Clonación y manipulación de genes carotenogénicos bacterianos

F.J. Murillo Araujo

Departamento de Genética y Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de Murcia.

Introducción

Los carotenoides son, sin duda, los pigmentos más extendidos de la naturaleza. Se presentan en todos los organismos fotosintéticos y dan su color característico a muchas bacterias y hongos no fotosintéticos[1]. Esta distribución tan amplia podría justificarse por alguna ventaja evolutiva de carácter general, quizás relacionada con la defensa contra los daños provocados por la radiación luminosa.

La protección contra los efectos nocivos de la luz no se debe a la absorción propia de los carotenoides, aunque no pueda descartarse un cierto efecto de pantalla. Los datos más contrastados indican que el efecto protector se debe a la desactivación por los carotenoides del oxígeno singlete y otros radicales que se originan cuando el oxígeno molecular, u otros compuestos fotoactivables, absorben un cuanto de radiación. Dichos radicales reaccionan activamente con ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, y resultan muy tóxicos para la célula. En plantas superiores, la ausencia de carotenoides resulta incluso letal por la incapacidad de inactivar el oxígeno singlete y ciertos derivados fotooxidados de la clorofila.

Otras funciones naturales de los carotenoides en bacterias, hongos y plantas, se relacionan con el desarrollo, la reproducción o la dispersión de estos organismos. Los animales son incapaces de sintetizar carotenoides y deben incluirlos en su dieta, como fuente de vitamina A. El hombre hace uso artificial de ellos, por ejemplo como colorantes en alimentación, y en cosmética. Recientemente se ha establecido que ciertos carotenos actúan como anticancerígenos[2-4].

Biosíntesis de los carotenoides

Los carotenoides son tetraterpenos (C_{40}) que se producen a través de la ruta clásica de los isoprenoides, de la que depende también la síntesis de los esteroles, las quinonas y otros terpenoides[5].

El primer precursor C_{40} de los carotenoides es el fitoeno, que tienen un máximo de absorción de luz ultravioleta alrededor de los 285 nm. El fitoeno sufre cuatro desaturaciones sucesivas que generan nuevos enlaces dobles conjugados y desplazan el máximo de absorción a la zona visible del espectro. El producto final de estas reacciones, catalizadas probablemente por una misma enzima, es el licopeno, cuyo máximo de absorcion se sitúa en 475 nm (fig. 1).

Una molécula lineal, como el licopeno, constituye la estructura básica de los carotenoides finales de algunas bacterias. Es el caso de *Rhodobacter*, en el que aparecen además modificaciones por adición de un grupo metoxilo a un extremo de la molécula y la presencia de grupos hidroxilo o carbonilo, también en los extremos. En algunas mixobacterias, sujeto de nuestro estudio, la estructura básica es la del gammacaroteno, que resulta de la ciclación de un extremo de la molécula lineal (en otras bacterias, hongos y plantas, aparecen carotenoides con un anillo en cada extremo de la molécula). En *Myxococcus*, el género mejor conocido de las mixobacterias, los carotenos están glucosilados y esterificados, y pueden contener un grupo carbonilo en el extremo ciclado de la molécula (fig. 1).

Genética de la carotenogénesis en *Myxoccocus xanthus*

En *M. xanthus*, la producción de carotenoides depende estrictamente de iluminación con luz azul y ocurre preferentemente en fase de crecimiento estacionaria. Las colonias silvestres, de color amarillo en la obscuridad (debido a un pigmento no carotenoide) se tornan de color rojo en la luz por la acumulación de los carotenoides. Este cambio de coloración facilita el aislamiento de mutantes en la respuesta a la luz. Además, disponemos de sofisticadas técnicas de manipulación genética *in vivo* e *in vitro* en *M. xanthus*, debido sobre todo al interés que despierta su conducta social, excepcional en-

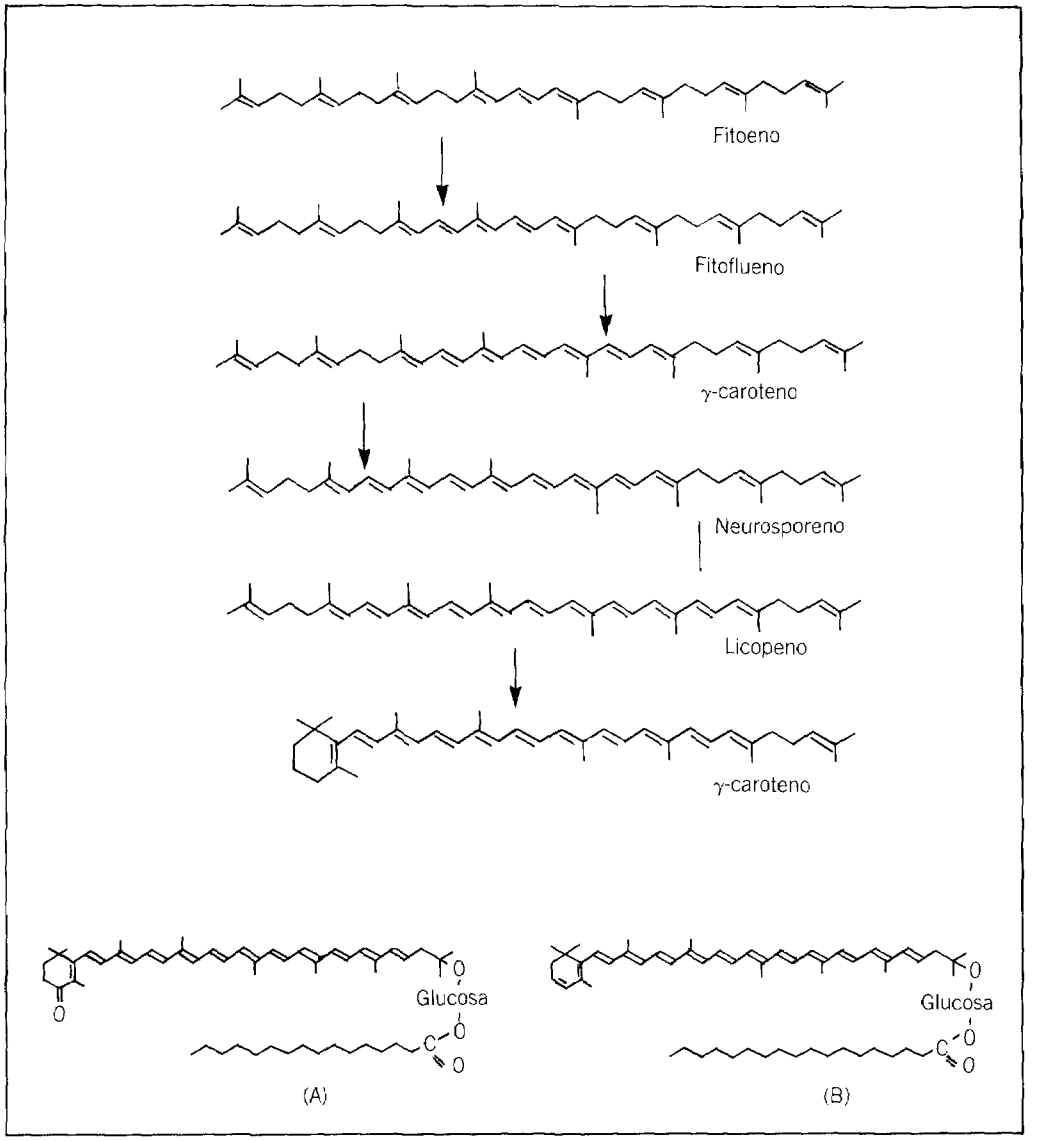

Fig. 1. Ruta probable de biosíntesis del gamma-caroteno, constituyente básico del palmitato de mixobacton (A) y del estearato de mixobactina (B), carotenoides mayoritarios del género Myxococcus.

tre los procariotas[6]. *M. xanthus* resulta así un organismo muy conveniente para entender la base genética y molecular de la respuesta a la luz azul, y para el estudio y manipulación de los genes carotenogénicos.

Nuestro grupo de investigación en Murcia ha aislado y estudiado numerosos mutantes de *M. xanthus* afectados en la carotenogénesis que, en su gran mayoría, se incluyen en dos clases fenotípicas. La primera está formada por mutantes que producen colonias rojas tanto en presencia como en ausencia de luz y que, por tanto, acumulan carotenoides con independencia del estímulo externo (fenotipo constitutivo o Car^C). La otra clase de mutantes producen colonias cuyo color no se modifica por la ilumina-

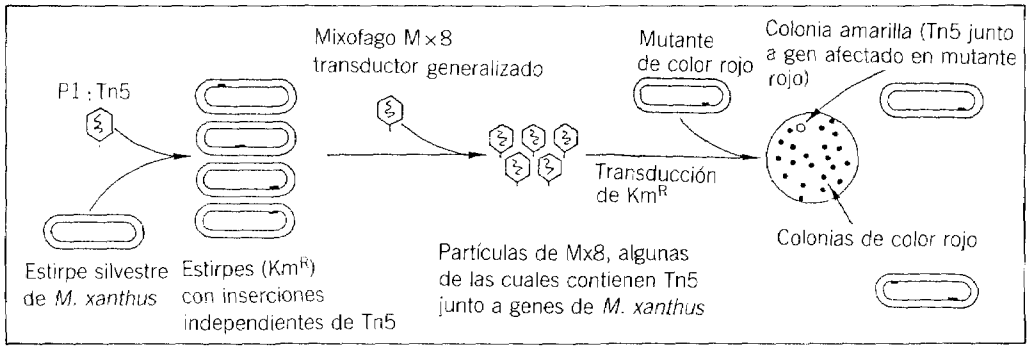

Fig. 2. Aislamiento de una estirpe con Tn5 junto a un gen car. El fago P1:: Tn5, que inyecta su ADN pero no se reproduce en M. xanthus, se utiliza para generar una colección de inserciones independientes de Tn5. Esta colección se emplea para transferir el carácter KmR, con ayuda de un fago transductor, a un mutante car (CarR en este caso). La mayoría de las colonias KmR mantienen el fenotipo CarR, pero unas pocas mostrarán fenotipo silvestre, si las células originarias recibieron el alelo normal del gen car mutado, por cotransducción con una inserción de Tn5 ligada a dicho gen. Ahora es posible, por transducción de KmR, obtener una estirpe que lleva Tn5 junto al alelo car mutante, transferir dicha mutación a otras estirpes, o reconocer si otras mutaciones car se encuentran o no en el mismo locus.

ción y que, por tanto, son incapaces de sintetizar carotenoides o alguno de sus precursores coloreados (fenotipo Car⁻).

En *M. xanthus*, la cartografía genética puede realizarse mediante fagos transductores específicos. La frecuencia de transducción de un marcador concreto, del orden de 10^{-4} en el mejor de los casos, no permite, sin embargo, el análisis de mutaciones no seleccionables, como es el caso de las mutaciones car. Esta dificultad puede soslayarse con la presencia de un marcador seleccionable junto al *locus* mutado. El transposón Tn5 es muy útil para este propósito, ya que se inserta aleatoriamente en el cromosoma de *M. xanthus* y confiere resistencia al antibiótico kanamicina. En la figura 2 se ilustra el método empleado para aislar estirpes con Tn5 junto a una mutación car determinada. Estas estirpes sirven tanto para localizar diferentes mutaciones car como para obtener dobles mutantes en los que analizar interacciones génicas.

Otros transposones derivados de Tn5, de gran utilidad en nuestro análisis, son Tn5-132 y Tn5 lac. Tn5-132 posee las secuencias IS50 de los extremos de Tn5, pero lleva un gen de resistencia a tetraciclina (Tc^R) en lugar del gen Km^R. Tn5-132 puede utilizarse en lugar de Tn5 en el protocolo de la figura 2. Por otro lado, si se introduce en una estirpe que ya es portadora de Tn5, el mecanismo de recombinación del huésped actúa sobre las zonas homólogas de ambos transposones y produce la substitución *in situ* de Tn5 por Tn5-132. Esta substitución, que genera una colonia Tc^R y sensible a Km, se produce con una frecuencia mayor en dos órdenes de magnitud que la del «salto» de Tn5-132 que, en todo caso, generaría una colonia Km^R Tc^R.

Tn5 lac contiene, muy cerca de un extremo, el gen lacZ de *E. coli* sin su promotor. Aunque con una frecuencia menor que Tn5, Tn5 lac se inserta también en el cromosoma de *M. xanthus*. Si lo hace junto a un promotor, y en la dirección correcta, la expresión del gen lacZ y, por tanto, la producción de betagalactosidasa, queda conectada a dicho promotor. La comodidad con que se detecta y analiza dicha enzima facilita en gran medida los estudios sobre la actividad promotora y su control por genes reguladores, o la búsqueda de nuevas mutaciones que afecten al sistema.

Los transposones habilitan un método simple de clonación de genes situados junto a una inserción concreta. El método se basa en un plásmido vector que se replica en *E. coli* pero no en *M. xanthus* (fig. 3). El vector lleva una región que permite su empaquetamiento en el fago P1, para su transferencia a *M. xanthus*, y un segmento de Tn5 con el gen Km^R y parte de la IS50L. Ello facilita la integración del plásmido en el ADN celular, por recombinación homóloga con una de las IS50 de un transposón del huésped (Tc^R). Si empleamos ahora enzimas de restricción de corte único en el vector, obtendremos nuevos plásmidos que contienen una u otra de las regiones adyacentes a la inserción Tc^R. Estos plásmidos permiten el conocimien-

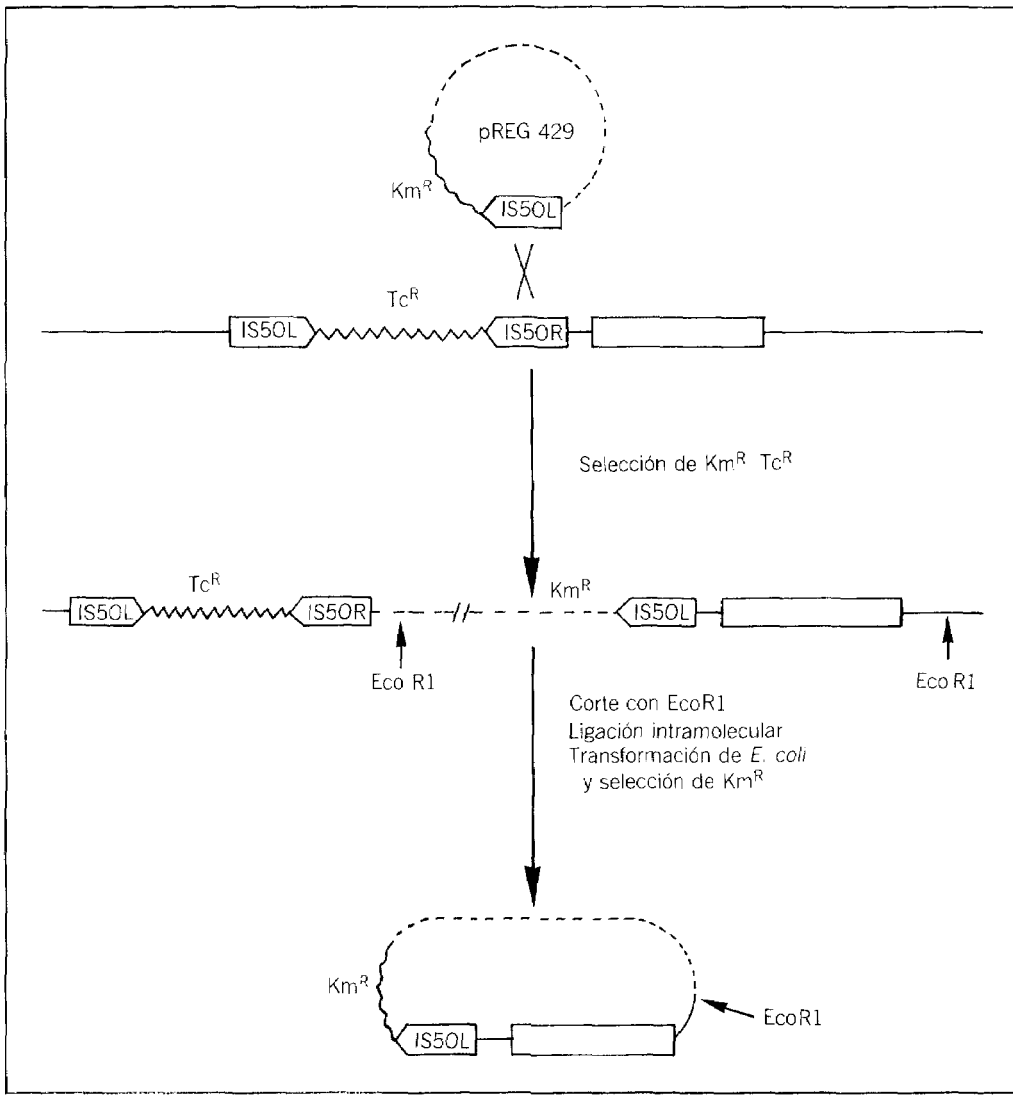

Fig. 3. Clonación in situ en M. xanthus. El plásmido pREG429 lleva parte de Tn5 y puede empaquetarse en el fago P1 para su transferencia a M. xanthus, donde no se replica. Transferido a una estirpe con Tn5-132 (Tc^R) junto a un gen car (recuadro blanco), se integra por recombinación homóloga y genera colonias Km^R Tc^R. Aislamiento ADN de estas colonias y tratándolo con una enzima de corte único en pREG429, puede aislarse un plásmido quimérico que contiene el gen car. En la figura, si la integración inicial de pREG429 se produce en la otra secuencia IS50, el plásmido quimérico contendría el ADN de M. xanthus situado al otro lado de la inserción de Tn5-132.

to de la organización y estructura de los genes de M. xanthus y facilitan además su mutagénesis dirigida, la construcción de merodiploides, o la introducción *in vivo*, en lugares predeterminados, de nuevas sondas de transcripción.

El regulón car

En la figura 4 se resumen nuestros estudios de localización, interacción y expresión de los genes car (7,8,9, resultados no publicados). Un primer *locus*, que incluye los genes carQ, carR

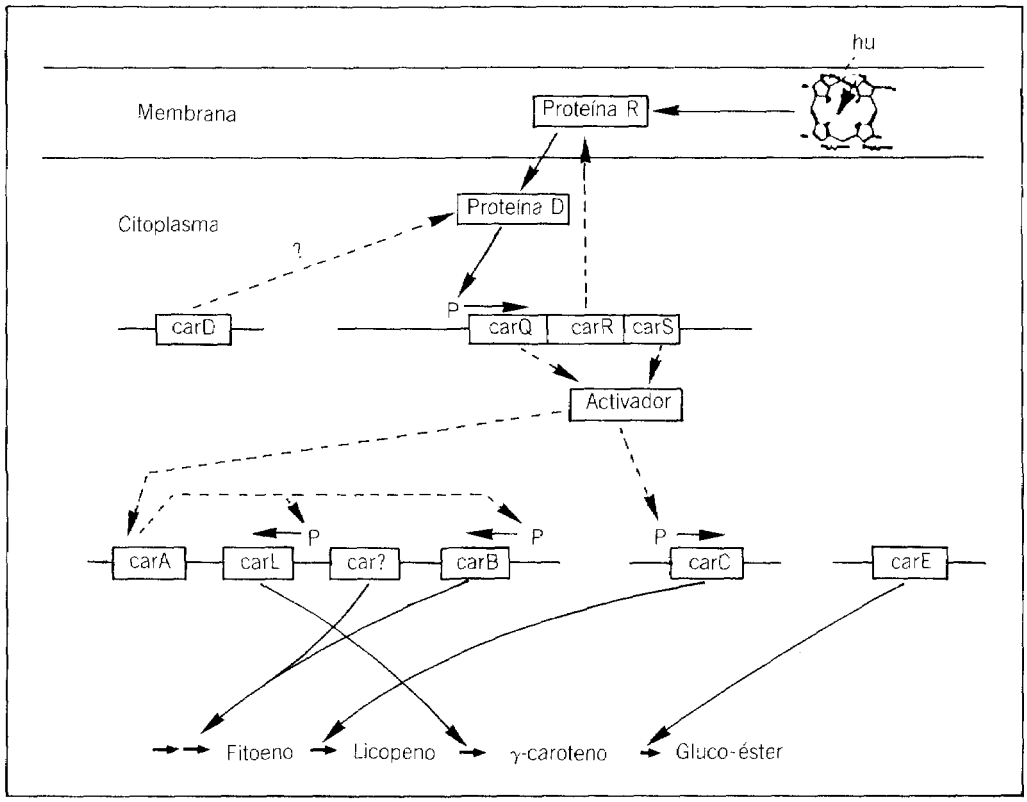

Fig. 4. Acción génica en la respuesta carotenogénica de M. xanthus a la luz azul. Las líneas discontinuas señalan el orden en que actuan los elementos de la cascada regulatoria, iniciada por la luz a través probablemente de la protoporfirina IX, según el espectro de acción correspondiente. La localización de la proteína carR en la membrana se ha inferido de la secuencia nucleotídica del gen (D.A. Hodgson, comunicación personal). Los genes carD y carE se han identificado recientemente. Desconocemos si la luz regula también la expresión de carE. La posición de carD en la cascada regulatoria se basa en datos iniciales (véase texto).

y carS, actúa como mediador de la respuesta a la luz. El gen carR se define por mutaciones que provocan fenotipo Car^{C}, habiéndose comprobado que dichas mutaciones hacen constitutiva la expresión de, al menos, otros dos *loci* independientes. Éstos, que determinan enzimas carotenogénicas, se expresan normalmente sólo en presencia de luz. Se trata del gen carC y de la región carA-B, que contiene varios genes. Las mutaciones en carQ (fenotipo Car-) anulan la expresión inducida por luz de carC y de la región carA-B y son epistáticas sobre las mutaciones carR (fig. 5). Una deleción que cubre carQ y carR tiene los mismos efectos que una mutación carQ.

Así pues, puede establecerse un modelo sencillo de acción génica en esta región, como sigue: el producto del gen carR, ausente o inactivo en la luz, reprime en la obscuridad la expresión (o la actividad) de carQ, mientras que el producto de éste sería necesario (activador) para la expresión de los genes biosintéticos. El Dr. David A. Hodgons (Universidad de Warwick, Reino Unido) ha clonado y caracterizado la región carQ-carS. Sus estudios demuestran que la expresión de la región, fotoinducible en el tipo silvestre, se hace constitutiva en los mutantes carR. Demuestran, además que las mutaciones Car^{C} se producen, en efecto, por falta de función de carR y han permitido identificar el gen carS. Se trata de una secuencia abierta de lectura (ORF) cuya alteración produce también fenotipo Car . Por tanto, parece que la activación de carB y carC depende tanto de carQ

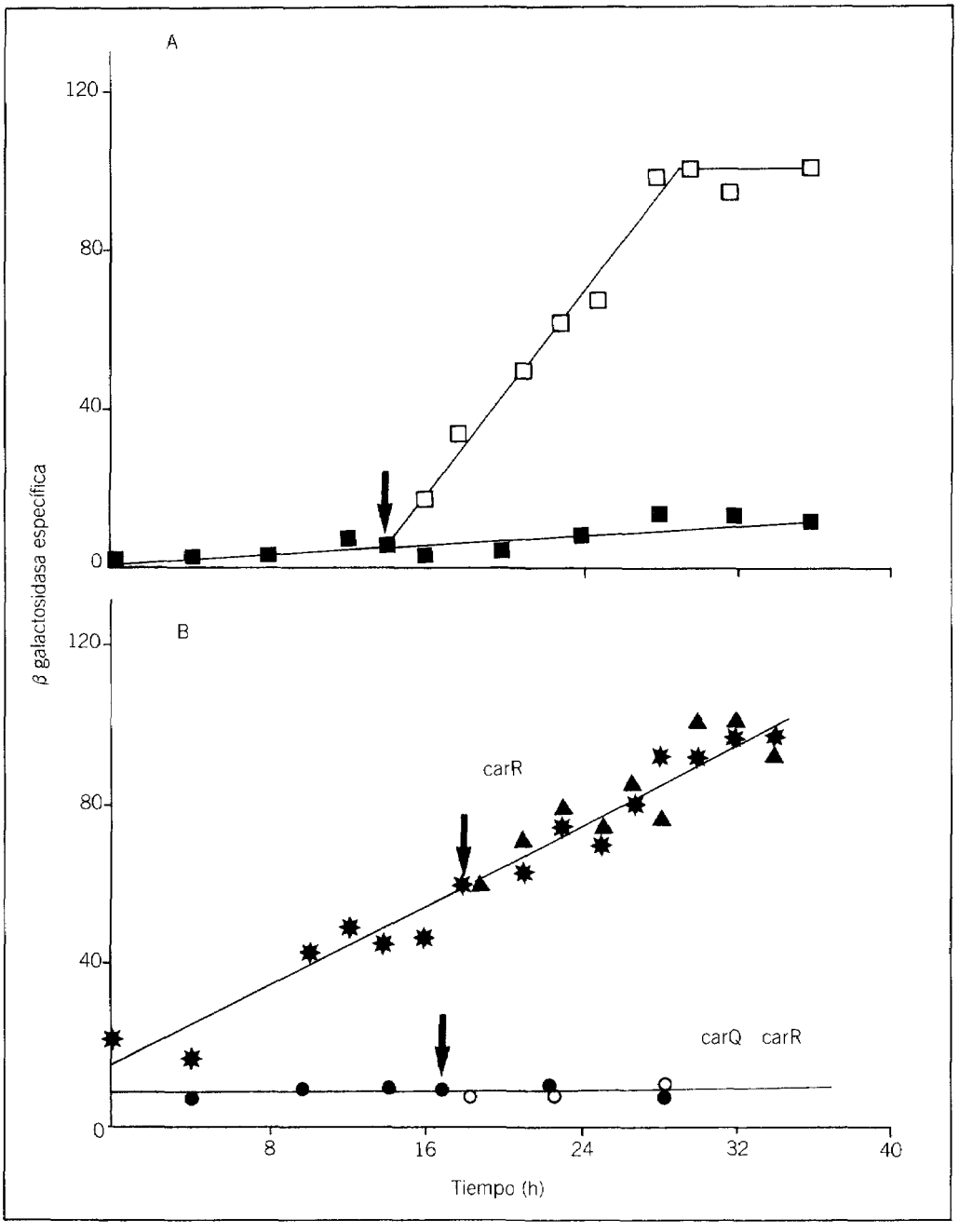

Fig. 5. Efecto de mutaciones carQ y carR sobre la expresión de carB. Se muestra la actividad beta galactosidasa específica a lo largo del tiempo de la estirpe silvestre (A) y de un mutante carR y un doble mutante carQ carR (B), todos ellos con una sonda transcripcional lacZ en carB. Las flechas indican el momento en que el cultivo, en obscuridad, se dividió en dos, uno iluminado con luz azul (símbolos blancos) y otro no (símbolos negros).

como de carS, aunque la presencia probable de un ARNm único para la región carQ-carS, y el acoplamiento traduccional entre sus tres genes (no publicado) complica la interpretación de los efectos mutacionales.

El gen carC (identificado por una inserción del transposón que causa fenotipo Car) determina la enzima deshidrogenasa de fitoeno, precursor acumulado por el mutante en presencia de luz o de mutaciones carR. La introducción de una sonda transcripcional ha permitido comprobar que la expresión de carC es inducible por luz, sobre todo en fase de crecimiento estacionaria. Ello explica el efecto citado de este útimo factor sobre la carotenogénesis.

La región carA-B se identificó por una mutación Car^{C} (carA1) y varias mutaciones ligadas Car , incluyendo dos inserciones de Tn5 lac. La región completa comprende alrededor de 8 kb. El análisis de las inserciones Tn5 lac, y de otras sondas lacZ introducidas entre carA y carB, tras clonación de esta región, demuestra que la expresión de carA-B requiere también la presencia de luz. La transcripción, que se produce a lo largo de unas 6 kb, en dirección carB→carA, se estimula por la luz en cualquier fase de crecimiento.

Ciertos datos indican la presencia de dos o más promotores «fotoinducibles» entre carB y carA, que se hacen constitutivos en presencia de mutaciones carR o de la mutación carA1. Esta mutación epistática sobre una mutación carQ, se comporta como «cis-dominante» en merodiploides. Ello revela la presencia de un elemento regulador inusual, por su acción a distancia y su situación «aguas abajo» de la unidad transcripcional.

Varias inserciones de Tn5 distribuidas a lo largo de carA-B causan fenotipo Car , sin provocar acumulación de caroteno alguno. Es probable que esta región incluya varios genes para enzimas tempranas de la ruta, lo cual explicaría que dichas inserciones supriman la producción de fitoeno del mutante carC. Otras dos inserciones, muy ligadas entre sí y cercanas a carA, causan la acumulación de licopeno, en condiciones normales de iluminación o en presencia de mutaciones carR. Han afectado, pues, al gen de la ciclasa del licopeno, al que hemos llamado carL.

Otros genes identificados recientemente en nuestro laboratorio, y aún poco estudiados, son carD y carE. El gen carD puede ser clave en la cascada regulatoria. Se ha identificado por una mutación Car (inserción de Tn5) que es epistática sobre las mutaciones carR pero no afecta el fenotipo Car^{C} que se produce al colocar la región carQ-S bajo un promotor constitutivo. Respecto a carE, ya que su alteración provoca la acumulación de gammacaroteno en estado libre, debe estar implicado en la formación del glucoéster de dicho caroteno. Hay que señalar la escasa información disponible hoy día sobre este tipo de modificación de los carotenoides. Con los métodos ya citados, esperamos aclarar el papel regulador de carD y determinar si carE es parte también del regulón car.

Perspectivas futuras

La secuenciación de los alelos car normales y mutantes, ya realizada para carQ-S y muy avanzada en carA-B y carC, y la aplicación de otras técnicas moleculares, deben permitir conclusiones más precisas sobre la estructura y modo de acción de los elementos reguladores «cis» y «trans» y de las enzimas carotenogénicas.

Desde un punto de vista aplicado, se ha puesto en marcha en nuestro laboratorio la búsqueda de mutaciones en carC y carL que provoquen resistencia a herbicidas que actúan por inhibición de las enzimas correspondientes. Como pasos previos, hemos demostrado que algunos herbicidas inhiben la carotenogénesis de *M. xanthus*, sin afectar, como en las plantas, a la viabilidad celular; y contamos ya con varios mutantes resistentes a inhibidores de la deshidrogenasa del fitoeno. La clonación y caracterización de los genes mutantes no resultará difícil en *M. xanthus*, convertido así en posible fuente de genes de resistencia a herbicidas para su introducción y expresión, con los vectores adecuados, en plantas de interés. Los distintos genes car aislados de *M. xanthus* pueden emplearse además como sondas para identificar y asilar genes homólogos de otros organismos de más difícil manipulación, incluyendo las propias plantas superiores.

Agradecimiento

Los estudios resumidos aquí no hubieran sido posibles sin la capacidad y entusiasmo de los investigadores del grupo de Murcia[7-9] y sin la financiación de la Comisión Asesora para Investigación Científica y Técnica (Proyecto N.º 0728), la Dirección General de Investigación Científica y Técnica (Proyecto N.º PB-86-0416) y la Dirección General de Educación y Universidad de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (Proyecto PCT88/18).

BIBLIOGRAFÍA

1. Goodwin TW. The biochemistry of the carotenoids. Londres, Chapman and Hall, 1980.
2. Kläui HM. Industrial and commercial uses of carotenoids. En: Britton E, Goodwin TW, eds. Carotenoid chemistry and biochemistry. Oxford, pergamon Press, 1982: 309-331.
3. Codgell R. The function of pigments in chloroplasts. En: Goodwin TW, ed. Plant pigments. Londres. Academic Press, 1988: 183-230.
4. Rau W. Functions of carotenoids other than in photosyntesis En: Goodwin TW, ed. Plant pigments. Londres, Academic Press, 1988: 231-255.
5. Britton, G. Biosynthesis of carotenoids. En: Goodwin TW, ed. Plant pigments. Londres, Academic Press, 1988: 133-182.
6. Rosenberg E, ed. Myxobacteria: development and cell interactions. Nueva York, Springer-Verlag, 1984.
7. Martínez-Laborda, A, Elias, M, Ruiz-Vázquez, R, Murillo, FJ. Insertions of Tn5 linked to mutations affecting carotenoid syynthesis in *M. xanthus*. Molec Gen Genet 1986; 205: 107-114.
8. Balsalobre, JM, Ruiz-Vazquez, R, Murillo, FJ. Light induction of gene expression in *M. xanthus*. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84: 2.359-2.362.
9. Martínez-Laborda A, Murillo, FJ. Genic and allelic interactions in the carotenogenic response of *M. xanthus* to blue light. Genetics 1989; 122: 481-490.

DISCUSIÓN

A. VILLASANTE: Al referirse al fenómeno de inducibilidad por la luz, ha mencionado diversos mutantes obtenidos por integración del trasposón. Al final observaron que no eran otros genes que los de la ruta de los carotenos, lo cual indicaría que quizá existen elementos comunes en los promotores de estos genes. ¿Disponen de información sobre la secuencia de promotores de los distintos genes?

F. MURILLO: Quisiera aclarar que un requisito previo en la búsqueda de estos mutantes es que fueran colonias con mayor actividad betagalactosidasa en la luz que en la obscuridad. En medio X gal, incluso cuando están expresando los niveles basales de betagalactosidasa, las bacterias adquieren una tonalidad verdosa que impide identificar cambios en la carotenogénesis. Cuando se provocaba mediante la inserción correspondiente síntesis de betagalactosidasa fotoinducible, y estas colonias se colocaban en medio normal, sin el substrato, podían observarse variaciones de carotenogénesis. Lo que quiero decir es que este sistema permitía, en principio, marcar cualquier gen cuya expresión fuera dependiente de luz, y no se observó ninguna localización adicional.

A. VILLASANTE: Está claro, pero mi interés se centra en si la secuencia de los promotores de estos genes podría proporcionar una clave sobre las propiedades especiales de estos genes.

F. MURILLO: Hay que tener en cuenta que la región es extraordinariamente grande, del orden de 8 kb, y estamos secuenciando unas 6 kb. Por tanto, no hemos empezado todavía a buscar dónde están los promotores, aunque confiamos en que existen características comunes entre los distintos promotores. Por otro lado, estamos utilizando alguno de estos genes que hemos clonado, como sondas para identificar los genes de la carotenogénesis en el *Phycomyces* y los resultados son hasta el momento esperanzadores.

A. JUAREZ: ¿Han identificado por casualidad alguna cepa de *Myxococcus xanthus* en la cual la producción de carotenos venga codificada por genes de origen plasmídico o es siempre cromosómico?

F. MURILLO: Aparentemente es siempre cromosómico, aunque esto no se puede asegurar. Lo único que sabemos es que *Myxococcus* no tiene plásmidos normales, de forma que aparentemente tiene sólo un único cromosoma. Sin embargo, hay resultados recientes que indican que, al igual que ocurre con *Streptomyces* podría tener plásmidos de gran tamaño que en las preparaciones normales de ADN se comportan como ADN cromosómico. Desconocemos si los genes de la carotenogénesis están localizados en alguno de estos megaplásmidos.

A. JUAREZ: Según mi información en principio no es posible transferir por conjugación esta propiedad mutante negativo.

F. MURILLO: Efectivamente, entre otras razones porque con *Myxococcus* no se pueden hacer conjugaciones.

A. JUAREZ: Quisiera preguntar además qué tamaño tiene el fragmento de ADN que contiene todo este bloque de genes.

F. MURILLO: El bloque de genes está contenido

en un fragmento de unas 8 kb, con la excepción del gen de la deshidrogenasa que no está incluido en esta agrupación. O sea, que lo que habría que hacer es conjugar este fragmento de 8 kb con otro fragmento que sabemos que corresponde sólo al gen de la deshidrogenasa.

A. JUÁREZ: ¿Hay algún grupo que haya logrado esto?

F. MURILLO: Parece ser que sí. Un grupo afirma haber colocado todo el conjunto de genes en un trasposón, lo cual permite desplazarlo de un lugar a otro. Sin embargo, en estos artículos no se indica qué es lo que realmente hace que la *E. coli* adquiera la coloración amarilla.

L. ENJUANES: Hoy día se están utilizando mucho los transposones para inducir mutaciones en determinadas bacterias que luego se utilizan como sistemas de expresión dirigidos como la *Salmonella typhimurium*. Naturalmente antes de administrar a un individuo *Salmonella thyphimurium*, hay que tomar ciertas precauciones, pero yo me pregunto, ¿cuál es la frecuencia de la reversión de las mutaciones, cuando un gen es interrumpido por efecto de un transposón?

F. MURILLO: Son muy estables, aunque esto depende hasta cierto punto del sistema que se está utilizando. Por ejemplo, en el caso del Tn-5 se sabe que inicialmente después de la entrada del transposón, se pone en marcha su sistema de expresión que hace que aparezca la transposasa, la enzima que va a intervenir en el mecanismo de transposición, pero a su vez, inmediatamente también, un represor de la expresión de la transposasa. Por tanto, ya que inicialmente la frecuencia de salto es relativamente alta, es muy probable qe se produzca un salto, que en el caso de *E. coli* puede ser del orden de 10^3 pero una vez inserto el transposón en un sitio, la expresión del represor de la transposasa hace que la inserción sea extraordinariamente estable.

E. CERDÁ: Hay una alternativa incluso mejor y que consiste en utilizar para saltar un Tn-5 defectuoso deficiente para la transposasa e incorporar la transposasa a través de un plásmido que posteriormente se elimina.