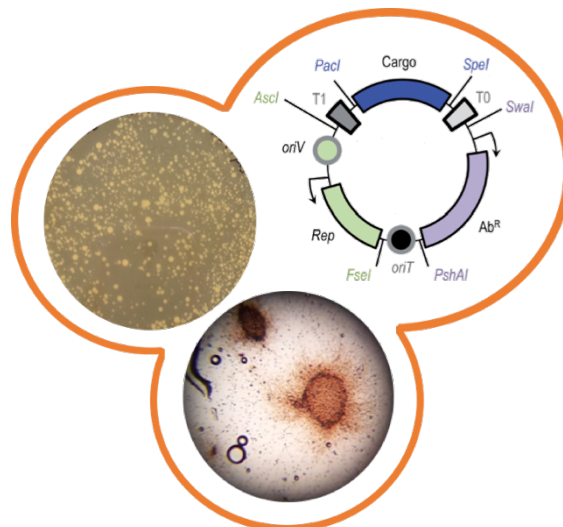




Universidad de Oviedo

Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias

Máster en Biomedicina y Oncología Molecular



Desarrollo de vectores para biotecnología en Actinomicetos

Coral García Gutiérrez

1/Junio/2016

Trabajo Fin de Máster

INDICE

AGRADECIMIENTOS	5
RESUMEN	6
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. <i>Streptomyces</i>	8
1.2. Plásmidos	9
1.2.1. Marcadores de selección: genes de resistencia a antibióticos.....	10
1.2.2. Orígenes de replicación.....	14
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIAL Y MÉTODOS	18
3.1. Microorganismos empleados y plásmidos base	18
3.2. Métodos microbiológicos	18
3.2.1. Medios de cultivo.....	18
3.2.2. Cultivo de <i>E. coli</i> y <i>Streptomyces</i>	20
3.2.3. Condiciones de conservación de las células	20
3.2.4. Antibióticos.....	20
3.3. Aislamiento de ADN plasmídico	21
3.3.1. Minipreparaciones de ADN plasmídico a partir de <i>E. coli</i>	21
3.3.2. Minipreparaciones de ADN plasmídico a partir de <i>S. albus</i>	22
3.4. Manipulación <i>in vitro</i> del ADN	22
3.4.1. Digestiones de ADN	22
3.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	22
3.4.3. Electroforesis en gel de agarosa.....	24
3.4.4. Purificación de fragmentos de ADN.....	24
3.4.5. Ligaciones de ADN.....	25
3.5. Transformación con ADN plasmídico en <i>E. coli</i>	25
3.6. Obtención y transformación de protoplastos de <i>S. albus</i>	25
3.7. Replicación de colonias con terciopelo	26

4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
4.1.	Búsqueda bioinformática	27
4.2.	Obtención del cassette génico Replicon-SCP2* e introducción en el plásmido pSEVA221	27
4.3.	Obtención de los plásmidos pCGG4, pCGG5 y pCGG6	29
4.4.	Introducción del cassette génico Replicon-SCP2* en el plásmido pSEVA181	31
4.5.	Obtención de los plásmidos pCGG8, pCGG9, pCGG10 y pCGG11	33
4.6.	Introducción del cassette génico Replicon-SCP2* en el plásmido pSEVA331	35
4.7.	Obtención de los plásmidos pCGG13, pCGG14 y pCGG15	36
4.1.	Obtención del cassette génico Integron-attP e introducción en el plásmido pSEVA181	38
4.2.	Obtención de los plásmidos pCGG25, pCGG26, pCGG27	40
4.3.	Transformación de protoplastos de <i>S. albus</i> J1074 con pCGG3	42
5.	CONCLUSIONES.....	44
6.	PERSPECTIVAS FUTURAS	45
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	46

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer antes que nada a Víctor de Lorenzo, Esteban Martínez y Tomás Aparicio, del CNB-CSIC, el facilitarnos los plásmidos pSEVA base para la realización de este trabajo, y por su ayuda y colaboración a lo largo del mismo.

RESUMEN

Los plásmidos o vectores son plataformas que nos permiten introducir cambios genéticos en células bacterianas o de otros tipos. La bacteria más utilizada en manipulación genética es *Escherichia coli*, sin embargo hay ciertos procesos que no pueden llevarse a cabo en dicha bacteria, y es aquí donde entran a escena las bacterias del género *Streptomyces*, que aunque presentan un ciclo de vida más complejo, llevan a cabo procesos de biosíntesis de compuestos bioactivos de una forma más eficiente (antibióticos, antitumorales, inmunosupresores, etc.). Es por ello que el desarrollo de nuevos vectores bifuncionales *E. coli*/*Streptomyces* facilita el trabajo a la hora de realizar experimentos cuyo hospedador final es *Streptomyces*.

Mediante técnicas muy diversas tales como la búsqueda bioinformática, el aislamiento de ADN plasmídico, digestiones enzimáticas, ligaciones, transformaciones de ADN plasmídico en *E. coli* y *Streptomyces* y demás procesos, que abarcan distintas áreas de la biología, se ha conseguido desarrollar el trabajo que se expone a continuación.

Con la utilización de la plataforma SEVA se han conseguido desarrollar plásmidos con genes de resistencia a kanamicina, cloranfenicol, oxitetraciclina y estreptomicina y que contienen orígenes de replicación diferentes tanto para *E. coli* como para *Streptomyces*, obteniéndose así plásmidos bifuncionales para ambos microorganismos.

1. INTRODUCCIÓN

La biotecnología ha tenido un desarrollo exponencial desde sus inicios, impulsado desde los años 50 por el descubrimiento y desarrollo del ADN extracromosómico bacteriano (plásmidos) de la mano de Lederberg (1952). Este descubrimiento abrió las puertas de la manipulación de los genomas bacterianos, permitiéndonos hoy día transferir a dichos organismos secuencias de ADN de interés, como marcadores de resistencias a antibióticos, realizar mutaciones en su secuencia genómica e incluso producir en estos microorganismos proteínas de interés humano o rutas de biosíntesis de productos bioactivos.

Tradicionalmente, *Escherichia coli* era la bacteria de elección para albergar genes de forma heteróloga puesto que es una bacteria bien conocida y fácil de manipular. Sin embargo plantea algunos problemas post-traduccionales importantes en el caso de proteínas eucariotas, tales como la glicosilación y un plegamiento proteínico incorrecto en algunos casos, resultando en insolubilidad y pérdida de bioactividad del producto, además también se puede producir una disminución en los niveles de expresión debido a problemas con el uso de codones en esta especie de enterobacteria, que posee un bajo contenido GC en sus genes (Anné *et al.*, 2012; Silva-Rocha *et al.*, 2013).

En las últimas décadas, *Streptomyces spp.* ha sido objeto de investigaciones para la producción de antibióticos y proteínas recombinantes, ya que tiene la habilidad de secretar proteínas correctamente plegadas en el medio de producción, lo que simplifica los pasos subsecuentes de purificación. Estas características, entre otras, hacen de *Streptomyces spp.* una alternativa más atractiva a otras bacterias como *E. coli* y *Bacillus subtilis* (Anné *et al.*, 2012).

Este proyecto se ha realizado con la colaboración del Programa de Biología de Sistemas dirigido por el Dr. Víctor de Lorenzo del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC). Este grupo ha desarrollado la plataforma SEVA (*The Standard European Vector Architecture*) (Fig. 1). Se trata de un recurso *online* y un repositorio de clones para optimizar la asistencia a la hora de seleccionar plásmidos y realizar cambios fenotípicos en procariontes.



Figura 1: Logotipo de la plataforma SEVA (*Standard European Vector Architecture*)
Silva-Rocha *et al.*, 2013

Esta plataforma permite disponer de un vector base que agiliza la construcción de los plásmidos necesarios para una gran variedad de objetivos, teniendo que decidir simplemente la mejor combinación de origen de replicación, marcador de selección y el segmento de carga (Silva-Rocha *et al.*, 2013).

1.1. Streptomyces

Se trata de bacterias Gram positivas con un alto contenido CG pertenecientes al filo *Actinobacteria* (Kieser *et al.*, 2000), son bacterias filamentosas, que dan lugar a micelios ramificados similares al de los hongos filamentosos. Se encuentran de forma ubicua en la naturaleza gracias a su habilidad para colonizar una gran variedad de hábitats como puede ser el suelo o la vegetación

(Kieser *et al.*, 2000; Górný *et al.*, 2003). Presentan un ciclo de vida muy complejo (Fig. 2), que implica procesos de diferenciación morfológica y fisiológica (Kieser *et al.*, 2000; Slonczewski *et al.*, 2013).

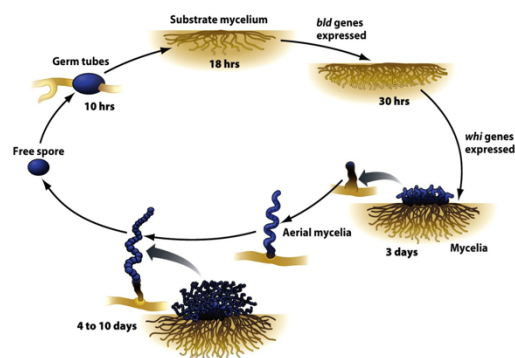


Figura 2: Representación del ciclo de vida de *Streptomyces* (Slonczewski *et al.*, 2013).

Tras la germinación de las esporas, el micelio se compartimentaliza y se produce el desarrollo del micelio I (MI), un micelio monogénico. Los compartimentos de este micelio están separados por membranas que generalmente no desarrollan paredes celulares gruesas. Una parte de las células que componen el MI entran en una etapa de muerte programada y las células que permanecen viables se diferencian a un micelio poligénico que se divide en septos y forma las hifas, es lo que se denomina micelio II (MII) (Yagüe *et al.*, 2014). Estas hifas van a sufrir un proceso de curvatura, enrollamiento y engrosamiento de la pared celular para dar lugar a una cadena de esporas uninucleares, que se liberarán al medio y desarrollarán un nuevo micelio si germinan (Kieser *et al.*, 2000). Es en este MII donde se producen los antibióticos como resultado del metabolismo secundario de estas bacterias (Yagüe *et al.*, 2014).

La ruta principal de consumo de glucosa en este género bacteriano es la Embden-Meyerhof-Parnas o glicolisis, exceptuando algunas especies como *S. antibioticus* (vía de la hexosa monofosfato). En todos los casos estudiados, la principal ruta de

asimilación de nitrógeno es vía glutamato sintetasa y glutamato-2-oxoglutarato aminotransferasa (GOGAT) (Kieser *et al.*, 2000).

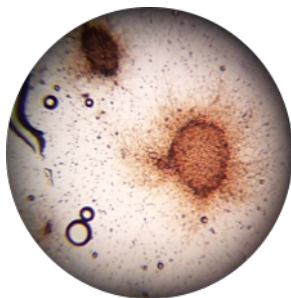


Figura 3: Imagen de un cultivo en medio líquido de *Streptomyces*

Streptomyces (Fig. 3) presenta un metabolismo muy diverso, los compuestos que produce en su metabolismo secundario abarcan un rango muy amplio, son de alto valor en la industria y presentan diversos propósitos farmacéuticos, esto incluye antibióticos para medicina humana y veterinaria o aplicaciones en la agricultura, anti-cáncer, agentes inmunosupresores, etc. Algunas de las enzimas producidas tienen un alto valor añadido.

Es por ello que algunos de estos compuestos se producen a escala industrial, donde se secretan al medio de cultivo en una alta concentración. Esta secreción tan eficiente permite emplear esta bacteria para la producción de proteínas heterólogas (Anné *et al.*, 2012). La mayoría de las cepas de *Streptomyces* contienen plásmidos, tanto circulares como lineales, además, otro de los atractivos de estos microorganismos es la producción de antibióticos durante el metabolismo secundario (Kieser *et al.*, 2000), como se ha comentado anteriormente.

Uno de los *Streptomyces* más utilizados en el ámbito del laboratorio es *Streptomyces albus*. Esta especie presenta uno de los genomas más pequeños del género *Streptomyces*, lo cual es interesante para estudiar su biología. *S. albus* tiende a reducir el número de genes ortólogos y posee el mayor contenido en CG conocido de todo el género *Streptomyces* (73,3%), además presenta un mayor número de operones ARNr (ARN ribosómico), que es posiblemente la explicación del excepcional crecimiento y versatilidad que presentan estas células (Zaburannyi *et al.*, 2014).

1.2. Plásmidos

Este ADN extracromosómico presenta una estructura de doble cadena que se replica de forma autónoma en la célula hospedadora. El tamaño varía desde unas pocas kilobases (kb) hasta centenares. Entre las bacterias, estos plásmidos se transfieren de forma horizontal, principalmente por conjugación, aunque existen otros procesos de transferencia (Miljkovic-Selimovic *et al.*, 2007). En *Streptomyces* la composición base de los plásmidos nativos no difieren significativamente de la composición del ADN cromosómico (Kieser *et al.*, 2000). La gran mayoría de la ingeniería genética se ha desarrollado en *E. coli*, como se ha comentado anteriormente, debido a la facilidad de

ensamblaje físico del ADN recombinante en esta especie. Sin embargo este microorganismo no es la plataforma óptima a la hora de desarrollar algunos productos biotecnológicos específicos (metabolitos complejos, proteínas extracelulares, etc.) (Anné *et al.*, 2012; Silva-Rocha *et al.*, 2013).

Para este trabajo en concreto, se ha recurrido a la plataforma de vectores SEVA, que se organiza en fragmentos de ADN minimizados para cada función plasmídica, editados para evitar sitios de reconocimiento para enzimas de restricción en la secuencia y/o en su funcionalidad y aislados por conexiones físicas a través de tres segmentos flanqueados por sitios de restricción fijos e inusuales. Esta plataforma está constituida por tres segmentos básicos necesarios para el desarrollo de estos plásmidos (Fig. 4) (Silva-Rocha *et al.*, 2013):

- ⌘ Origen de replicación, es el sitio de inicio de la replicación. Está flanqueado por los sitios de restricción *Ascl* y *Fsel*.
- ⌘ Marcador de selección, se trata normalmente de genes de resistencias a antibióticos que nos permiten diferenciar las bacterias transformadas. Está flanqueado por los sitios *Swal* y *PshAI*.
- ⌘ Segmento de carga, se trata de un segmento a través del cual se introduce el fragmento de ADN de interés a clonar. Está flanqueado por los sitios *PacI* y *SpeI*.

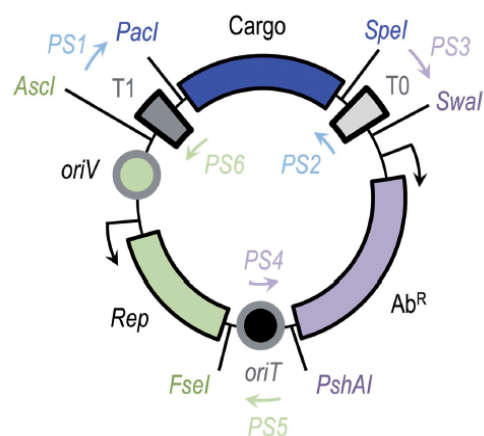


Figura 4: Representación esquemática de un vector de la plataforma SEVA (Silva-Rocha

1.2.1. Marcadores de selección: genes de resistencia a antibióticos

En los últimos 70 años, los antibióticos han sido esenciales en la lucha contra las enfermedades infecciosas y han contribuido a la mejora de las expectativas de vida (Hansen *et al.*, 2015). Es bien conocido que los miembros del género *Streptomyces* producen muchos antibióticos y otras clases de metabolitos secundarios biológicamente activos. Más del 80% de los antibióticos no sintéticos están producidos por miembros del género *Streptomyces* (Kieser *et al.*, 2000).

Los genes usados como marcadores de resistencia en los plásmidos comerciales poseen alta similitud a nivel de secuencia con genes de resistencia procedentes de agrupamientos génicos de biosíntesis de antibióticos en las especies productoras de estas moléculas (Riesenfeld *et al.*, 2004). Su transferencia natural a otras especies, patógenas en este caso, es un grave problema clínico en la actualidad (Hansen *et al.*, 2015). La mayoría de los genes codificadores de resistencias con interés clínico han sido descubiertos en bacterias aisladas de muestras veterinarias y en hospitales. Estos mecanismos de resistencias son muy importantes porque son utilizados en investigación básica y aplicada, como por ejemplo como marcas de resistencia en vectores bacterianos.

En este estudio se ha optado por utilizar como antibióticos de selección en *E. coli* y *Streptomyces* la oxitetraciclina, cloranfenicol, kanamicina y estreptomicina.

Oxitetraciclina

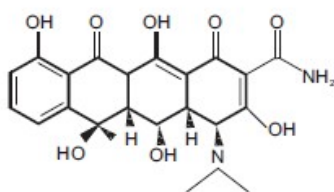


Figura 5: Estructura química de la oxitetraciclina. (Petković *et al.*, 2006)

La oxitetraciclina (5'-hidroxitetraciclina, Oxi) (Fig. 5) pertenece al grupo de las tetraciclinas y es por tanto un potente inhibidor de la síntesis proteica bacteriana con un amplio espectro de actividad frente a patógenos Gram positivos y Gram negativos (Yin *et al.*, 2015), uniéndose a la subunidad 30S del ribosoma, evitando la formación del complejo aminoacil ARNt – ribosoma (Petković *et al.*, 2006). Las tetraciclinas se han ido abandonando para usos clínicos debido a la aparición de resistencias. Por esto que se han buscado derivados más activos como es el caso de la oxitetraciclina, un antibiótico producido por *Streptomyces rimosus* (Yin *et al.*, 2015).

Los genes que codifican la resistencia frente a la oxitetraciclina se denominan *otrA*, *otrB* y *otrC* y han sido aislados desde este productor *S. rimosus* (Doyle *et al.*, 1991; Butler *et al.*, 1989). OtrA protege al ribosoma (Doyle *et al.*, 1991), uniéndose de forma no covalente a la GTPasa asociada al mismo e impidiendo su bloqueo por acción del antibiótico (Connell *et al.*, 2003). El gen que codifica esta proteína OtrA está presente también en otros *Streptomyces* como por ejemplo *S. lividans*. El gen *otrB* codifica una proteína de membrana integral responsable de expulsar la oxitetraciclina de la célula. El

mecanismo mediante el cual actúa la proteína codificada por el gen *otrC* todavía no ha sido descrito (Petković *et al.*, 2006).

Cloranfenicol

El cloranfenicol (Cm) (Fig. 6) es un antibiótico clásico de amplio espectro que es producido por diversas especies del género bacteriano *Streptomyces*, incluyendo a *S. venezuelae* (Morales *et al.*, 2007).

El cloranfenicol fue aislado por primera vez en actinomicetos en 1947. Sin embargo su uso clínico ha

sido reducido por la toxicidad que induce en la médula ósea (Tobe *et al.*, 2013) y por la resistencia que se desarrolla rápidamente en las bacterias frente a este antibiótico (Sambrook *et al.*, 2001). El cloranfenicol inhibe la síntesis proteica en bacterias bloqueando el paso de transferencia del péptido durante la fase de elongación peptídica (Tobe *et al.*, 2013).

La resistencia frente a este antibiótico ocurre de forma natural en las bacterias gracias a la enzima cloranfenicol acetiltransferasa (codificada por el gen *cat*), que cataliza la transferencia del grupo acetilo desde el acetil-CoA al grupo C3-hidroxilo del antibiótico (Tobe *et al.*, 2013). En ciertas cepas de enterobacterias y en otras bacterias Gram negativas, el gen *cat* se expresa de forma constitutiva y se encuentra en plásmidos que confieren resistencias. Se han descrito algunos productos variantes de este gen *cat* (Sambrook *et al.*, 2001).

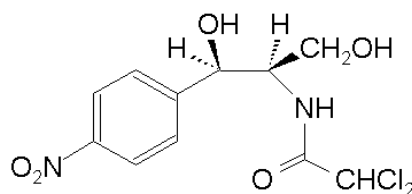


Figura 6: Estructura química del cloranfenicol. (Sambrook *et al.*, 2001)

Kanamicina

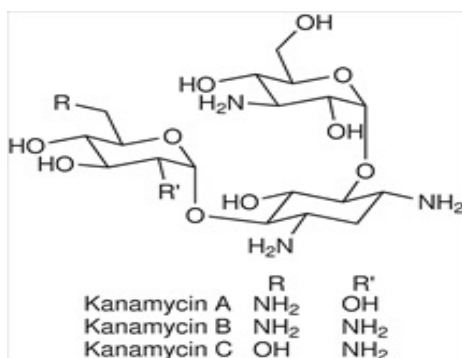


Figura 7: Estructura química de la kanamicina.

<https://www.medicinescomplete.com>

La kanamicina (Kn) (Fig. 7) es un aminoglicósido aislado por primera vez en 1957 en el Instituto Nacional Japonés de la Salud desde cultivos de *S. kanamyceticus*. Hay tres tipos de kanamicinas dependiendo de la posición de dos grupos funcionales. La kanamicina comercial es una mezcla de los tres tipos, siendo la forma mayoritaria la A (Fig. 7) (Sambrook *et al.*,

2001). Presenta un amplio espectro de actividad frente a muchas especies de bacterias patógenas, y durante varios años fue un importante antibiótico en el tratamiento de graves infecciones producidas por bacilos Gram negativos (Yow *et al.*, 1961).

Los antibióticos aminoglicósidos son policationes que difunden fácilmente a través de porinas, y una vez en el citosol, estos antibióticos interaccionan con al menos tres proteínas ribosomales, produciendo una inhibición de la síntesis de proteínas y un aumento de los errores traduccionales (Sambrook *et al.*, 2001; Katzung *et al.*, 2012).

En estructura, la kanamicina se parece a la gentamicina, neomicina y geneticina y todos ellos son inactivados por muchas aminofosfotransferasas bacterianas. Como marcadores de selección se han utilizado ampliamente dos genes de resistencia a kanamicina aislados del transposón Tn903 y Tn5 (Sambrook *et al.*, 2001).

Estreptomicina

La estreptomicina (Sm) (Fig. 8) es también un aminoglicósido, aislado por primera vez en *S. griseus*, y como tal inhibe de forma irreversible la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, concretamente se une a la proteína S12 encargada de estabilizar el 16S ARNr (Sreevatsan *et al.*, 1995). Su mecanismo de acción es el mismo que el descrito en el apartado anterior para kanamicina (Katzung *et al.*, 2012).

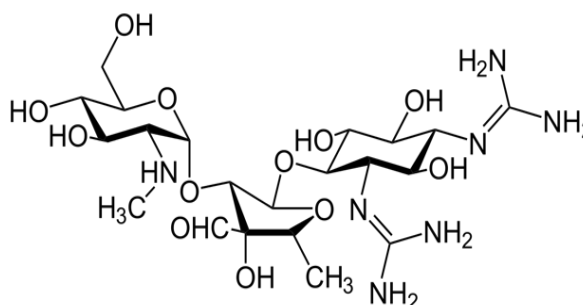


Figura 8: Estructura química de la estreptomicina
<https://en.wikipedia.org/wiki/Streptomycin>

Una de las primeras resistencias a estreptomicina descritas fue la mutación en el gen *rpsL*, cuya proteína mutada afecta de manera muy significativa a la estructura del 16S ARNr y como consecuencia le confiere resistencia a estreptomicina (Sreevatsan *et al.*, 1995). Otro tipo de mecanismos de resistencias se basan en la producción de enzimas que inactivan este aminoglicósido mediante adenilaciones, acetilaciones o fosforilaciones (Katzung *et al.*, 2012).

1.2.2. Orígenes de replicación

Muchas de las características de la replicación cromosómica del ADN se han mantenido a lo largo de los tres filos de la vida, incluida la iniciación desde un origen discreto, la progresión bidireccional y la terminación por una horquilla de replicación opuesta (Gowrishankar, 2015). En las células bacterianas, la replicación del cromosoma es bidireccional desde un origen simple y termina en una región opuesta (Wolanski *et al.*, 2015; Gowrishankar, 2015).

Los vectores bifuncionales recombinantes, que se replican tanto en *E. coli* como en *Streptomyces* son muy interesantes, ya que sigue siendo más fácil manipular ADN en *E. coli* que en *Streptomyces*, usado como destino final para la producción de la proteína o metabolito de interés. Probablemente el vector bifuncional más utilizado es aquel que contiene el *oriT* de RP4, que permite la movilización del plásmido desde *E. coli* a *Streptomyces* (Kieser *et al.*, 2000). Sin embargo en el presente estudio se ha optado por construir plásmidos que presenten dos orígenes de replicación diferentes, uno para *E. coli* y otro para *Streptomyces*, ya que así se puede modular mejor el nivel de copias en esta última bacteria.

Los plásmidos replicativos, en general se pueden clasificar en bajo, medio y alto número de copias, adicionalmente también se dispone de plásmidos integrativos.

Bajo número de copias

Son plásmidos que necesitan una función específica para asegurar su estabilidad genética. Sin embargo se pueden conservar manteniendo una presión selectiva. Estos plásmidos se pueden perder de forma espontánea, característica muy utilizada para asegurar que un cambio fenotípico es debido al plásmido y no a una mutación secundaria (Kieser *et al.*, 2000). Son también muy útiles cuando se trata de expresar sustancias tóxicas para las células y mantenerlas así en bajos niveles que permitan estudiar su función o sus efectos (Watve *et al.*, 2010).

En el caso de *Streptomyces*, el único plásmido de bajo número de copias disponible deriva del SCP2* (Kieser *et al.*, 2000). En *E. coli* alguno de los orígenes de replicación que entran en esta categoría son RK2 (Stalker *et al.*, 1981) y RSF1010 (Scholz *et al.*, 1989).

Alto número de copias

Presentan una estructura inestable pero son muy útiles en clonación de genes reguladores o secuencias amplificadoras (secuencias que aumentan los niveles de replicación) o genes de biosíntesis de antibióticos, ya que te permite obtener gran cantidad de copias en menos ciclos (Million-Weaver & Camps, 2014; Watve *et al.*, 2010).

pIJ101 es uno de los plásmidos de mayor número de copias más conocidos de *Streptomyces*, y presenta 300 copias por cromosoma, o lo que es lo mismo, el 30% del ADN total de la célula (Kieser *et al.*, 2000). En el caso de *E. coli* el plásmido de este tipo más usado es el pUC, que deriva del pBR322 (Lin-Chao *et al.*, 1992; Szpirer *et al.*, 2001).

Medio número de copias

Presentan una estabilidad genética mayor que los plásmidos de bajo y alto número de copias, al mismo tiempo que permiten tener unos niveles del plásmido adecuados para expresar sustancias tóxicas. Es por ello que son muy utilizados en el ámbito industrial (Anindyajati *et al.*, 2016).

Se puede considerar dentro de este grupo el plásmido pBBR1, aislado de *Bordetella bronchiseptica* S87, pero que tras la introducción de un marcador de resistencia a un antibiótico puede ser usado en *E. coli*, entre otros hospedadores (Antoine and Loch, 1992).

Integrativos

Los plásmidos integrativos proporcionan una óptima estabilidad segregacional y una única copia por cromosoma (Kieser *et al.*, 2000). Estos plásmidos se integran a través de los sitios *attP* (localizado en el plásmido) y *attB* (localizado en el genoma bacteriano) (Fig. 9) mediante recombinación homóloga (Scharbaal-Vázquez *et al.*, 2008). Estos vectores son mejor aceptados por el receptor que los plásmidos de alto número de copias, con los que se puede llegar a reducir los niveles de expresión por problemas de toxicidad (Kieser *et al.*, 2000).

Además de los sitios *attP* y *attB*, se requiere la presencia de la enzima integrasa, codificada por ejemplo por el gen *int* procedente del fago ϕ C31, presente en algunos de estos vectores (Gregory *et al.*, 2003).

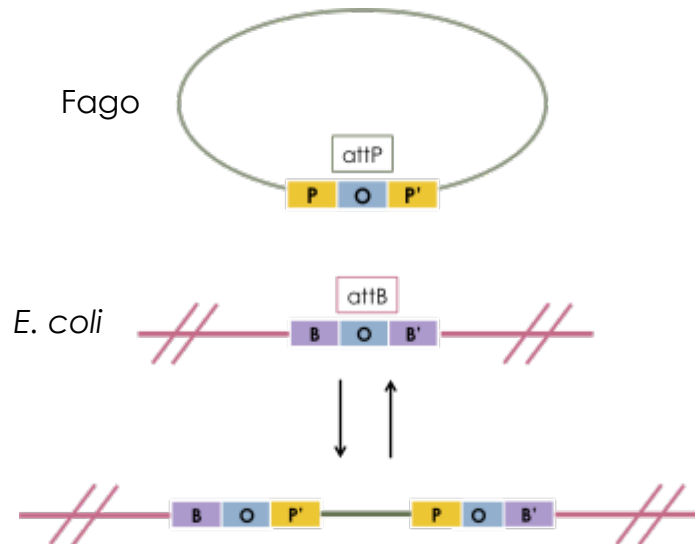


Figura 9: Esquema del proceso de integración y escisión de un vector integrativo, a través de los sitios *attB* y *attP*, en el genoma bacteriano.

2. OBJETIVOS

Con todos los antecedentes presentados en el anterior apartado de introducción, el objetivo principal de este trabajo es la obtención de plásmidos bifuncionales, para *E. coli* y *Streptomyces*, diseñados a partir de la plataforma SEVA, de forma que:

- ∂ Se obtengan todas las combinaciones posibles entre los orígenes de replicación en *E. coli*, RK2, pUC y pBRR1, y los genes de resistencia a los antibióticos, kanamicina, oxitetraciclina, cloranfenicol y estreptomicina con:
 - ✓ El origen de replicación SCP2* en *Streptomyces*.
 - ✓ El integrón del fago φ C31 en *Streptomyces*.
- ∂ Se introduzcan los plásmidos obtenidos en *S. albus*

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Microorganismos empleados y plásmidos base

ORGANISMO	CEPA	GENOTIPO	REFERENCIA
<i>E. coli</i>	CC118	<i>araD139 Δ(ara,leu)7697 ΔlacX74 phoAΔ20 galE galK thi rpsE rpoB argE_{am} recA1</i>	Manoil and Beckwith, 1985
<i>S. albus</i>	J1074	<i>Ily-1, sal-2.</i>	Chater and Wilde, 1980

Tabla 1: Descripción de los microorganismos empleados.

PLÁSMIDO	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA	GENBANK
<i>pSEVA181</i>	Ap ^R , pUC, MCS (2,6 kb)	Panke <i>et al</i> , 2013	pSEVA181.gbck
<i>pSEVA221</i>	Kn ^R , RK2, MCS (3,8 kb)	Silva-Rocha, R. <i>et al.</i> , 2013	JX560327
<i>pSEVA331</i>	Cm ^R , pBBR1, MCS (3 kb)	Silva-Rocha, R. <i>et al.</i> , 2013	JX560333
<i>pSEVA451</i>	Sm ^R , RS1010, MCS (5,3 kb)	Silva-Rocha, R. <i>et al.</i> , 2013	JX560340
<i>pUC57</i>	Vector de selección positiva de <i>E. coli</i> ; <i>lacZ</i> ⁺ , Ap ^R (2,7 kb)	Fermentas	Y14837.1

Tabla 2: Descripción de los plásmidos utilizados.

3.2. Métodos microbiológicos

Los métodos utilizados para el cultivo de *E. coli* y *S. albus*, han sido los descritos por Sambrook *et al.*, 2001 y Kieser *et al.*, 2000, respectivamente.

3.2.1. Medios de cultivo

Los medios sólidos se han realizado añadiendo agar en un porcentaje adecuado (generalmente el 2%). Todos los medios fueron esterilizados en autoclave a 120 °C durante 20 min.

- ∅ **Medio LB:** (Kieser *et al.* 2000). Medio líquido utilizado para obtener masa celular de la que se puede obtener ADN plasmídico. Composición: Triptona (5 g/L), extracto de levadura (5 g/L), NaCl (10 g/L). Al añadir agar (15 g/L) se obtiene el medio LA.
- ∅ **Medio TSB:** (Tryptone Soya Broth, Merck). Medio líquido comercial compuesto de peptona de caseína (17 g/L), peptona de soja (3 g/L), NaCl (5 g/L), fosfato dipotásico (2,5 g/L), y glucosa (2,5 g/L) en agua destilada. Si al TSB le añadimos 15 g/L de agar obtenemos el medio TSA. Se utiliza para obtener masa celular en *E. coli* o para realizar preinóculos de *Streptomyces* destinados a la obtención de ADN cromosómico o plasmídico.
- ∅ **Medio YEME 17%:** (Kieser *et al.* 2000). Medio líquido utilizado para obtener protoplastos de *S. albus*. Composición: glucosa (10 g/L), extracto de levadura (3 g/L), extracto de malta (3 g/L), peptona de carne (5 g/L) y sacarosa (170 g/L). Tras el autoclavado se suplementa con glicina al 20% (937 µL/25 mL) y MgCl₂ 1M (125 µL/25 mL).
- ∅ **Medio R5:** (Kieser *et al.* 2000). Medio sólido para regenerar protoplastos de *Streptomyces*. Composición: Sacarosa (103 g/L), K₂SO₄ (0,25 g/L), MgCl₂*6H₂O (10,12 g/L), glucosa (10 g/L), casaminoácidos (0,1 g/L), extracto de levadura (5 g/L), TES (5,73 g/L), 2 mL de solución de oligoelementos (ZnCl₂ 0,04 g/L, FeCl₃*6H₂O 0,2 g/L, CuCl₂*2H₂O g/L, MnCl₂*4H₂O 0,01g/L, Na₂B₄O₇*10H₂O 0,01g/L y (NH₄)₆Mo₇O₂*4H₂O 0,01g/L) y agar 25 g/L. Tras autoclavar se suplementa con 10 mL/L de KH₂PO₄ 0,5%, 4 mL/L de CaCl₂*2H₂O 5M, 15 mL/L de L-prolina 20% y 7 mL/L de NaOH 1M.
- ∅ **Medio Bennet:** (Kieser *et al.* 2000): Medio sólido utilizado para la esporulación de *S. albus*. Composición: Glucosa (5 g/L), extracto de levadura (0,5 g/L), extracto de carne (0,5 g/L), casaminoácidos (1 g/L) y agar (22 g/L). Se ajusta a pH 7 utilizando KOH.

3.2.2. Cultivo de *E. coli* y *Streptomyces*

1. Para los cultivos de *E. coli* se ha partido siempre de una colonia aislada en medio sólido, que se inocula en medio TSB o LB al que se añade el antibiótico de selección para luego incubar a 37 °C en agitación (250 rpm) durante una noche.
2. Para *Streptomyces*:
 - a) Recogida de esporas: sembramos en medio Bennet (sólido) cubriendo con esporas o micelio la superficie de la placa Petri, e incubamos los días suficientes para que se produzca la esporulación (una semana a 30 °C).
 - b) Obtención de protoplastos: De las esporas en suspensión obtenidas y guardadas en glicerol 20% a -20 °C, se hace un preinóculo a una concentración final de 10⁷ esporas/mL en medio líquido (10 mL de TSB), que se deja una noche a 30 °C y 250 rpm en matraces lisos de 50 mL. Tras 24 h de crecimiento se inoculan 750 µL de este micelio fresco recién obtenido en matraces invaginados de 250 mL con 25 mL de medio líquido YEME 17% suplementado y se dejan 36 h a 30 °C y 250 rpm.

3.2.3. Condiciones de conservación de las células

Para conservar las células de *E. coli* de interés, se parte de 1,5 mL de cultivo líquido, se centrifuga 5 min a 14.000 rpm, el pellet celular se resuspende en 750 µL de medio LB y se añade 750 µL de glicerol al 50%.

Las esporas de *Streptomyces* recogidas de medio sólido se han conservado en glicerol al 20%.

Ambas suspensiones celulares se guardan a -20 °C para su posterior uso como inóculos.

3.2.4. Antibióticos

Las soluciones utilizadas se muestran en la siguiente tabla:

<i>Antibiótico</i>	<i>Solvente</i>	<i>Concentración almacén (mg/ml)</i>
<i>Kanamicina, Kn</i>	H ₂ O	50
<i>Cloranfenicol, Cm</i>	Etanol 100%	50
<i>Ampicilina, Ap</i>	H ₂ O	100
<i>Oxitetraciclina, Oxi</i>	DMSO 100%	40
<i>Estreptomicina, Sm</i>	H ₂ O	50

Tabla 3: Concentraciones de antibióticos utilizadas.

3.3. Aislamiento de ADN plasmídico

Los métodos de este apartado han sido los descritos por Sambrook *et al.* (2001) y Kieser *et al.* (2000).

3.3.1. Minipreparaciones de ADN plasmídico a partir de *E. coli*

La obtención de ADN plasmídico a pequeña escala desde *E. coli* se ha realizado siguiendo los protocolos que aparecen en el libro de Sambrook *et al.*, 2001 (adaptación del protocolo de extracción de ADN plasmídico de Birnboim y Doly, 1979) con algunas pequeñas modificaciones:

- Solución I: Tris-HCl 50 mM y EDTA 10 mM, pH= 8.
- Solución II: NaOH 0,1 N y SDS 1%.
- Solución III: Acetato potásico 2,5 M y ácido acético glacial hasta pH 5,5.
- Etanol 70%.
- Isopropanol absoluto.
- TE: Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM, pH= 8.

3.3.2. Minipreparaciones de ADN plasmídico a partir de *S. albus*

La obtención de ADN plasmídico a pequeña escala desde *S. albus* se ha realizado según el kit comercial “GeneJET Plasmid Miniprep Kit” de Thermo Scientific, siguiendo el protocolo recomendado.

3.4. Manipulación *in vitro* del ADN

3.4.1. Digestiones de ADN

Las digestiones de ADN con enzimas de restricción se han realizado siguiendo los métodos descritos por Sambrook *et al.* (2001). Los tampones y las condiciones de reacción han sido los recomendados por el fabricante.

- Enzimas de restricción: Takara, Roche, Thermo Fisher y EurX.
- RNasa: Sigma. Se preparó una concentración final de 10 mg/mL en Tris-HCl y NaCl 15 mM, calentándola a 90 °C durante 15 min, para luego dejarla enfriar a temperatura ambiente y almacenarla a -20 °C.
- En las desfosforilaciones, necesarias en algunos casos antes de la purificación de algunos de los plásmidos digeridos, se usaron 2 µL de fosfatasa alcalina “CIAP” (40 U/µL) (EURx) durante 10 min a 37 °C, en un volumen final de 100 µL.

3.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR se necesita para comprobar en algunos casos la correcta introducción de las bandas en los plásmidos, ya que algunos no se han podido comprobar mediante la digestión de ADN comentada en el apartado anterior, concretamente los plásmidos que presentar la resistencia a oxitetraciclina y en algunos casos los que presentan resistencia a estreptomicina.

El diseño de los oligonucleótidos cebadores se realizó tomando como referencia la secuencia nucleotídica de los fragmentos a amplificar. Para ello se tuvo en cuenta criterios como la proporción de CG, el tamaño, la temperatura de desnaturalización y la posible existencia de hibridaciones entre pareja de cebadores, así como hibridaciones intercadena que podrían interferir en la reacción de amplificación. Para facilitar este

proceso, se utilizaron herramientas informáticas como SnapGene en el diseño de los oligonucleótidos.

En la siguiente tabla se muestran los oligonucleótidos sintéticos utilizados para amplificar una región perteneciente a la resistencia a oxitetraciclina (OXYT) y a la resistencia a estreptomicina (SM).

<i>Oligonucleótidos</i>	<i>Secuencia de ADN (5'-3') up</i>	<i>Secuencia de ADN (5'-3') rp</i>
<i>CGG-OXYT</i>	TGGAGTTCAACGGCAAGGAC	GCGCGGACCGTTGTC
<i>CGG-SM</i>	ATCAGAGGTAGTTGGCGTCAT	AGGGTTATGCAGCGGAAAAG

Tabla 4: Secuencia de los oligonucleótidos up y rp para OXYT y SM.

El fragmento de amplificación con los oligonucleótidos OXYT tiene un tamaño de 698 pb, mientras que con los oligonucleótidos SM tiene un tamaño de 784 pb.

Condiciones de reacción de PCR

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo añadiendo los siguientes elementos a un volumen final de 50 μ l.

H ₂ O	34,5 μ L
Tampón Amplus, 10x (EURx)	5 μ L
Mezcla de desoxirribonucleótidos dNTPs (2mM)	5 μ L
Oligonucleótido up (20 μ M)	1,5 μ L
Oligonucleótido rp (20 μ M)	1,5 μ L
ADN molde	2 μ L
Polimerasa Amplus 5U/ μ l (EURx)	0,5 μ L

Tabla 5: Reactivos y volúmenes de la PCR.

El termociclador utilizado fue Veriti 96 Whell Thermal Cyclers (Applied Biosystems).

Programa de amplificación

El programa de amplificación estándar fue el siguiente:

- | | | | |
|----|--------------|------------------------------------|--------------------------------|
| 1. | 94 °C / 2´ | Paso inicial de desnaturalización. | } Ciclos de amplificación: 30x |
| 2. | 94 °C / 10´´ | | |
| 3. | 57 °C / 1´ | Anillamiento. | |
| 4. | 68 °C / 1´ | (1´ por cada Kb amplificada). | |
| 5. | 68 °C / 7´ | Paso final de la extensión. | |
| 6. | 4 °C / ∞ | Fin de reacción. | |

3.4.3. Electroforesis en gel de agarosa

Las electroforesis se realizaron con tampón TBE 1X (Tris-acetato 108 g, ácido bórico 55 g, EDTA 0,5 M 20 ml y agua hasta 1 L) como electrolito. La concentración de agarosa en el gel fue de 0,7 %. Las muestras de ADN se mezclaron con el tampón de carga 10X (100 mM de EDTA, 43 % glicerol y 0,5 % azul de bromofenol) utilizado como densificante y con RedSafe como marcador cromogénico bajo luz ultravioleta.

Los marcadores de peso molecular utilizados a lo largo del trabajo fueron “GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder” (Thermo Fisher), y “Perfect Plus™ 1 kb DNA Ladder” (EURx), 0,5 µg/µL. Estos se resuspendieron en 100 µL de tampón de carga (Thermo Fisher) y 400 µL de agua miliQ, a una concentración final de 0,1 µg/µL.

A las soluciones del ADN a cargar en los pocillos de agarosa se añadió el tampón de carga “Loading buffer 10x” (TaKaRa Biotechnology). Los geles se visualizaron en un equipo “Gel Doc 2000” (Bio-Rad).

3.4.4. Purificación de fragmentos de ADN

Finalizada la electroforesis, se cortó la agarosa con los fragmentos de ADN de interés con un bisturí estéril. Los fragmentos resultantes de los cortes con enzimas de restricción en geles de agarosa al 0,7 % se llevó a cabo con el kit comercial GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo scientific). Para purificar el ADN después de las

digestiones con enzimas de restricción se utilizó el kit de purificación StrataPrep®PCR (Agilent Technologies).

3.4.5. Ligaciones de ADN

En este apartado se tuvieron en cuenta las indicaciones descritas por Sambrook *et al.* (2001). La enzima utilizada fue la ADN ligasa del fago T4 (Invitrogen), la cual es apropiada para la unión de extremos cohesivos o romos. La proporción molar del vector respecto del fragmento a clonar fue al menos cuatro veces favorable al fragmento de interés, estando el vector en algunos casos defosforilado para evitar religaciones del mismo. Para las ligaciones romas se utilizó la ADN ligasa de 5 U/μL y se dejaron una noche a temperatura ambiente, mientras que para las ligaciones con extremos cohesivos se utilizó una ADN ligasa de 1 U/μL y se dejaron 2 h a temperatura ambiente.

3.5. Transformación con ADN plasmídico en *E. coli*

Las células competentes de *E. coli* CC118 se obtuvieron de cultivos en fase de crecimiento exponencial, induciendo la competencia con sales de calcio. La transformación de dichas células se realizó siguiendo el método descrito por Sambrook *et al.* (2001). Las células transformadas se sembraron en placas de TSA con el antibiótico de selección adecuado.

Antes de sembrar en placa, a la alícuota de células competentes transformada con el ADN plasmídico, se le añadió 1 mL de LB y se incubó en un eppendorf a 37 °C durante 1 h; así aseguramos que se exprese el gen de resistencia al antibiótico. Transcurrido este tiempo las células fueron sembradas en placas de TSA y se dejaron a 37 °C 24 h hasta observar colonias aisladas.

3.6. Obtención y transformación de protoplastos de *S. albus*

Para la obtención de protoplastos se siguieron los protocolos descritos por Kieser *et al.* (2000).

Para la transformación de protoplastos se cogen alícuotas de 200 μL y se les añade 20 μL de ADN plasmídico y 500 μL de PEG 6000 al 25% resuspendido en tampón P (103 g sacarosa, 0,25 g K₂SO₄, 2,02 g MgCl₂*6H₂O, 2 mL de los oligoelementos descritos en el apartado 3.2.1, y H₂O hasta 800 mL, suplementado tras autoclavar con: 1 mL KH₂PO₄ 0,5% + 10 mL CaCl₂ 3,68% + 10 mL TES 5,73% pH=7,2 por cada 80 mL). A

continuación se siembran placas de R5 que se incuban durante 24-30 h a 30 °C. Una vez se observa regeneración del micelio, se añaden 1,5 mL de H₂O con el antibiótico correspondiente y se incuban 7 días a 30 °C.

3.7. Replicación de colonias con terciopelo

Para replicar colonias de *Streptomyces* con terciopelo, se coloca la placa con las colonias a replicar sobre el terciopelo estéril durante 20 segundos y seguidamente se deposita sobre el mismo una placa de medio nueva con el antibiótico correspondiente y se incuban a 30 °C hasta la aparición de nuevas colonias.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Búsqueda bioinformática

Mediante la búsqueda bioinformática se obtuvieron las secuencias publicadas de los genes de resistencia necesarios, y se diseñaron las secuencias finales para CGG-Resistance-*otrA* (resistencia a oxitetraciclina), CGG-Replicon-SCP2* (origen de bajo número de copias en *Streptomyces*) y LTS-Integron-*attP* (secuencia *attP* e integrasa en *Streptomyces*) que se introdujeron en el plásmido pUC57, flanqueados por sitios de restricción compatibles en cada caso para lograr la posición y la orientación adecuada en los plásmidos base en los que posteriormente se introducen. Además estas secuencias sintéticas presentan codones optimizados y sitios de unión al ribosoma adecuados para *Streptomyces*, así como ausencia de sitios de restricción.

4.2. Obtención del cassette génico Replicon-SCP2* e introducción en el plásmido pSEVA221

El cassette génico sintético del Replicon-SCP2* se encontraba clonado en el plásmido pUC57 (pCGG-SCP2*), por lo cual se tuvieron que realizar una serie de pasos que permitieran obtener únicamente la secuencia perteneciente a este cassette. Para ello se realizó un aislamiento de este plásmido desde *E. coli*, su comprobación con *Bam*HI y *Hind*III (4,2 y 0 kb) y *Xba*I y *Pst*I (2,7 y 1,5 kb) (Fig. 10), su digestión con las enzimas *Asc*I y *Mlu*I, separación de fragmentos en un gel de agarosa y purificación de la banda correspondiente de 1,5 kb.

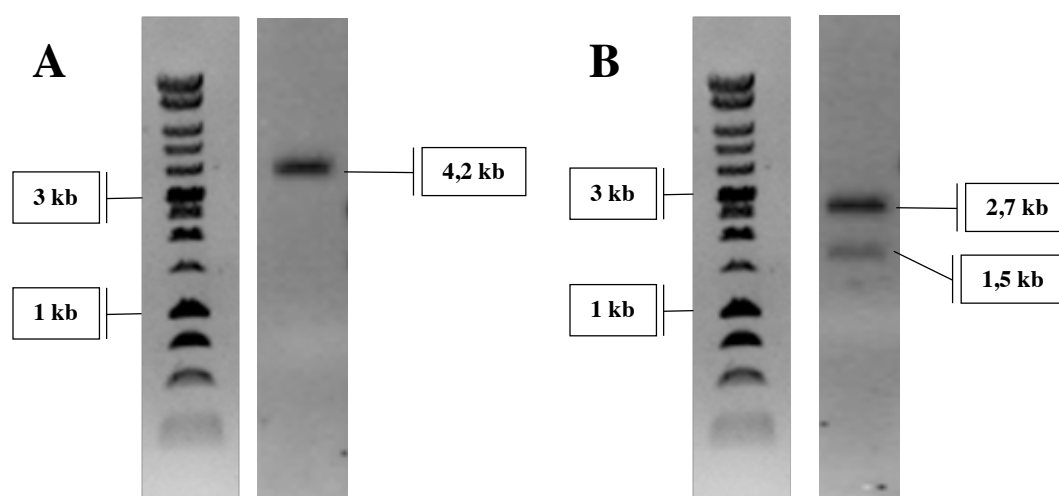


Figura 10: Digestión del plásmido pCGG-SCP2* con *Bam*HI y *Hind*III (A) y *Xba*I y *Pst*I (B).

Una vez se obtuvo el cassette Replicon-SCP2*, se ligó con el plásmido base pSEVA181 digerido previamente con *AscI* y desfosforilado, para obtener el vector pCGG3 (Fig. 11). A continuación se transformó la ligación de este vector (5 μ L) en células competentes de *E. coli*, donde se obtuvieron colonias aisladas.

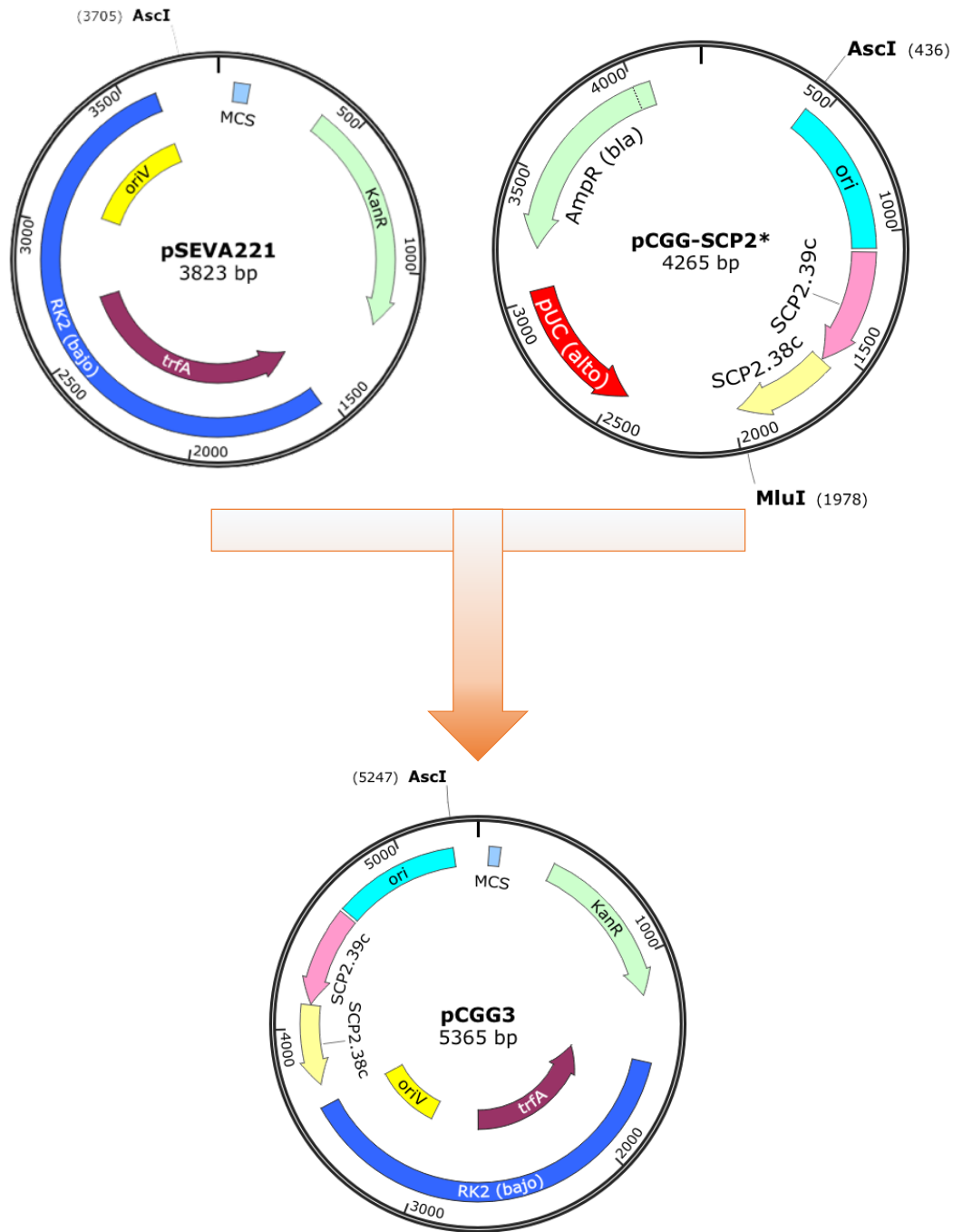


Figura 11: Genealogía del plásmido pCGG3 (bajo número de copias en *E. coli* y en *Streptomyces*).

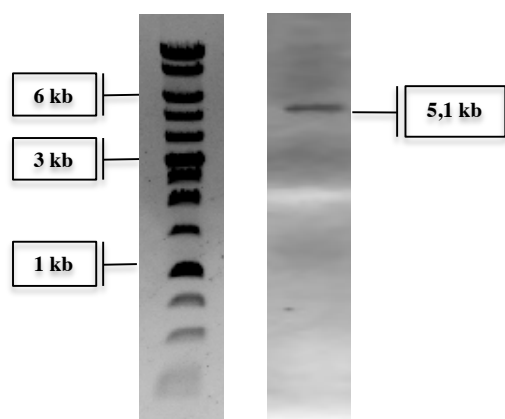


Figura 12: Digestión de comprobación del plásmido pCGG3 con *AscI* y *EcoRI* (la segunda banda liberada, de 0,2 kb, no se aprecia en la foto).

Se comprobó mediante digestión con *AscI* y *EcoRI* en el ADN plasmídico obtenido desde 12 colonias de la transformación con pCGG3, que el cassette génico se había introducido con la orientación deseada (5,1 y 0,2 kb) y por tanto el plásmido pCGG3 estuviera correcto (Fig. 12).

4.3. Obtención de los plásmidos pCGG4, pCGG5 y pCGG6

Plásmido	Origen en <i>E. coli</i>	Origen en <i>Streptomyces</i>	Resistencia
<i>pCGG4</i>	RK2	SCP2*	Oxitetraciclina
<i>pCGG5</i>	RK2	SCP2*	Cloranfenicol
<i>pCGG6</i>	RK2	SCP2*	Estreptomicina

Tabla 6: Resumen de las características de los plásmidos pCGG4, pCGG5 y pCGG6 (RK2 replicón de bajo número de copias en *E. coli*, SCP2* replicón de bajo número de copias en *Streptomyces*).

El gen sintético diseñado *otrA* se encontraba clonado en el plásmido pUC57 (*pCGG-otrA*). Para comprobar dicho plásmido se realizó un aislamiento desde *E. coli* y se digirió con *EcoRI* y *XhoI* (0,6; 1,5 y 3,3 kb) y *HindIII* y *ScaI* (3,5 y 1,7 kb) (Fig. 13).

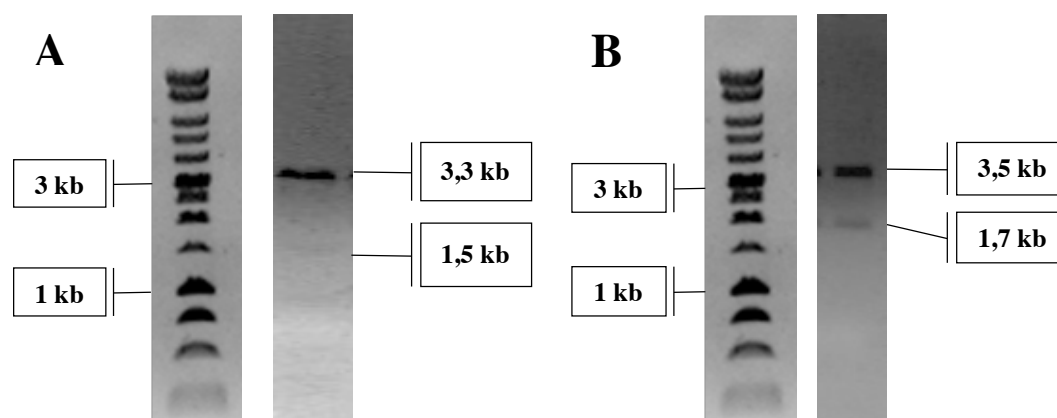


Figura 13: Digestión de comprobación del plásmido pCGG-otrA con *EcoRI* y *XhoI* (A) y *HindIII* y *ScaI* (B).

Para obtener las bandas correspondientes a los genes de resistencia a oxitetraciclina, kanamicina, cloranfenicol y estreptomomicina se digirieron los plásmidos pCGG-*ortA*, pSEVA331 y pSEVA451 con las enzimas *SwaI* y *PshAI*, se realizó un gel de agarosa y se aislaron y purificaron las bandas correspondientes de 2,6; 0,8 y 1 kb respectivamente.

A continuación se ligaron estas bandas con el plásmido pCGG3 previamente digerido con *SwaI* y *PshAI* obteniéndose los plásmidos pCGG4, pCGG5 y pCGG6 (Fig. 14).

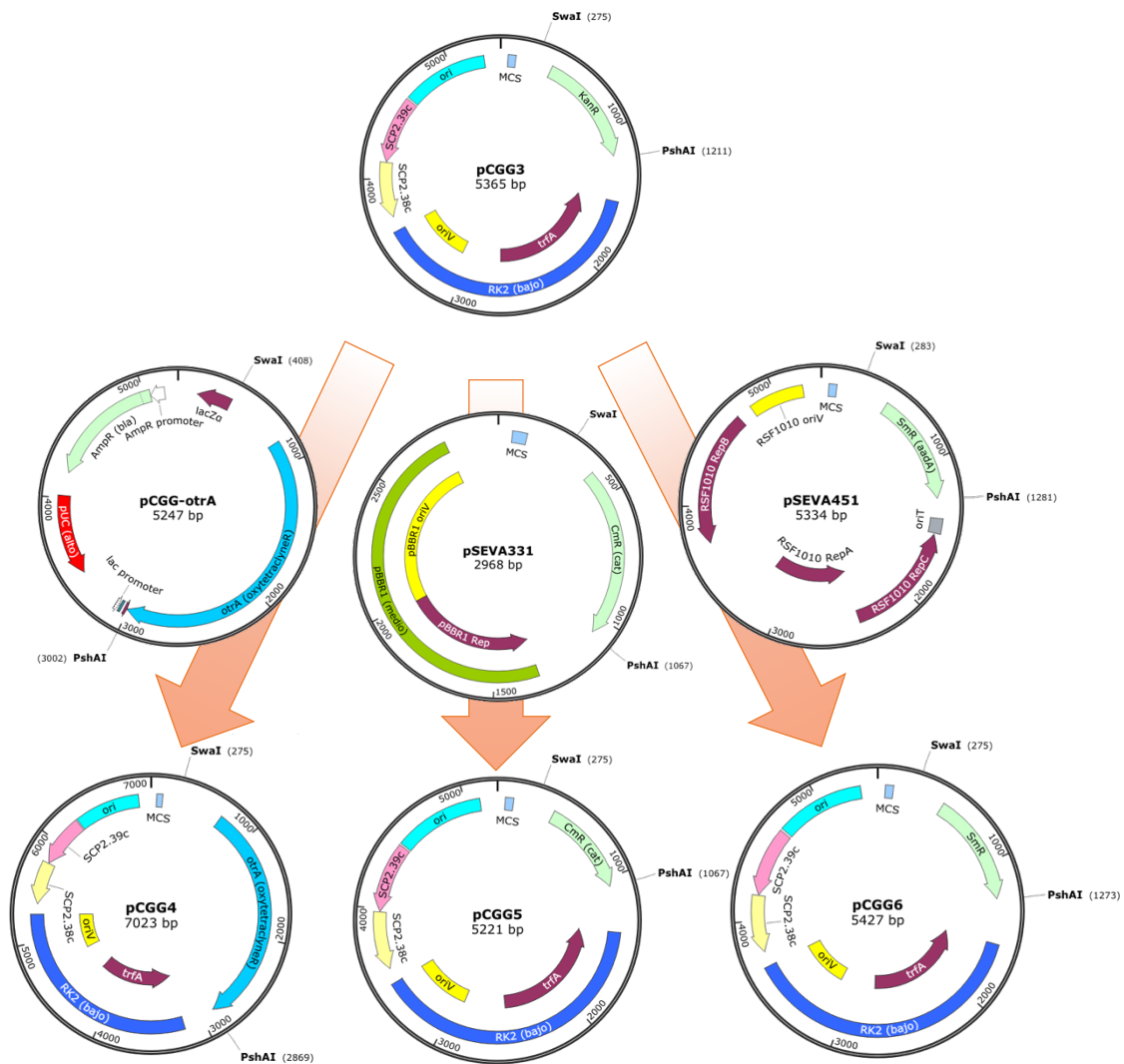


Figura 14: Genealogía de los plásmidos pCGG4, pCGG5 y pCGG6

Se transformaron dichas ligaciones (5 μ L) en células competentes de *E. coli*. Se obtuvieron colonias aisladas y se comprobó la correcta introducción de los genes mediante PCR en el caso de pCGG4 y pCGG6 y mediante digestión con *ScaI* y *EcoRI* en el caso de pCGG5 (4,1 y 1 kb) (Fig. 15).

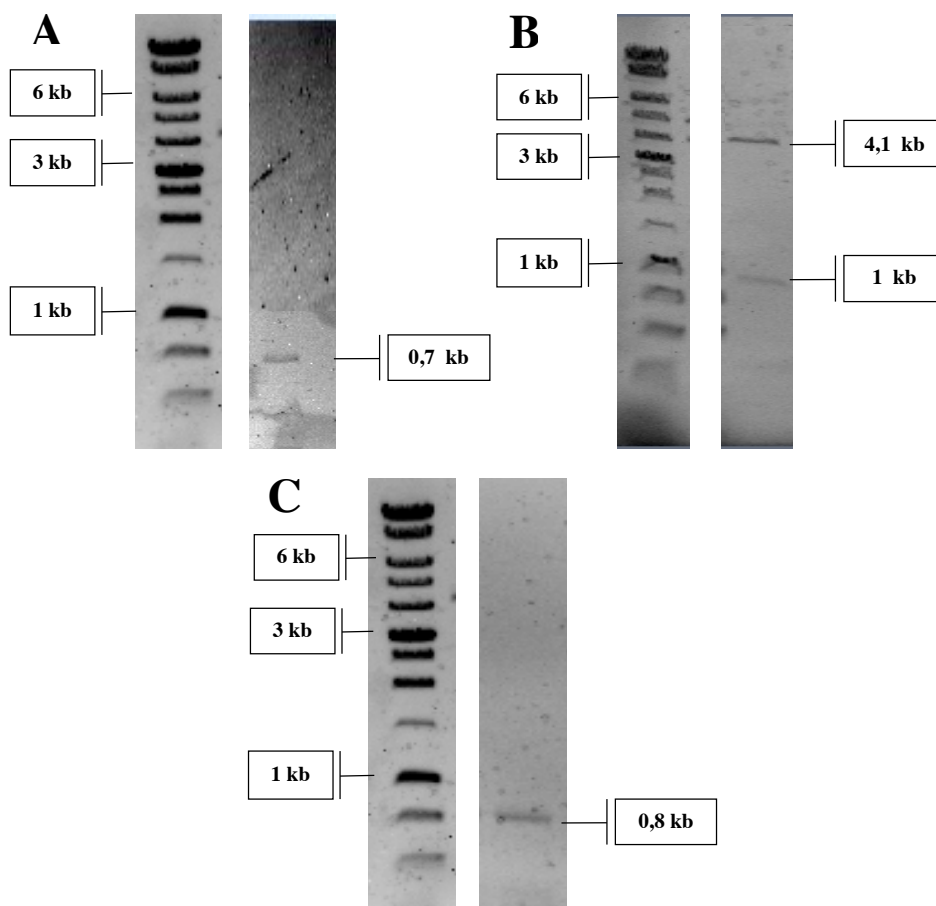


Figura 15: PCR de comprobación de los plásmidos pCGG4 (A), pCGG6 (C) y digestión de comprobación del pCGG5 con *ScaI* y *EcoRI* (B).

4.4. Introducción del cassette génico Replicon-SCP2* en el plásmido pSEVA181

El procedimiento es el mismo que en el apartado 4.2, partiendo del cassette génico Replicon-SCP2* aislado y ligándolo con el plásmido pSEVA181 previamente digerido con *AscI* y desfosforilado, obteniéndose como resultado el plásmido pCGG7 (Fig. 16).

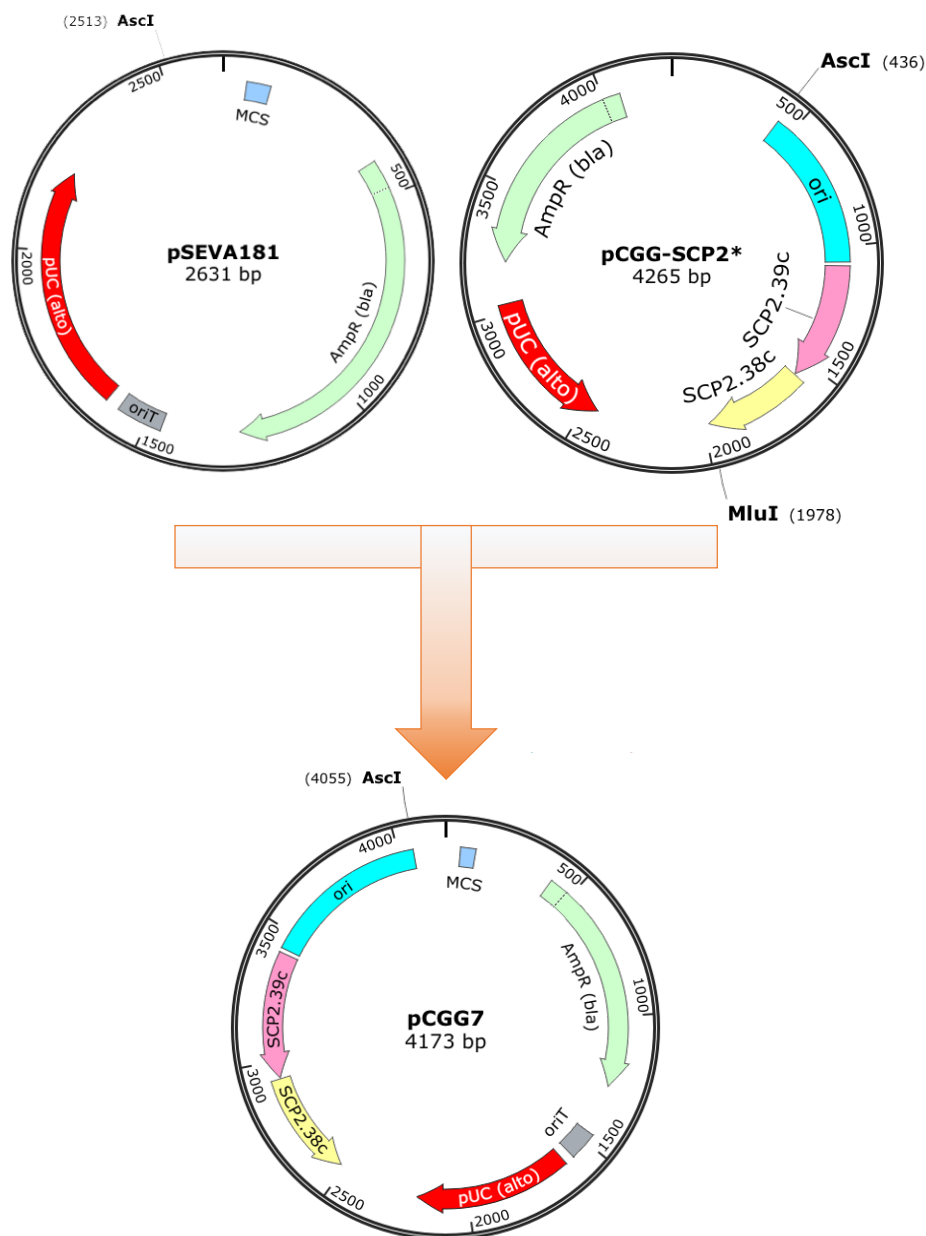


Figura 16: Genealogía del plásmido pCGG7 (alto número de copias en *E. coli*, bajo número de copias en *Streptomyces*).

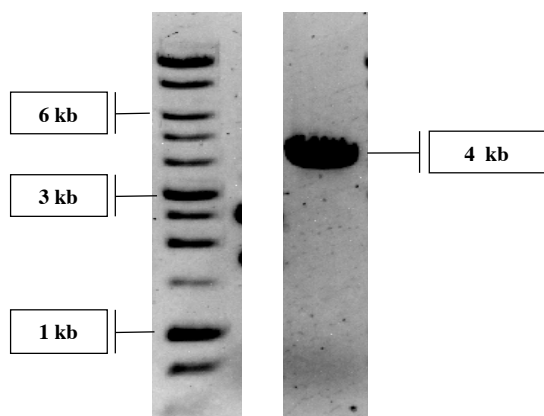


Figura 17: Digestión de comprobación del plásmido pCGG7 con *AscI* y *EcoRI* (la banda de 0,2 kb no se aprecia en la foto).

Se comprobó mediante digestión con *AscI* y *EcoRI* en el ADN plasmídico obtenido desde 12 colonias de la transformación con pCGG7, que el cassette génico se había introducido con la orientación deseada (4 y 0,2 kb) (Fig. 17).

4.5. Obtención de los plásmidos pCGG8, pCGG9, pCGG10 y pCGG11

Plásmido	Origen en <i>E. coli</i>	Origen en <i>Streptomyces</i>	Resistencia
<i>pCGG8</i>	pUC	SCP2*	Kanamicina
<i>pCGG9</i>	pUC	SCP2*	Oxitetraciclina
<i>pCGG10</i>	pUC	SCP2*	Cloranfenicol
<i>pCGG11</i>	pUC	SCP2*	Estreptomina

Tabla 7: Resumen de las características de los plásmidos pCGG8, pCGG9, pCGG10 y pCGG11 (pUC replicón de alto número de copias en *E. coli*, SCP2* replicón de bajo número de copias en *Streptomyces*).

El procedimiento es el mismo que el descrito en el apartado 4.3, se digieren los plásmidos pSEVA221, pCGG-*ortA*, pSEVA331 y pSEVA451 con *SwaI* y *PshAI* y estas bandas se introducen en el plásmido pCGG7 previamente digerido con *SwaI* y *PshAI* para obtener respectivamente los plásmidos pCGG8, pCGG9, pCGG10 y pCGG11 (Fig. 18).

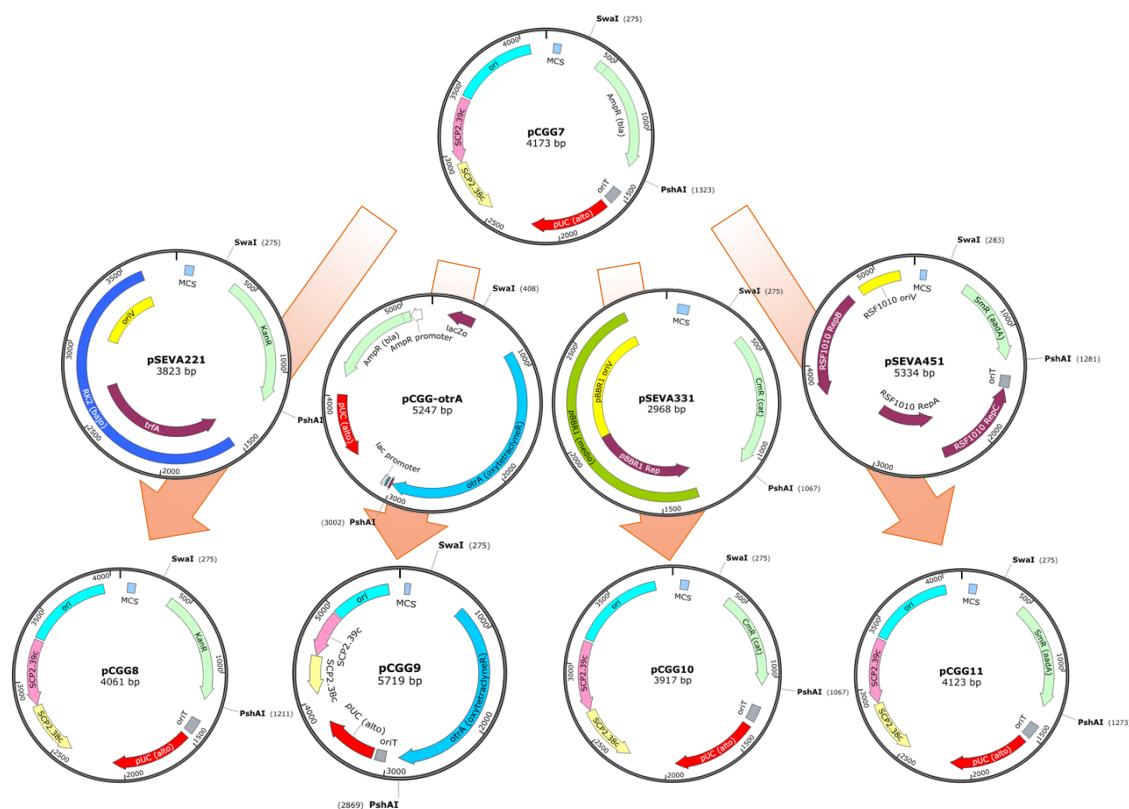


Figura 18: Genealogía de los plásmidos pCGG8, pCGG9, pCGG10 y pCGG11

Se transformaron dichas ligaciones (5 μ L) en células competentes de *E. coli*. Se obtuvieron colonias aisladas y se comprobó la correcta introducción de los genes mediante PCR en el caso de pCGG9 y mediante digestión con *NsiI* y *EcoRI* para el plásmido pCGG8 (3,2 y 0,8 kb), con *ScaI* y *EcoRI* para pCGG10 (3 y 0,9 kb) y con *DraI* y *PshAI* para pCGG11 (3,2 y 0,9 kb) (Fig. 19).

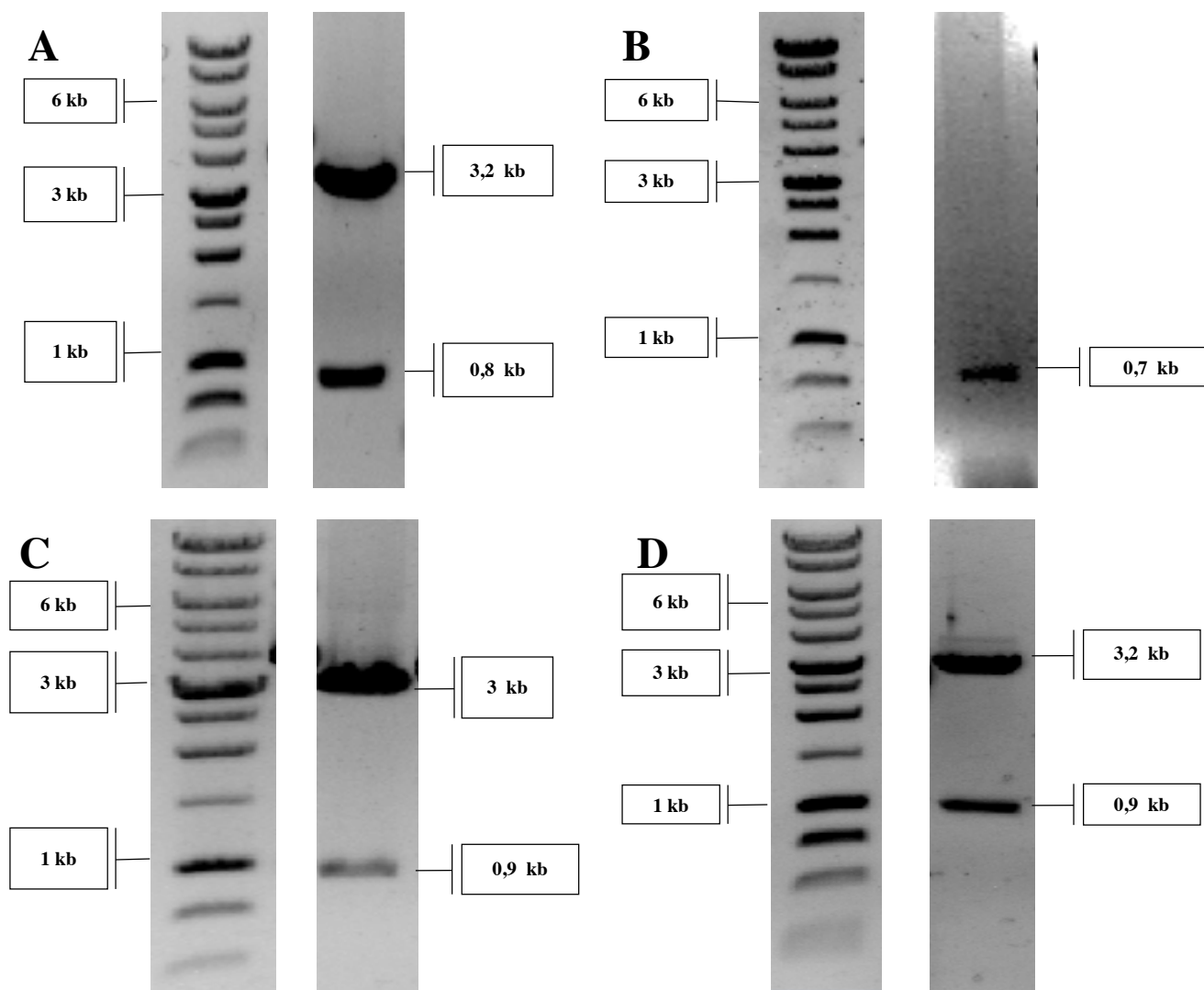


Figura 19: Digestión de comprobación del plásmido pCGG8 con *NsiI* y *EcoRI* (A), PCR de comprobación del plásmido pCGG9 (B), digestión de comprobación de los plásmidos pCGG10 con *ScaI* y *EcoRI* y pCGG11 con *DraI* y *PshAI*.

4.6. Introducción del cassette génico Replicon-SCP2* en el plásmido pSEVA331

El procedimiento es el mismo que en el apartado 4.2, se partió del cassette génico Replicon-SCP2* aislado y se ligó con el plásmido pSEVA331 previamente digerido con *AscI* y desfosforilado, obteniéndose como resultado el plásmido pCGG12 (Fig. 20).

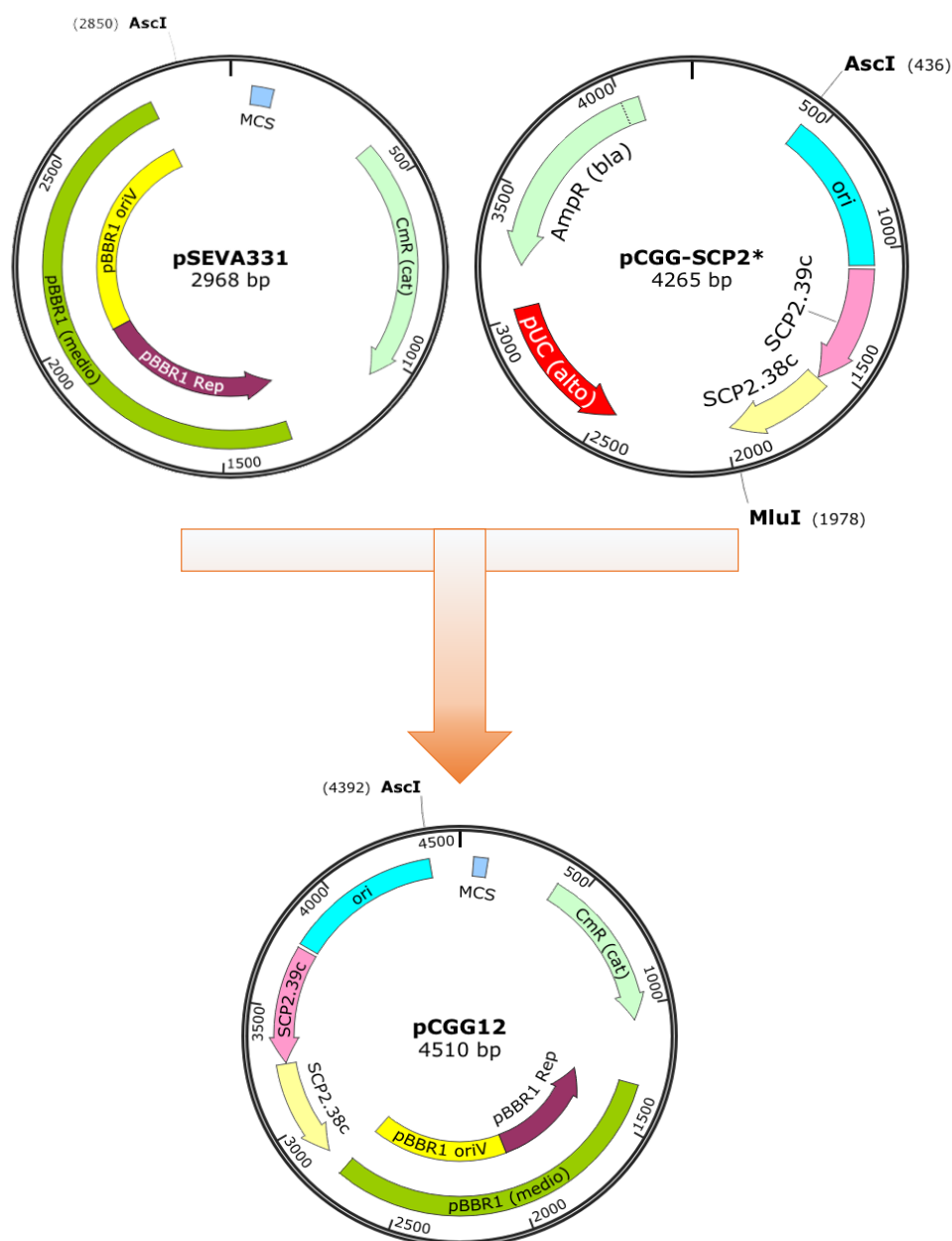


Figura 20: Genealogía del plásmido pCGG12 (medio número de copias en *E.coli* y bajo número de copias en *Streptomyces*).

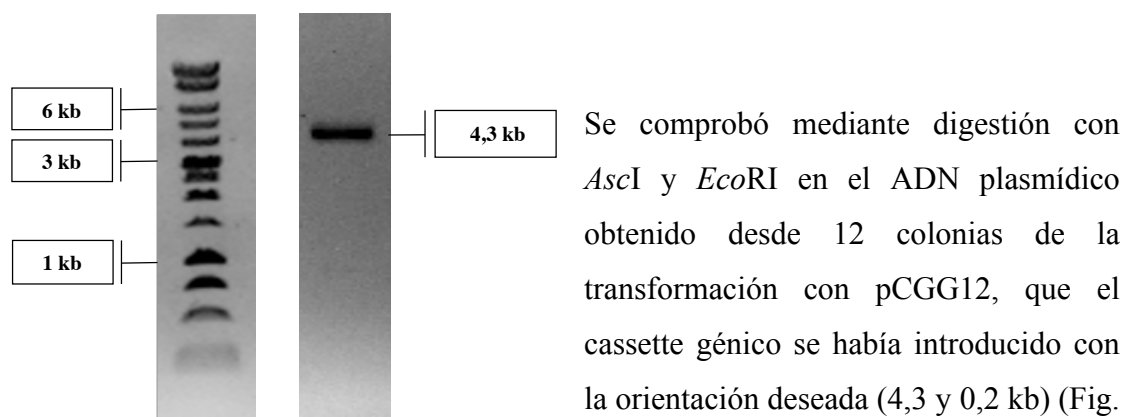


Figura 21: Digestión de comprobación del plásmido pCGG12 con *AscI* y *EcoRI* (en este gel no se aprecia la banda de 0,2 kb liberada).

4.7. Obtención de los plásmidos pCGG13, pCGG14 y pCGG15

<i>Plásmido</i>	<i>Origen en E. coli</i>	<i>Origen en Streptomyces</i>	<i>Resistencia</i>
<i>pCGG13</i>	pBBR1	SCP2*	Kanamicina
<i>pCGG14</i>	pBBR1	SCP2*	Oxitetraciclina
<i>pCGG15</i>	pBBR1	SCP2*	Estreptomicina

Tabla 8: Resumen de las características de los plásmidos pCGG13, pCGG14 y pCGG15 (pBBR1 replicón de medio número de copias, SCP2* replicón de bajo número de copias en *Streptomyces*).

El procedimiento es el mismo que el descrito en el apartado 4.3, se digieren los plásmidos pSEVA221, pCGG-*ortA* y pSEVA451 con *SwaI* y *PshAI* y estas bandas se introducen en el plásmido pCGG12 previamente digerido con *SwaI* y *PshAI* para obtener respectivamente los plásmidos pCGG13, pCGG14 y pCGG15 (Fig. 22).

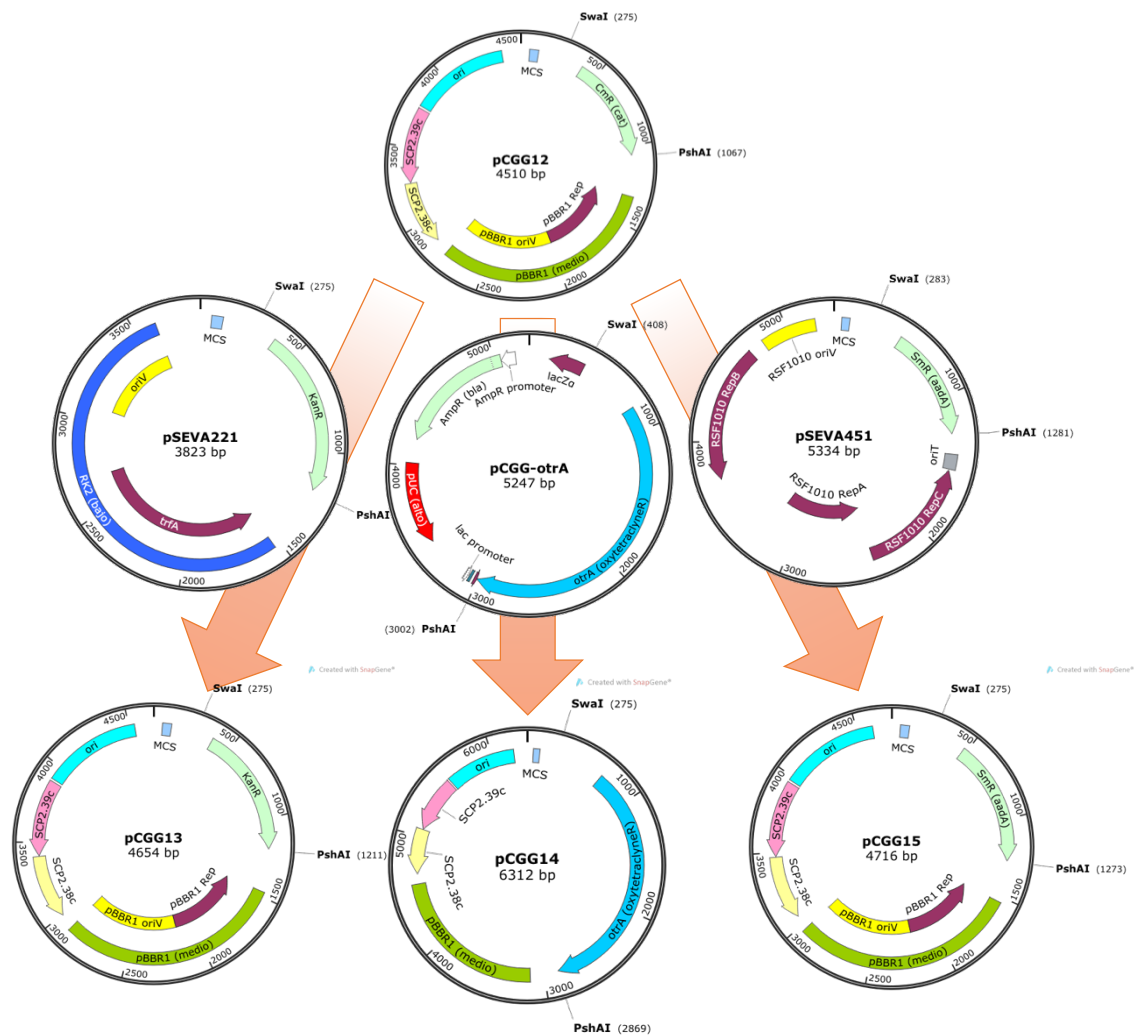


Figura 22: Genealogía de los plásmidos pCGG13, pCGG14 y pCGG15

Se transformaron dichas ligaciones (5 μ L) en células competentes de *E. coli*. Se obtuvieron colonias aisladas y se comprobó la correcta introducción de los genes mediante digestión con *NsiI* y *EcoRI* para el plásmido pCGG13 (3,8 y 0,8 kb) y mediante PCR en el caso de pCGG14 y pCGG15 (Fig. 23).

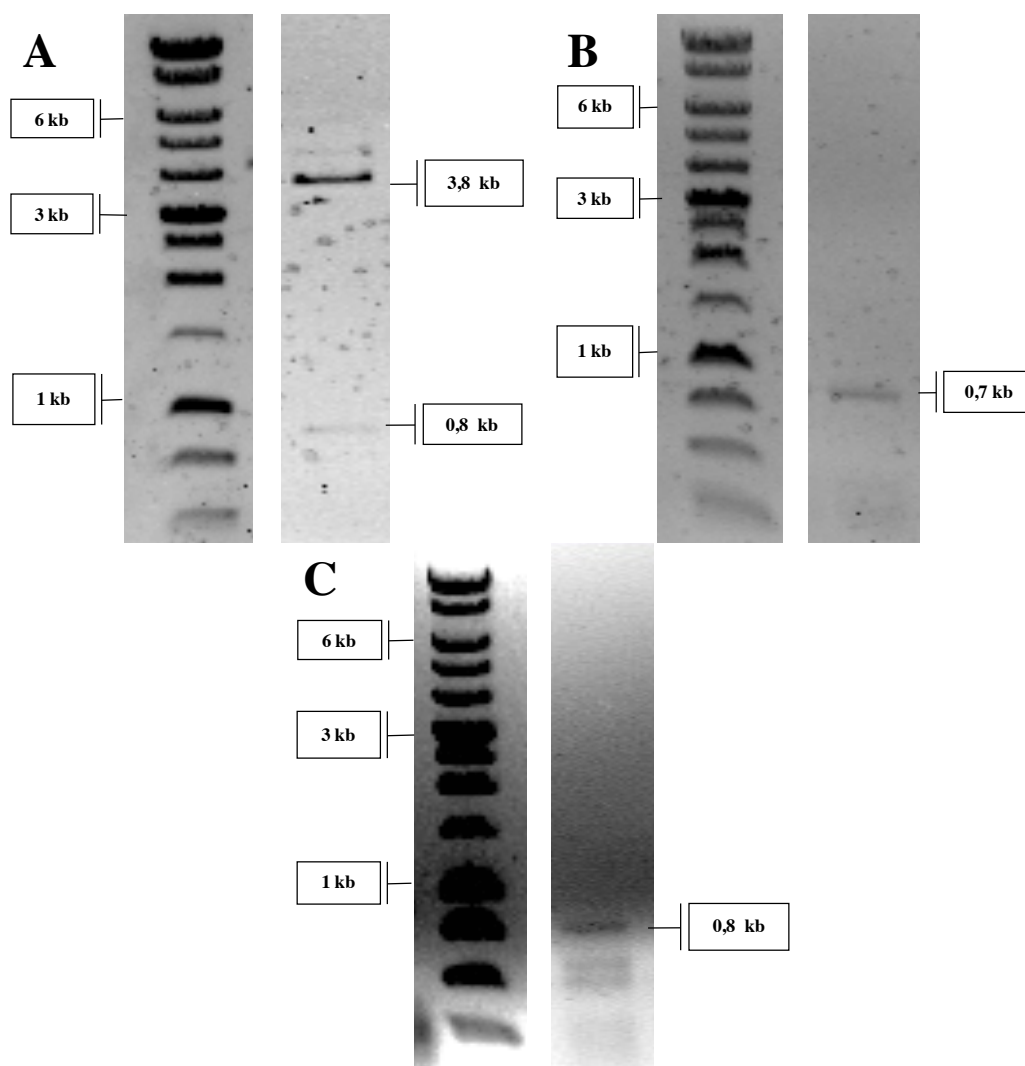


Figura 23: Digestión de comprobación del plásmido pCGG13 con *NsiI* y *EcoRI* (A), PCR de comprobación de los plásmidos pCGG14 (B) y pCGG15 (C).

4.1. Obtención del cassette génico *Integron-attP* e introducción en el plásmido pSEVA181

El cassette génico sintético del *Integron-attP* se encontraba clonado en el plásmido pUC57 (pLTS-*Integron*), por lo cual se tuvieron que realizar una serie de pasos que permitieran obtener únicamente la secuencia perteneciente a este cassette. Para ello se realizó un aislamiento de este plásmido desde *E. coli*, su comprobación con *ScaI* y *XhoI* (2,6 y 2,2 kb) (Fig. 24), su digestión con las enzimas *AscI* y *MluI*, gel de agarosa y purificación de la banda correspondiente de 2,1 kb.

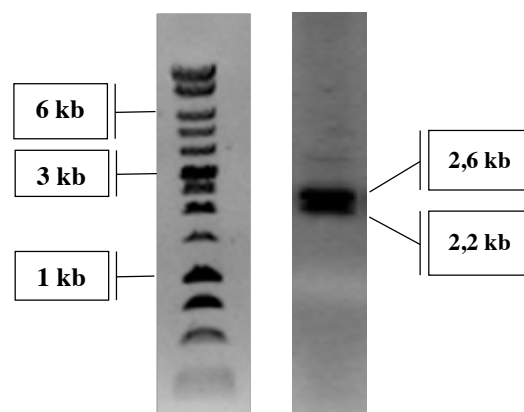


Figura 24: Digestión de comprobación del plásmido pLTS-*Integron* con *ScaI* y *XhoI*.

Una vez se obtuvo el cassette Integron-*attP*, se ligó con el plásmido base pSEVA181 digerido previamente con *AscI* y desfosforilado, para obtener el vector pCGG24 (Fig. 25). A continuación se transformó la ligación de este vector (5 μ L) en células competentes de *E. coli*, donde se obtuvieron colonias aisladas.

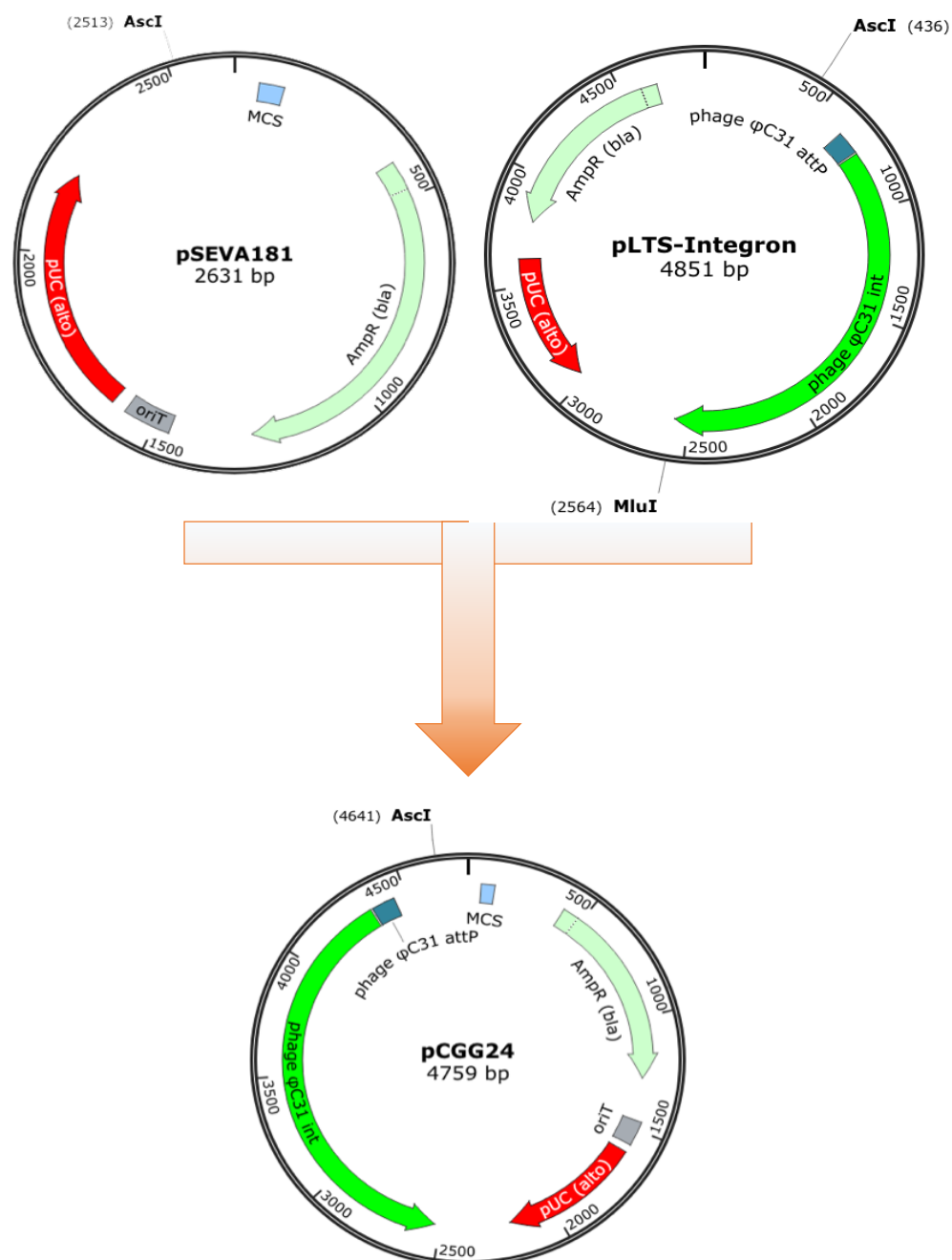
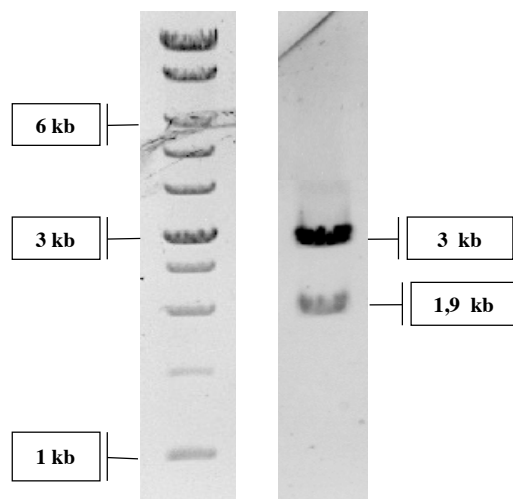


Figura 25: Genealogía del plásmido pCGG24 (alto número de copias en *E. coli E. coli*, integrativo en *Streptomyces*).



Se comprobó, mediante digestión con *EcoRI* y *XhoI* en el ADN plasmídico obtenido desde 12 colonias de la transformación con pCGG24, que el cassette génico se había introducido con la orientación deseada (3 y 1,9 kb) (Fig. 26).

Figura 26: Digestión de comprobación del plásmido pCGG24 con *EcoRI* y *XhoI*.

4.2. Obtención de los plásmidos pCGG25, pCGG26, pCGG27

<i>Plásmido</i>	<i>Origen en E. coli</i>	<i>Origen en Streptomyces</i>	<i>Resistencia</i>
<i>pCGG25</i>	pUC	Integrón-attP	Kanamicina
<i>pCGG26</i>	pUC	Integrón-attP	Oxitetraciclina
<i>pCGG27</i>	pUC	Integrón-attP	Cloranfenicol

Tabla 9: Resumen de las características de los plásmidos pCGG25, pCGG26 y pCGG27 (pUC replicón de alto número de copias).

El procedimiento es el mismo que el descrito en el apartado 4.3, se digieren los plásmidos pSEVA221, pCGG-*ortA* y pSEVA331 con *SwaI* y *PshAI* y estas bandas se introducen en el plásmido pCGG24 previamente digerido con *SwaI* y *PshAI* para obtener respectivamente los plásmidos pCGG25, pCGG26 y pCGG27 (Fig. 27).

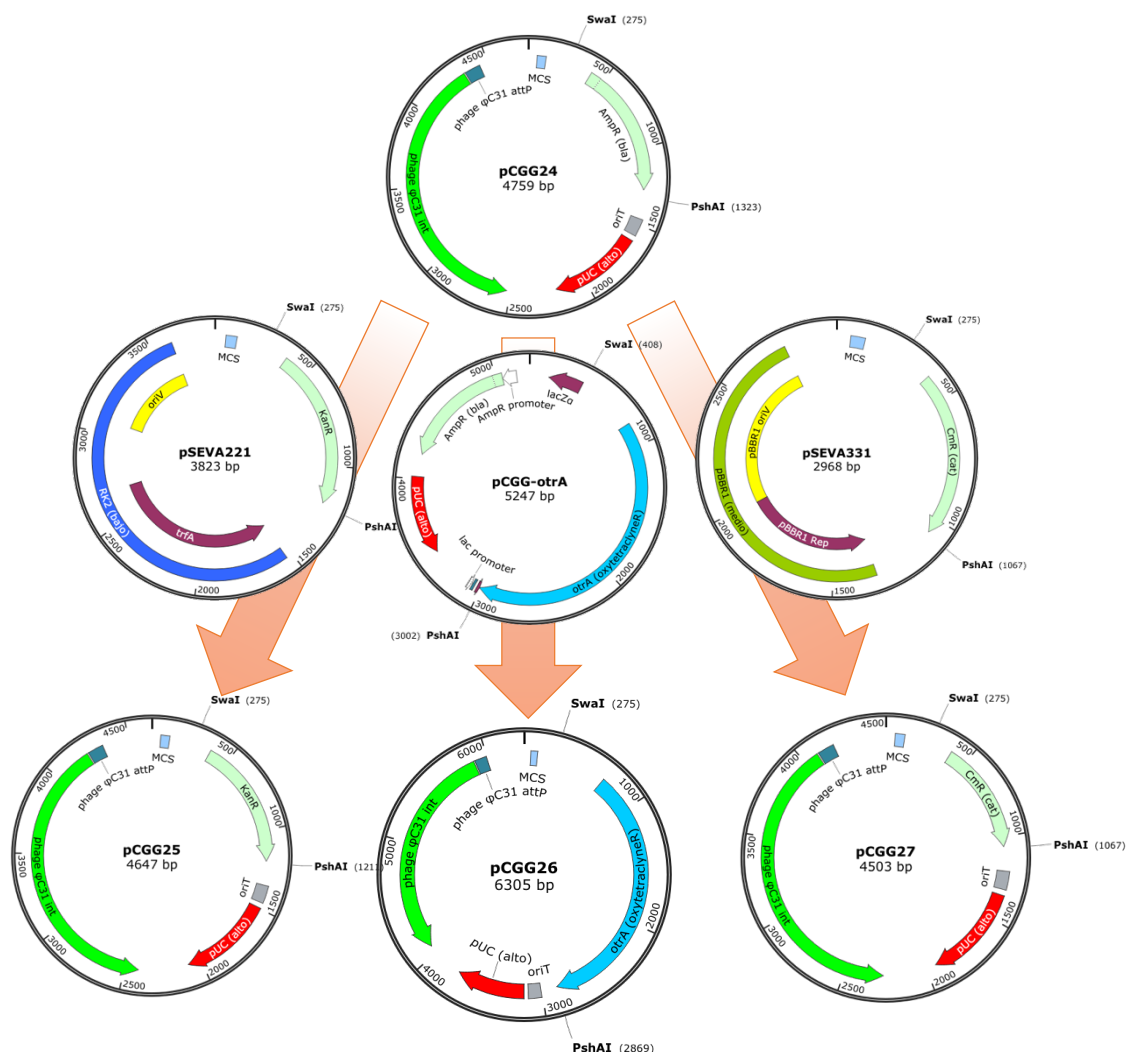


Figura 27: Genealogía de los plásmidos pCGG25, pCGG26 y pCGG27.

Se transformaron dichas ligaciones (5 μ L) en células competentes de *E. coli*. Se obtuvieron colonias aisladas y se comprobó la correcta introducción de los genes mediante digestión del plásmido pCGG25 con *Nsi*I y *Eco*RI (3,8 y 0,9 kb), del pCGG27 con *Sca*I y *Eco*RI (3,6 y 0,9 kb) y mediante PCR en el caso de pCGG26 (Fig. 28).

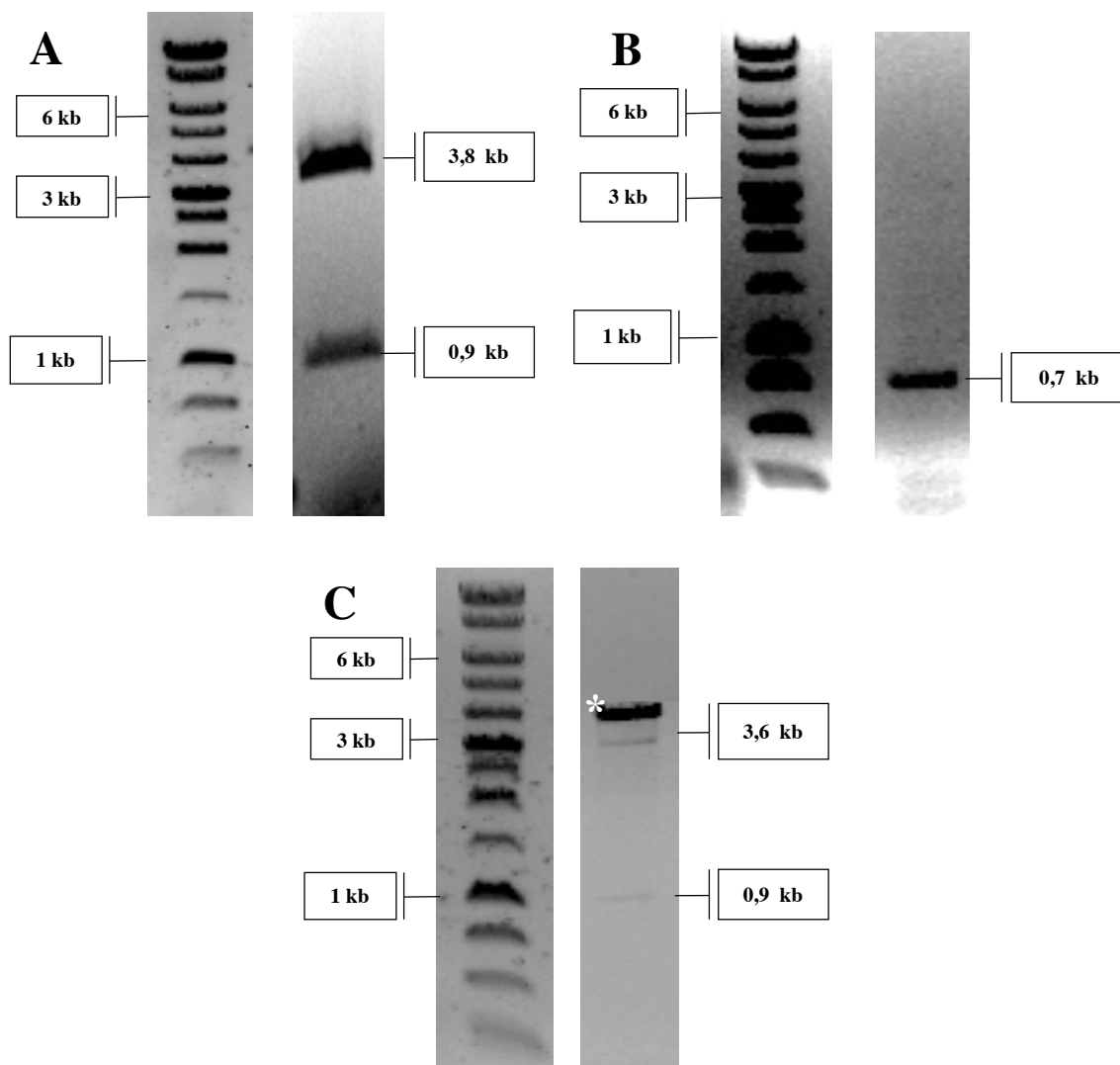


Figura 28: Digestión de comprobación digestión del plásmido pCGG25 con *NsiI* y *EcoRI* (A), del pCGG27 con *ScaI* y *EcoRI* (C) y PCR de comprobación del pCGG26 (B). *Banda corresponde al plásmido sin digerir, se puede deber a una baja actividad de los enzimas o a un escaso tiempo de incubación.

4.3. Transformación de protoplastos de *S. albus* J1074 con pCGG3

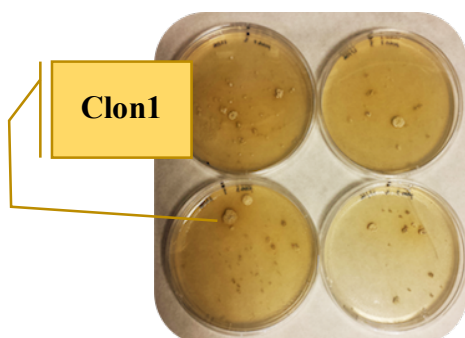


Figura 29: Colonias de *S. albus* transformadas con pCGG3 en medio Bennet.

Una vez comprobado el plásmido pCGG3, se transformó 20 μ L del mismo en protoplastos de *S. albus* J1074, a las 24 h de incubación a 30 °C se añadió el antibiótico de selección a estas placas (25 μ g/mL de kanamicina, concentración final) y se esperó 7 días a 30 °C hasta la aparición de colonias. Tras lo cual se observó que la selección con la kanamicina añadida había sido incompleta, ya que se veía crecimiento en toda la

placa y no colonias aisladas. Por lo tanto se procedió a realizar replicas con terciopelo de las placas iniciales en medio Bennet en kanamicina. En este caso si se observaron colonias aisladas, clones positivos (Fig. 29).

A continuación se picaron estas colonias y se aislaron en placas nuevas hasta que esporularon y se recogieron las esporas.

Paralelamente se inocularon matraces de TSB con estas esporas. Tras 24 h de incubación a 30 °C y 250 rpm, se hizo una extracción de ADN plasmídico en aquellos matraces en los que se observaba un buen crecimiento (clon 1 (Fig. 29)) y se transformó este ADN plasmídico en *E. coli*, obteniéndose clones positivos en esta bacteria Gram-negativa (Fig. 30), y observándose el plásmido pCGG3 en minipreparaciones desde estas colonias, lo que indicaba por tanto la introducción del plásmido pCGG3 de forma correcta en *S. albus* J1074.

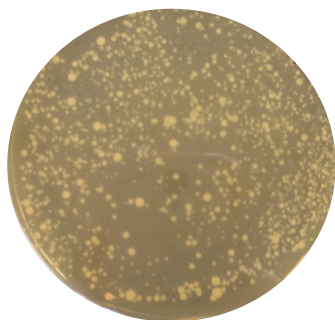


Figura 30: Clones positivos de *E.coli* que demuestran la correcta introducción del plásmido pCGG3 en *Streptomyces*.

5. Conclusiones

Se han construido los plásmidos pCGG3 al pCGG15, que contienen los orígenes de replicación en *E. coli* (RK2 para bajo número de copias, pUC para alto número de copias y pBBR1 para medio número de copias), un origen de *Streptomyces* (SCP2*) y los genes de resistencia frente a kanamicina, oxitetraciclina, cloranfenicol y estreptomicina.

Se han construido los plásmidos pCGG24 al pCGG27, que contienen el origen de replicación en *E. coli* (pUC), el integrón del fago ϕ C31 de *Streptomyces* y los genes de resistencia frente a kanamicina, oxitetraciclina y cloranfenicol.

Se han conseguido clones de *S. albus* J1074 que contienen el plásmido pCGG3, comprobándose por tanto que el plásmido es bifuncional y que puede ser utilizado tanto en *E. coli* como en *Streptomyces*.

6. Perspectivas futuras

Construir el plásmido pCGG28, que contenga el origen de replicación en *E. coli* (pUC), el integrón del fago φ C31 de *Streptomyces* y el gen de resistencia frente a estreptomycin.

Adicionalmente, en un futuro se transformarían protoplastos de *S. albus* J1074 con el resto de los plásmidos. Esto demostraría de manera definitiva que los genes de resistencia a los antibióticos seleccionados funcionan en esta cepa y nos permitiría usarlo como antibiótico de selección por tanto en las dos especies de estudio.

7. Bibliografía

- Anindyajati, A. A. Artarini, Catur Riani & D. S. Retnoningrum (2016). Plasmid Copy Number Determination by Quantitative Polymerase Chain Reaction. *Sci Pharm*, 84, 89–101.
- Anné, J., Maldonado, B., Van Impe, J., Van Mellaert, L. & Bernaerts, K. (2012). Recombinant protein production and streptomycetes. *Journal of Biotechnology*, 158(4), 159–167.
- Antoine, R., & Loch, C. (1992). Isolation and molecular characterization of a novel broad-host-range plasmid from *Bordetella bronchiseptica* with sequence similarities to plasmids from gram-positive organisms. *Molecular Microbiology*, 6(13), 1785–1799.
- Butler, M. J., Friend, E. J., Hunter, I. S., Kaczmarek, F. S., Sugden, D. A. & Warren, M. (1989). Molecular cloning of resistance genes and architecture of a linked gene cluster involved in biosynthesis of oxytetracycline by *Streptomyces rimosus*. *Molecular and General Genetics*, 215(2), 231–238.
- Connell, S. R., Tracz, D. M., Nierhaus, K. H., & Taylor, D. E. (2003). Ribosomal Protection Proteins and Their Mechanism of Tetracycline Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(12), 3675–3681.
- Doyle, D., McDowall, K. J., Butler, M. J. & Hunter, I. S. (1991). Characterization of an oxytetracycline-resistance gene, *otrA*, of *Streptomyces rimosus*. *Molecular Microbiology*, 5(12), 2923–2933.
- Górny, R. L., Mainelis, G., Grinshpun, S. A., Willeke, K., Dutkiewicz, J. & Reponen, T. (2003). Release of *Streptomyces albus* propagules from contaminated surfaces. *Environmental Research*, 91(1), 45–53.
- Gowrishankar, J. (2015). End of the Beginning: Elongation and Termination Features of Alternative Modes of Chromosomal Replication Initiation in Bacteria. *PLOS Genetics*, 11(1).
- Gregory, M. A. & Smith, M. C. M. (2003). Integration Site for *Streptomyces* Phage ϕ BT1 and Development of Site-Specific Integrating Vectors. *Society*, 185(17), 5320–5323.
- Hansen, M. P., Hoffmann, T. C., McCullough, A. R., van Driel, M. L. & Del Mar, C. B. (2015). Antibiotic Resistance: What are the Opportunities for Primary Care in Alleviating the Crisis? *Frontiers in Public Health*, 1–7.
- Katzung, B.G., Masters, S.B., Trevor, A.J. (2012). Aminoglycosides & Spectinomycin. Basic and Clinical Pharmacology, 821-, 12^a ed. San Francisco: Mc Graw Hill Medical.
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F. & Hopwood, D. A. (2000). Practical *Streptomyces* Genetics. *John Innes Foundation*.
- Lederberg, M. (1952). Replica plating and indirect selection of mutants. *Journal of Bacteriology*, 63(3).

- Lin-Chao, S., Chen, W. & Wong, T. (1992). High copy number of the pUC plasmid results from a Rom/Rop-suppressible point mutation in RNA II. *Molecular Microbiology*, 6(22), 3385–3393.
- Manoil, C., & Beckwith, J. (1985). Tnp ϕ A: a transposon probe for protein export signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82, 8129–8133.
- Martínez-García, E., Aparicio, T., Goñi-Moreno, A., Fraile, S., & de Lorenzo, V. (2015). SEVA 2.0: an update of the Standard European Vector Architecture for de-/re-construction of bacterial functionalities. *Nucleic Acids Research*, 43(Database issue), D1183–9.
- Miljkovic-Selimovic, B., Kocic, B., Stojanovic, P., Ristic, L., Dinic, M. & Babic, T. (2007). Bacterial Plasmids. *Acta Medica Medianae*, 46(4), 61–65.
- Million-Weaver, S., & Camps, M. (2014). Mechanisms of plasmid segregation: have multicopy plasmids been overlooked? *Plasmid*, 1(6).
- Morales, Y. E., Herrera, M. del C. & Muñoz, J. (2007). Chloramphenicol, a classic antibiotic as an alternative for the present. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 38, 58–69.
- Petković, H., Cullum, J., Hranueli, D., Hunter, I. S., Perić-Concha, N., Pigac, J., Thamchaipenet, A., Vujaklija, D. & Long, P. F. (2006). Genetics of *Streptomyces rimosus*, the oxytetracycline producer. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 70(3), 704–728.
- Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 3^a ed. Nueva York, EEUU: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scharbaal-Vázquez, R., González, A. L., & Torres-Bauzá, L. J. (2008). Four different integrative recombination events involved in the mobilization of the gonococcal 5.2 kb beta-lactamase plasmid pSJ5.2 in *Escherichia coli*. *Plasmid*, 60(3), 200–211.
- Scholz, P., Haring, V., Wittmann-Liebold, B., Ashman, K., Bagdasarian, M. & Scherzinger, E. (1989). Complete nucleotide sequence and gene organization of the broad-host-range plasmid RSF1010. *Gene*, 75(2), 271–288.
- Silva-Rocha, R., Martínez-García, E., Calles, B., Chavarría, M., Arce-Rodríguez, A., De Las Heras, A., Páez-Espino, A. D., Durante-Rodríguez, G., Kim, J., Nickel, P. I., Platero, R. & De Lorenzo, V. (2013). The Standard European Vector Architecture (SEVA): A coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. *Nucleic Acids Research*, 41(1), 666–675.
- Slonczewski, J. L. & Foster, J. W. (2013) *Microbiology an evolving science*, 3^a ed. Nueva York, EEUU: W.W. Norton & Company.
- Sreevatsan, S., Pan, X., Stockbauer, K. E., Williams, D. L., Kreiswirth, B. N., & Musser, J. M. (1996). Characterization of rpsL and rrs Mutations in Streptomycin- Resistant Mycobacterium tuberculosis Isolates from Diverse Geographic Localities. *Antimicrob Agents Chemother*, 40(4), 1024–1026.
- Stalker, D. M., Thomas, C. M. & Helinski, D. R. (1981). Nucleotide sequence of the region of the origin of replication of the broad host range plasmid RK2. *Molecular and General Genetics*, 181(1), 8–12.

- Szpirer, C. Y., Faelen, M. & Couturier, M. (2001). Mobilization function of the pBHR1 plasmid, a derivative of the broad-host-range plasmid pBBR1. *Journal of Bacteriology*, 183(6), 2101–2110.
- Riesenfeld, C. S., Goodman, R. M. & Handelsman, J. (2004). Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. *Environmental Microbiology*, 6(9), 981–989.
- Tobe, R., Naranjo-Suarez, S., Everley, R. A., Carlson, B. A., Turanov, A. A., Tsuji, P. A., Yoo, M., Gygi, S. P., Gladyshev, V. N. & Hatfield, D. L. (2013). High error rates in selenocysteine insertion in mammalian cells treated with the antibiotic doxycycline, chloramphenicol, or geneticin. *Journal of Biological Chemistry*, 288(21), 14709–14715.
- Watve, M. M., Dahanukar, N., & Watve, M. G. (2010). Sociobiological control of plasmid copy number in bacteria. *PLoS ONE*, 5(2).
- Wolanski, M., Donczew, R., Zawilak-Pawlik, A. & Zakrzewska-Czerwinska, J. (2015). oriC-encoded instructions for the initiation of bacterial chromosome replication. *Frontiers in Microbiology*, 5, 1–14.
- Yagüe, P., Rodríguez-García, A., López-García, M. T., Rioseras, B., Martín, J. F., Sánchez, J., & Manteca, A. (2014). Transcriptomic analysis of liquid non-sporulating *Streptomyces coelicolor* cultures demonstrates the existence of a complex differentiation comparable to that occurring in solid sporulating cultures. *PloS One*, 9(1).
- Yin, S., Wang, W., Wang, X., Zhu, Y., Jia, X., Li, S., Yuan, F., Zhang, Y. & Yang, K. (2015). Identification of a cluster-situated activator of oxytetracycline biosynthesis and manipulation of its expression for improved oxytetracycline production in *Streptomyces rimosus*. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 1–12.
- Yow, M. D., & Teng, N. E. (1961). The use of kanamycin sulfate as a therapeutic agent for infants and children. An analysis of 140 cases treated during a two-year period. *The Journal of Pediatrics*, 58, 538–47.
- Zaburannyi, N., Rabyk, M., Ostash, B., Fedorenko, V. & Luzhetskyy, A. (2014). Insights into naturally minimised *Streptomyces albus* J1074 genome. *BMC Genomics*, 15(1), 97.