

Desarrollo de vectores y de cepas especializadas de *Streptomyces* para metagenómica funcional

Álvaro Cebrián García, Amando Flores Díaz y Eva María Camacho Fernández

Universidad Pablo de Olavide, Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, CSIC, Junta de Andalucía, Sevilla

INTRODUCCIÓN

La organización mundial de la salud (OMS) ha descrito la resistencia a antimicrobianos como una de las mayores amenazas para la salud pública. Las resistencias antimicrobianas encontradas en la naturaleza y de origen clínico se han ido incrementando con el uso generalizado de antimicrobianos, por lo que descubrir y desarrollar nuevos antibióticos es prioritario

Una de las mayores limitaciones es la incapacidad de cultivar en el laboratorio la mayor parte de la gran diversidad microbiana presente en los diferentes ecosistemas. Como alternativa ha surgido la metagenómica en la que se analiza directamente el ADN presente en una comunidad microbiana natural

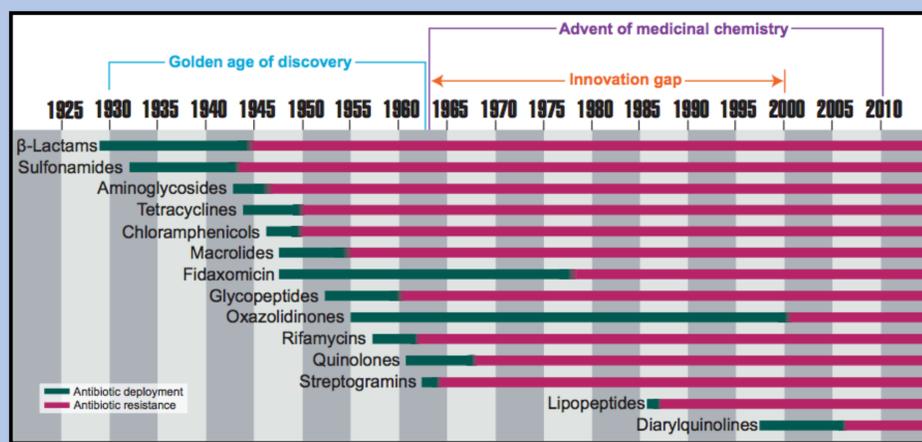


Figura 1. Tiempo en aparecer resistencias a antimicrobianos cuando se descubre un nuevo antimicrobiano (Adu-Oppong, Gasparrini & Dantas, 2016) doi: 10.1111/nyas.13257

METAGENÓMICA FUNCIONAL

Estudio del genoma de una comunidad microbiana expresando sus genes en un organismo hospedador

- ✓ La identificación de candidatos no depende de similitudes con secuencias de genes conocidas previamente
- ✓ Capaz de identificar genes cuya función no pueda ser predicha por secuenciación
- ✗ La detección depende de un sistema de expresión eficaz para los genes clonados

OBJETIVO

Construcción de una librería metagenómica a partir de ADN de distintas cepas de *Streptomyces* y desarrollar cepas de *Streptomyces* con un sistema de expresión heterólogo eficiente para la búsqueda de nuevas resistencias antimicrobianas

METODOLOGÍA

En el laboratorio se han desarrollado cepas de *Streptomyces* con modificaciones en su cromosoma. Dichas cepas tienen un plásmido integrado que porta el *gen1* que codifica para una ARN polimerasa de T7 insensible a señales de terminación bacterianas. Para mejorar su expresión, este gen se ha sintetizado ajustándolo al uso de codones de *Streptomyces*. La expresión del *gen1* está regulada por un sistema de expresión inducible llamado PnitA-nitR (Figura 3) que se activa en presencia de ϵ -caprolactamo

Mediante conjugación se transfieren a las cepas de *Streptomyces* el cósmido modificado (Figura 2), replicativo en el hospedador, con un gen reportero (*xyIE*). El producto de este gen es una catecol dioxigenasa que otorga color amarillo al catecol cuando se añaden sobre las colonias

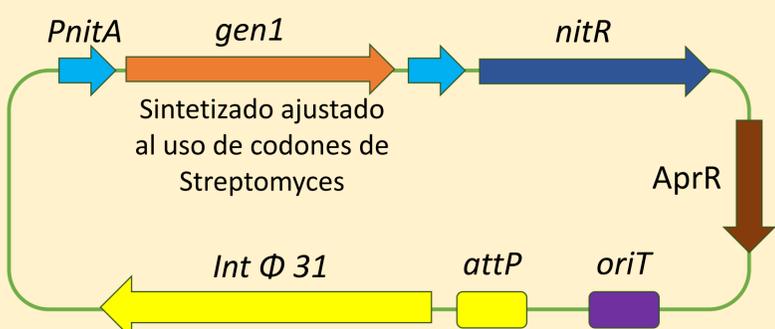


Figura 3. Vector integrativo en *Streptomyces*.

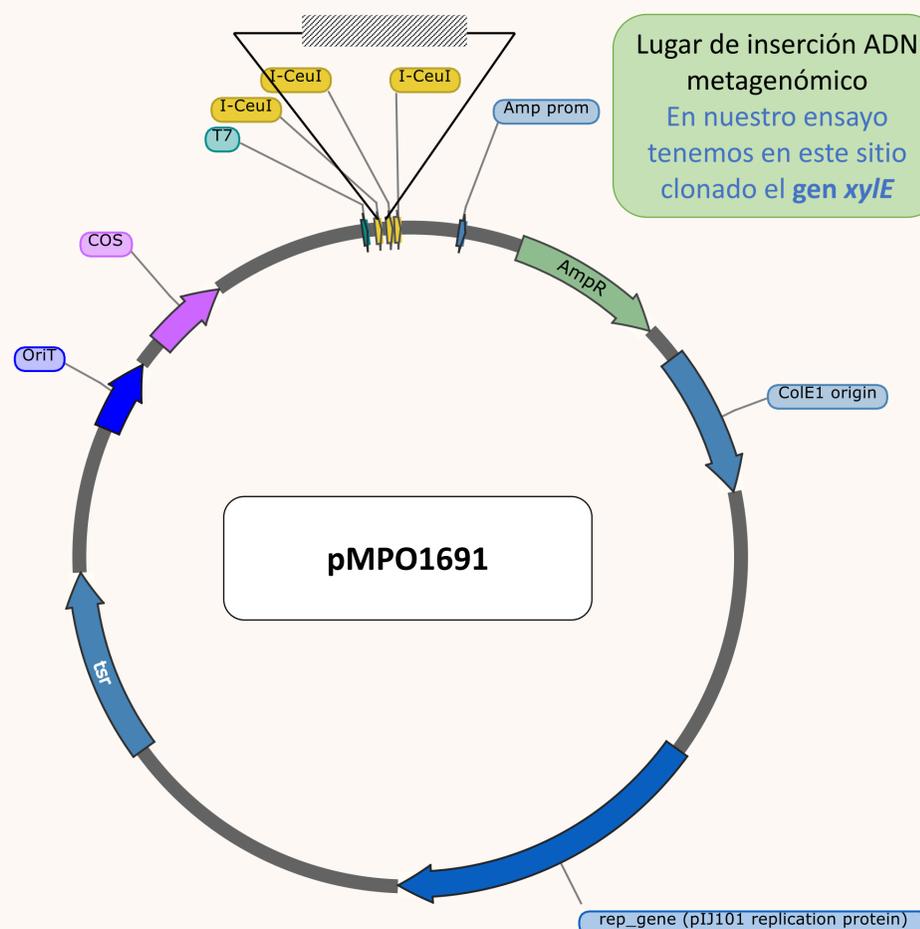


Figura 2. Cósmido desarrollado en nuestro laboratorio para expresar de forma eficaz el ADN metagenómico en *Streptomyces*. En lugar del ADN metagenómico tenemos clonado el gen *xyIE*.

RESULTADOS

Se observa una diferencia de expresión génica entre las distintas cepas de *Streptomyces*

En la Imagen 1 se observan colonias donde la expresión de *xyIE* está reducida por la presencia de un atenuador de la transcripción (*nasF*) aguas arriba del *gen1* que reduce los niveles de transcripción

En la Imagen 2 las colonias carecen de atenuador, obteniendo un color amarillo más intenso cuando añadimos catecol al medio

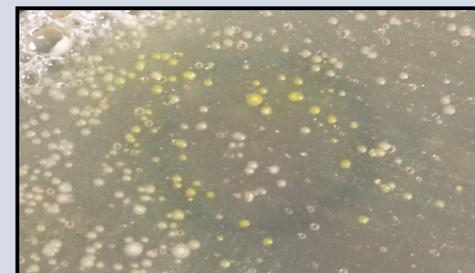


Imagen 1. Colonias de *Streptomyces* que portan el gen *xyIE* además del atenuador de la transcripción *nasF*



Imagen 2. Colonias *Streptomyces* que portan el gen *xyIE* sin atenuador *nasF*

CONCLUSIÓN

El sistema de expresión heterólogo funciona correctamente en las cepas de *Streptomyces* conjugadas

Referencias:

- Adu-Oppong, B., Gasparrini, A., & Dantas, G. (2016). Genomic and functional techniques to mine the microbiome for novel antimicrobials and antimicrobial resistance genes. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, 1388(1), 42-58. doi: 10.1111/nyas.13257
- Herai, S., Hashimoto, Y., Higashibata, H., Maseda, H., Ikeda, H., Omura, S., & Kobayashi, M. (2004). Hyper-inducible expression system for streptomycetes. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 101(39), 14031-14035. doi: 10.1073/pnas.0406058101
- Ingram, C., Brawner, M., Youngman, P., & Westpheling, J. (1989). *xyIE* functions as an efficient reporter gene in *Streptomyces* spp.: use for the study of galP1, a catabolite-controlled promoter. *Journal Of Bacteriology*, 171(12), 6617-6624. doi: 10.1128/jb.171.12.6617-6624.1989
- Terrón-González, L., Medina, C., Limón-Mortés, M., & Santero, E. (2013). Heterologous viral expression systems in fosmid vectors increase the functional analysis potential of metagenomic libraries. *Scientific Reports*, 3(1). doi: 10.1038/srep01107