

Construcción de vectores basados en la proteína fluorescente verde para análisis genético en bacterias

Construction of green fluorescent protein-based vectors for genetic analysis in bacteria

Division of Microbiology, GBF-National Research Institute for Biotechnology, Mascheroder Weg 1, 38124-Braunschweig, Alemania

SUÁREZ, A.*‡, GÜTTLER, A.‡, STRÄTZ, M., STAENDNER, L. H., TIMMIS, K. N. y GUZMÁN, C. A.

* Dirección actual: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. 18071 Granada. España. Tlf y fax: 958-243838. e-mail: asuarez@platon.ugr.es

‡Ambos autores contribuyeron igualmente al trabajo.

RESUMEN

El gen *gfp* que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) fue utilizado para crear una serie de plásmidos y un minitransposon registradores para el análisis genético y la monitorización de bacterias. El sistema registrador está integrado en un plásmido para estudio de promotores y en un minitransposon para generar fusiones transcripcionales por inserción al azar en el cromosoma. Con el objeto de mejorar los niveles de sensibilidad necesarios para el uso del sistema en monocopia y para la detección en células individuales, el extremo 3' del gen *gfp* fue reemplazado por el de otro gen *gfp* modificado que emite luz verde 45 veces más fuerte que la GFP natural. Además, al extremo 5' del nuevo gen *gfp* se fusionó la señal estimuladora de la traducción del gen *atpE*. La conjugación del minitransposon a dos *Pseudomonas* spp. diferentes y a *Alcaligenes eutrophus* produjo fusiones al azar en el cromosoma, de las que un 5% emitían fluorescencia detectable a ojo. La expresión de GFP en células aisladas fue perfectamente visualizada por microscopía de fluorescencia.

Palabras clave: Proteína fluorescente verde. Minitransposon Tn5. Análisis de promotores. Vectores.

ABSTRACT

The green fluorescent protein (GFP) gene, *gfp*, was used to develop versatile reporter systems for genetic analysis in, and monitoring of bacteria. The reporter system is available on a plasmid and on a mini-transposon located in a suicide delivery plasmid for generation of chromosomal fusions. To achieve sensitivity levels necessary for use in monocopy and for detection of single cells, the 3'-end of *gfp* was replaced by that of a modified *gfp* gene characterized by a 45-fold stronger signal than that exhibited by

the natural GFP, and the modified *gfp* gene equipped with the strong translation signals of the *atpE* gene. Transfer of the minitransposon into two different *Pseudomonas* spp. and *Alcaligenes eutrophus* produced random chromosomal fusions, some 5% of which exhibited fluorescence detectable by eye. Individual GFP+ cells were readily observed by fluorescence microscopy. The detailed map of the step-by-step construction is depicted. **Keywords:** Green fluorescent protein. Minitransposon Tn5. Promoter-probing. Vector.

Recibido: 15-01-97.

Aceptado: 21-02-97.

BIBLID [0004-2927(1997) 38:2-3; 319-328]

INTRODUCCIÓN

La proteína fluorescente verde (GFP) de la medusa *Aequorea victoria* es un polipéptido de 27-kDa cuya función natural es convertir la quimioluminiscencia azulada de la fotoproteína aequorina sensible al Ca^{2+} en una emisión luminosa de color verde (1). La GFP es una molécula registradora nueva que permite estudiar la expresión génica y la localización de proteínas *in vivo*, *in situ* y en tiempo real (2-6). El cromóforo activo es un tripéptido cuya formación es dependiente del oxígeno y de la temperatura, y, transcurre gradualmente tras la traducción (7, 8). La GFP absorbe la luz UV de color azul (de forma máxima a 395 nm) y emite luz visible de color verde (pico de emisión a 509 nm) (9). La GFP es muy estable (10) y, debido a que la fluorescencia no requiere productos de genes adicionales de *A.victoria*, la formación del cromóforo no depende de la especie animal o vegetal y transcurre o por la interacción con componentes celulares ubicuos o por autocatálisis (2, 5, 6, 11, 12).

El análisis de los elementos reguladores que controlan la expresión de los genes procarióticos se hace frecuentemente con la ayuda de las fusiones transcripcionales y el empleo de genes registradores (13). Para la generación de fusiones transcripcionales se dispone en la actualidad de sistemas genéticos basados tanto en plásmidos, para realizar estudios en multicopia, como en transposones, para los estudios en monocopia. El gen registrador más ampliamente utilizado es el gen *lacZ* que codifica para la enzima β -galactosidasa. La detección de la expresión de β -galactosidasa mediante el ensayo de su actividad enzimática tiene el inconveniente de que requiere un sustrato cromogénico o un ensayo quimioluminiscente, que enlentece y encarece la determinación (14,15). Además, la comparación de la actividad transcripcional de diferentes promotores puede resultar difícil ya que la eficiencia traduccional del gen *lacZ* depende en gran medida de las características de las secuencias fusionadas en la región 5' (16). El estudio de la expresión génica en microambientes complejos, el análisis de los genes expresados transitoriamente, la caracterización de las señales de activación en tiempo real y el

análisis al nivel de células aisladas es problemático todavía con los sistemas registradores disponibles, dada la baja sensibilidad proporcionada por sus genes marcadores.

Aunque se han desarrollado una serie de sistemas registradores basados en la GFP, la mayoría han sido diseñados para su uso en células eucarióticas o poseen una sensibilidad reducida (8, 17, 18). Actualmente no hay ningún sistema para procariotas con la sensibilidad suficiente para el análisis en monocopia de células únicas.

El objetivo de este trabajo fue crear unos sistemas registradores basados en la GFP para el análisis genético en bacterias.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas bacterianas, plásmidos y medios.

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo fueron las siguientes: *Pseudomonas putida* KT2442 (19); *Pseudomonas* spp. B13 (DSM624); *Alcaligenes eutrophus* (DSM428); las cepas de *E.coli* CC118 (20) y DH10B (GIBCO BRL) se emplearon como receptoras de los clonajes en pJLA503 (21), pBluescript II SK+, pBluescript II KS+ y pBC SK+ (Stratagene); la cepa de *E.coli* CC118 (*lpir*) fue utilizada para la transformación con los clonajes en el minitransposón pBSL202 (22); la cepa *E.coli* S17-1 (*lpir*) sirvió para movilizar el minitransposon pAG308 a las cepas de *P. putida* KT2442, *Pseudomonas* spp. B13 y *Alcaligenes eutrophus*, respectivamente. El plásmido pGFP10.1 (2) proporcionó el gen *gfp* mientras que del plásmido pAT187 se obtuvo el gen *aphA-3* (23).

Las cepas de *E.coli* y *Pseudomonas* spp. fueron crecidas en caldo y medio de Luria Bertani y *A.eutrophus* en agar nutritivo (0'8% P/V) (24). Los cultivos de bacterias fueron incubados a 37 grados y se oxigenaron por agitación a 200 rpm en un agitador orbital New Brunswick termostataado.

Manejo del DNA

El aislamiento de DNA, la digestión con endonucleasas, las ligaciones, las transformaciones, la electroforesis en agarosa y otras técnicas de rutina de manejo de DNA fueron realizadas de acuerdo con *Sambrook et al.* (22). Los experimentos de conjugación se realizaron como se ha descrito previamente (25), seleccionando los transconjugantes de *Pseudomonas* spp con rifampicina más kanamicina y de *A.eutrophus* con estreptomycinina más kanamicina.

Construcción de vectores para el análisis de promotores

La construcción de los vectores plasmídicos basados en la GFP está resumida en la figura 1. El gen *gfp* presente en pGFP10.1 (2) se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los oligonucleótidos directo (5'-GCGATTAATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCA) e inverso (5'-GCGGAATTCTTATTTGTATAGTTCATCCATG) diseñados de tal modo que el fragmento amplificado contiene un sitio *AseI* en el extremo 5' y un sitio *EcoRI* en el extremo 3' con 3 nucleótidos en 5' para una digestión eficiente con la endonucleasa de restricción (ambos sitios subrayados). El fragmento resultante fue digerido con *AseI+EcoRI* y se ligó con el plásmido pJLA503 (21) digerido con *NdeI+EcoRI*. El vector pASV0 resultante contenía el gen *gfp* en 3' respecto a la secuencia estimuladora de la traducción del gen *atpE* de *Escherichia coli*, a los promotores p_R y p_L del bacteriófago λ colocados en tándem y al gen codificador del represor termosensible cIts857. La producción de GFP, tras la inducción a 42°C, fue determinada mediante fluorimetría. La secuencia *atpE* estimuladora de la traducción fue incorporada en las construcciones siguientes con el objeto de facilitar el análisis de promotores débiles y de elementos activadores que necesitaran una expresión eficiente del gen *gfp*.

Con la intención de crear vectores multicopia basados en la GFP, el sitio de clonaje múltiple del vector pBluescript II SK (Stratagene) fue modificado mediante la inserción entre los sitios *EcoRI-HindIII* de un ligador sintético cohesivo (ambos sitios de restricción se pierden en el vector resultante) que contenía la secuencia reconocida por las endonucleasas (*HindIII*)-*PacI-EcoRI-HindIII-PacI*-(*EcoRI*). El fragmento *HindIII-EcoRI* de 1'5-kb de pASV0, que contiene los promotores p_R y p_L , la secuencia *atpE* de *E. coli* y el gen *gfp* fue clonado entre los sitios *HindIII-EcoRI* generando el plásmido pASV1. Para evitar la transcripción derivada de secuencias presentes en el esqueleto plasmídico, el terminador transcripcional *rrnBT₁* del RNA ribosomal fue amplificado por PCR del plásmido pKK232-8 (26) usando los oligonucleótidos directo (5'-GAACTGCAGTTAATTAACCAGGCATCAAATAAAACG) e inverso (5'-GGCGAAGCTTATAAAACGAAAGGCCAGT) diseñados para amplificar el fragmento entre los sitios *PstI/PacI* y *HindIII* respectivamente (subrayados). El fragmento resultante de 169-bp fue digerido con *PstI+HindIII* y ligado a pASV1 digerido con las mismas endonucleasas obteniéndose el plásmido pASV2 (figura 1). Las bacterias que poseen este plásmido expresan constitutivamente niveles altos de GFP lo que permite marcar bacterias que necesitan ser monitorizadas en medios biológicos complejos, en microscopía, etc. Para facilitar el clonaje de segmentos de DNA en el vector pASV3, el fragmento *HindIII-NarI* que contiene los promotores p_R y p_L fue reemplazado por un ligador sintético cuya secuencia es reconocida por las endonucleasas

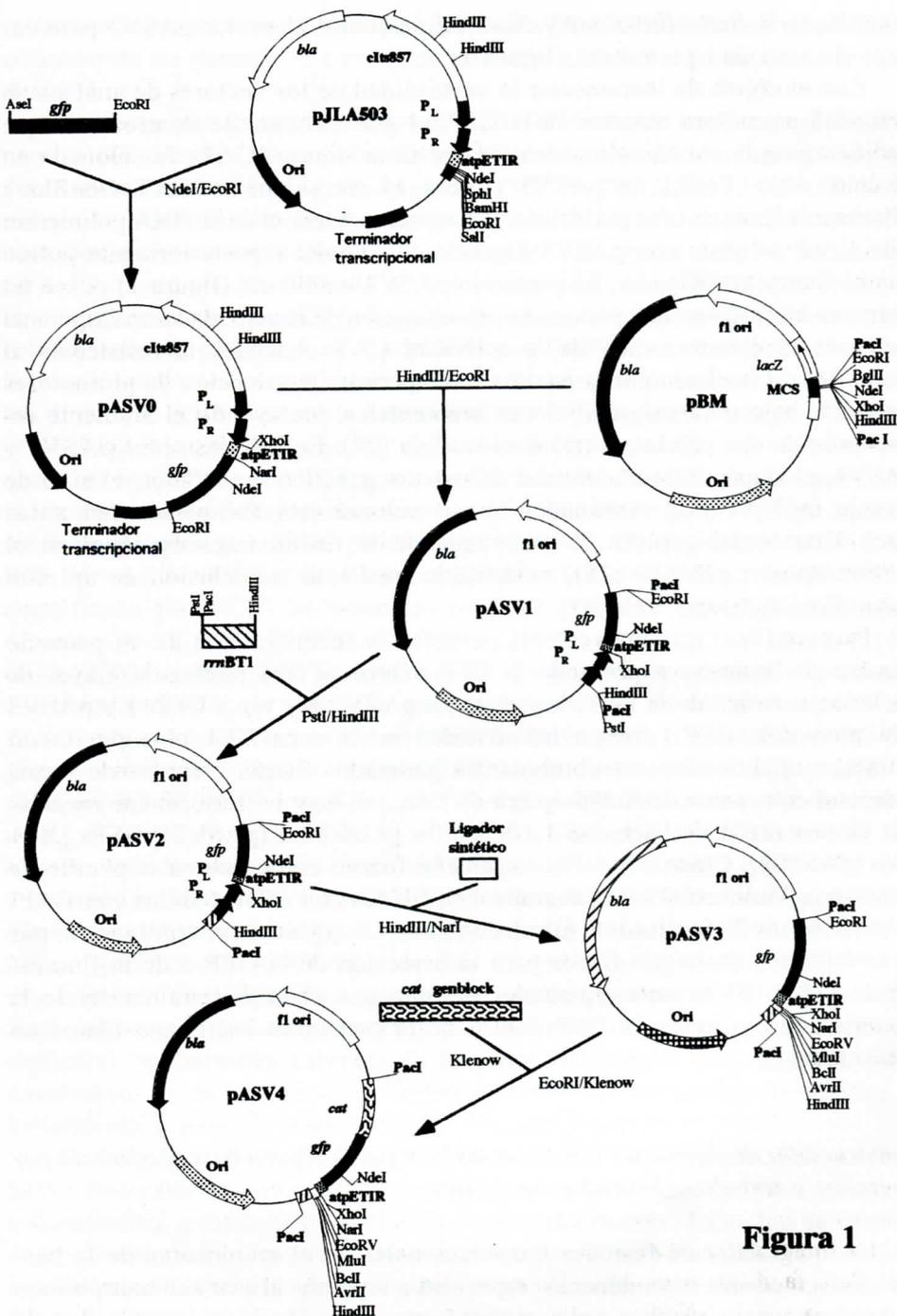


Figura 1

Fig 1.—Mapa de la construcción de los vectores para análisis de promotores basados en el gen *gfp*.

HindIII-AvrII-BclII-MluI-EcoRV-NarI originándose el vector pASV3 para ensayo de actividad promotora (figura 1).

Con el objeto de incrementar la versatilidad de los vectores de análisis de actividad promotora basados en la GFP, el gen *cat* carente de promotor que codifica para la enzima cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) fue clonado en el único sitio *EcoRI* de pASV3 (figura 1). El segmento CAT GenBlock (Farmacia Biotech.) fue pulido con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E.coli* y ligado con pASV3 digerido con *EcoRI* y posteriormente pulido con el fragmento Klenow. El plásmido pASV4 resultante (figura 1) posee un elemento bicistrónico que permite la cuantificación de la actividad transcripcional mediante la determinación de la actividad CAT. Además, la resistencia al cloranfenicol mediada por la enzima CAT permite la selección de promotores activados bajo diversas condiciones ambientales, incluyendo el ambiente intracelular de una célula eucariótica invadida (27). En los plásmidos pASV3 y pASV4, el segmento que contiene el sistema genético registrador, el sitio de clonaje múltiple y el terminador transcripcional está flanqueado por sitios *PacI*. Este hecho permite el subclonaje de la fusión transcripcional en el minitransposon pJMS10 (28), modificado mediante la inclusión de un sitio único *PacI* (presente trabajo).

Para verificar que los vectores permiten la identificación de un pequeño número de bacterias expresando la GFP dentro de una población mayor de bacterias carentes de la GFP, los vectores pASV2 (p_R y p_L ; GFP+) y pASV3 (sin promotor; GFP-) fueron introducidos en la cepa XL1 blue de *E.coli* (Stratagene). Los clones recombinantes generados fueron crecidos de forma independiente a una densidad óptica de $OD_{600}=0.5$, y posteriormente mezclados en una razón de bacterias 1:100 GFP+ [XL1 blue (pASV2)]:GFP- [XL1 blue (pASV3)]. Cinco μL de la suspensión fueron colocados en el pocillo de un sistema Multitest (Flow Laboratories), fijados con calor, teñidos con DAPI (4',6-diamino-2'-fenilindol dihidroclorido; 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y analizados por inmunofluorescencia con filtros para la detección de la GFP o de la fluorescencia DAPI. El sistema registrador permite una clara discriminación de la bacterias que expresan la GFP dentro de la comunidad bacteriana (datos no presentados).

Construcción de derivados del transposon mini-Tn5 para la mutagénesis por inserción y test de actividad promotora

La integración de fusiones transcripcionales en el cromosoma de la bacteria diana mediante recombinación específica o inserción al azar con transposones es necesaria para muchas aplicaciones como el análisis de la actividad de genes cromosómicos en condiciones fisiológicas, es decir, cuando están pre-

sentés en una única copia. La sensibilidad baja de los sistemas disponibles actualmente no permite el estudio de colonias aisladas o de bacterias individuales.

Los derivados del minitransposon mini-Tn5 han sido usados ampliamente para la construcción, manipulación y análisis de fenotipos complejos en un gran número de bacterias gram-negativas (18, 19, 20, 22, 25, 28-30). En este trabajo se han utilizado las características de los minitransposones mini-Tn5 para construir un minitransposon localizador de promotores basado en la GFP. El fragmento *XhoI-EcoRI* de 0'8 kb del plásmido pASV1 que contiene el gen *gfp* y la región *atpE* fue ligado al plásmido pBluescript KS+ digerido con *XhoI-EcoRI* para generar el plásmido patpEGFP. Con el objeto de mejorar la sensibilidad del sistema registrador para emplearse en monocopia, el extremo 3' del gen *gfp* fue reemplazado con el de un gen *gfp* obtenido por Cramer *et al* (31), cuyo producto posee una señal de fluorescencia 45 veces mayor que el de la GFP natural. El fragmento *NdeI-EcoRI* de 489 bp responsable del incremento en la fluorescencia fue ligado al plásmido pASV1 digerido con *NdeI-EcoRI* para generar el plásmido patpEGF42. Un segmento de DNA de 850 bp codificador de la 3'-aminoglicosido fosfotransferasa (*aphA-3*) fue amplificado por PCR del plásmido pAT187 (23) con los oligonucleótidos directo (5'-CCTTAAGGTTGGGGTATCTTTAAATACT) e inverso (5'-GGAATTCCAAGCTTTTTAGACATCT). Este gen es expresado y empleado como un marcador de selección para la kanamicina en un gran número de bacterias gram-negativas y gram-positivas. El fragmento amplificado fue digerido con *EcoRI* y ligado a patpEGFP42 digerido con *EcoRI* para generar el plásmido pAG108. El fragmento de DNA de pAG108 que contiene la región *atpE*, un gen *gfp* modificado y el gen *aphA-3* fue amplificado con los oligonucleótidos directo (5'-CGGGATCCCGCCGCTCGAGTAATTTACCAA) e inverso (5'-GGAATTCCAAGCTTTTTAGACATCT) y clonado en pBCSK+ (Stratagene) digerido con *EcoRV* para generar el plásmido pAG208-DNA. Por último, pAG208-DNA fue digerido con *Clai+NotI* y ligado a pBSL202 (22) digerido con *Clai+NotI* para generar el minitransposon pAG308 (figura 2). Este vector suicida basado en el origen de replicación R6K no es capaz de replicarse en bacterias carentes de la proteína Pir (30). La integración del transposon en el cromosoma bacteriano confiere resistencia antibiótica a kanamicina y permite seleccionar los transconjugantes.

Con el objeto de evaluar la utilidad del minitransposon pAG308, la cepa S17-1 (lpir) fue transformada con pAG308 y se seleccionó un clon resistente a kanamicina, gentamicina, ampicilina y no fluorescente. Este clon se empleó como donador en los experimentos de conjugación para transferir el plásmido suicida a varias cepas gram-negativas. Se obtuvieron transconjugantes de *P.putida* KT2442, *Pseudomonas* spp. B13 y *A.eutrophus* con una frecuencia de 10^{-6} por célula receptora. Hasta un 5% de las colonias transconjugantes

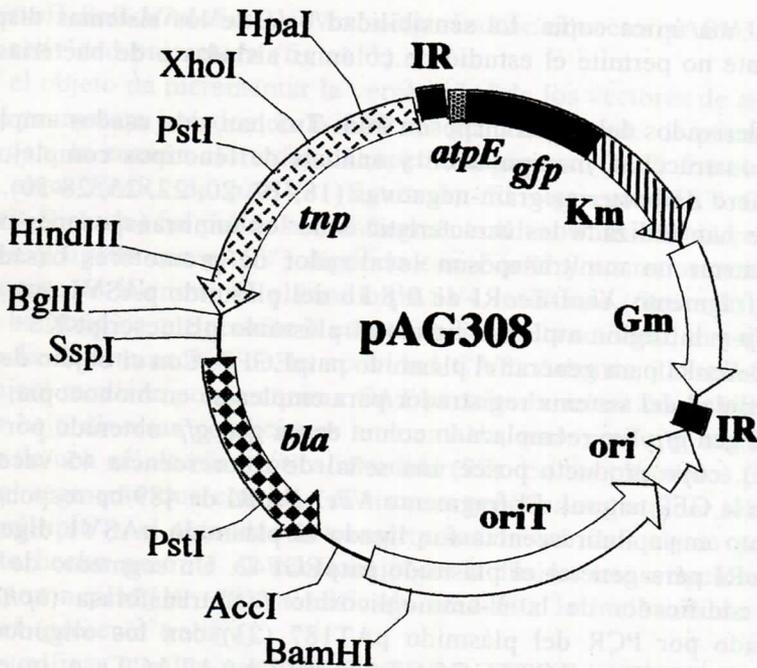


Fig. 2.—Mapa del minitransposon pAG308 para fusiones transcripcionales basado en el gen *gfp*.

poseían una fluorescencia intensa lo que sugiere que la integración cromosómica estaba localizada en 3' de un promotor muy activo en la orientación adecuada. La visualización de las colonias iluminadas con luz UV en un cámara CCD (Herolab GmbH) equipada con un filtro adecuado (SCHOTT GmbH) reveló la existencia de una gama amplia de intensidades de fluorescencia indicando que las integraciones cromosómicas estaban localizadas en 3' de promotores con diferente actividad transcripcional. El análisis por Southern blot del DNA cromosómico de diversas colonias empleando una sonda específica de la GFP confirmó que los recombinantes eran el resultado de eventos integrativos diferentes.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) CODY, C. W., PRASHER, D. C., WESTLER, W. M., PRENDERGAST, F. G. Y WARD, W. W.: "Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the Aequorea green-fluorescent protein". *Biochemistry* (1993), **32**:1212-1218.
- (2) CHALFIE, M., TU, Y., EUSKIRCHEN, G., WARD, W. W. Y PRASHER, D. C.: "Green fluorescent protein as a marker for gene expression". *Science* (1994) **263**:802-805.