecular cloning and characterization of the trp C gene from *Penicillium chrysogenum*. *Mol Gen Genet* 1986; 205: 248-252.

10. Carramolino L, Lozano M, Pérez-Aranda A, Rubio V, Sánchez F. Transformation of *Penicillium chrysogenum* to sulfonamide resistance. *Gene* 1989; 77: 31-38.
11. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York, Cold Spring Harbor, 1982.

DISCUSIÓN

- J. ORTÍN: Quisiera preguntarle si existen ejemplos en la literatura donde se compare la expresión de un gen particular cualquiera en sistemas de expresión heteróloga más establecidos como pueden ser *E. coli*, levaduras, o incluso células de mamífero en cultivo y en hongos filamentosos. ¿Hasta qué punto las ventajas de la fermentación, que son obvias, van acompañadas de una expresión en cantidad razonable?
- V. RUBIO: Se han publicado 6 o 7 artículos, relativos básicamente a la renina, tanto humana como de vaca, el interferón y una interleuquina. En uno de estos trabajos, en el que se evaluó la glicosilación, parece que los hongos se comparan favorablemente con las levaduras sobre la base del estudio estructural de los azúcares.
- Por otra parte, la interleuquina aparentemente no se glicosila y, en cuanto al rendimiento, la experiencia demuestra que *Aspergillus nidulans* es peor secretor que *orizae*. *Aspergillus orizae* es un gran secretor y, sin embargo, los niveles de secreción de interleuquina son del orden de mil veces inferiores a los obtenidos con levaduras. Se han realizado experimentos de reconstitución que incorporan interleuquina al medio y parece que ésta se degrada proteolíticamente, ya que de forma concomitante con la interleuquina se segregan diversas proteasas. Actualmente se están desarrollando mutantes proteasa negativos, pero esto se encuentra todavía en fase de investigación.
- Este fenómeno podría tener muchísimas ventajas, ya que si la glicosilación fuera parecida a la que tiene lugar en los mamíferos podría obtenerse a un coste muy reducido. Además, parece que ofrece alguna ventaja con respecto a levaduras, pero todo ello se encuentra en una fase muy preliminar. Hay cuatro compañías de ingeniería genética que trabajan exclusivamente en comparaciones entre levaduras y hongos.
- F. MURILLO: En otro contexto, la experiencia en el caso de *Bacillus* demuestra que desde el punto de vista de rendimiento biotecnológico, de sistemas basados en productos que se exportan, las limitaciones no se derivan en muchos casos de las manipulaciones endógenas, sino del propio sistema de secreción.
- V. RUBIO: Por ejemplo, utilizando genes endógenos y con el sistema de secreción de la glucoamilasa parece que los problemas a nivel de degradación son distintos de los que se plantean con genes de otras procedencias. Particularmente opino que la situación es muy distinta para cada proteína.
- S. ERILL: Quisiera preguntar si se han utilizado estos hongos filamentosos para la producción de proteínas de bacterias, es decir, proteínas antigénicas, para ser utilizadas como vacunas. Evidentemente, cabe la posibilidad de utilizar la bacteria directamente, tratarla y emplearla al completo. Pero quizás sería más preciso y a lo mejor tendría algunas ventajas, utilizar directamente los componentes antigénicos de las bacterias obtenidos a partir de estos hongos filamentosos.
- V. RUBIO: Que yo sepa, no hay ningún trabajo realizado en ese sentido, pero es una posibilidad.