

03072  
10  
201



**Universidad Nacional Autónoma de México**  
**Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de**  
**Posgrado del Colegio de Ciencias y Humanidades**

**Clonación y caracterización de un**  
**gen de lipasa extracelular de**  
***Streptomyces* sp. M11**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA**  
**PRESENTA:**

**Cristina Pérez Delgado.**

**México, D.F. 1993**

**TESIS CON**  
**FALLA DE ORIGEN**



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

# INTRODUCCION

## *Streptomyces*

El género *Streptomyces* es un miembro de la familia Streptomycetaceae, el cual pertenece al orden bacteriano Actinomycetales. Las especies de este género son aerobias, Gram positivas y generalmente colonizan habitats de suelo. La mayoría son quimioorganotrofas. Dado que son inmóviles, su nutrición depende de la secreción de enzimas hidrolíticas. (Goodfellow, M. y Cross, T., 1984)

Tienen un crecimiento miceliar, con hifas de 0.5 a 2  $\mu\text{m}$  de espesor (Dietz, A., 1986). Su crecimiento en medio sólido es característico: presentan diferenciación morfológica similar a la de hongos filamentosos, en donde, a partir de una espora se forma inicialmente micelio vegetativo o sustrato, que posteriormente se diferenciará para formar micelio aéreo, el cual finalmente se septa para formar cadenas de esporas (Chater, K.F., 1984). (ver fig. 1)

El ciclo de diferenciación de *Streptomyces* es un área de estudio de gran interés, dado que también influye en la producción de metabolitos secundarios, como los antibióticos; tomando como modelo a *S. coelicolor* A3(2), se han mapeado en el cromosoma una gran cantidad de mutantes en diferenciación, y, utilizando técnicas de ingeniería genética se han clonado ya varios genes que complementan estas mutantes (Chater, K.F., 1989).

El genoma de *Streptomyces* es de 3.7 a 5 x 10<sup>6</sup> Da, aproximadamente 1.5 a 2 veces el tamaño del genoma de *E. coli*. Tiene un alto contenido de G+C

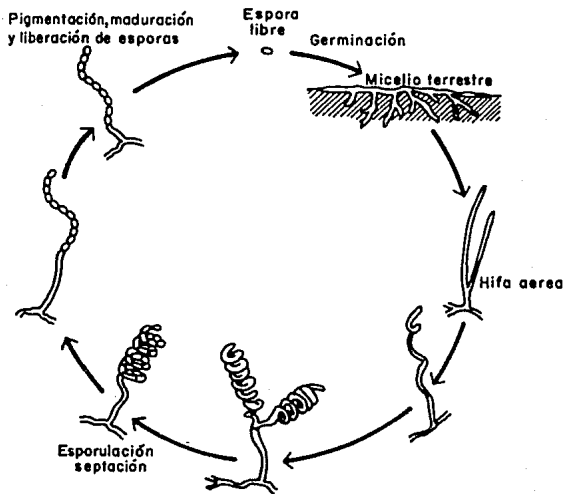


Fig. 1.- CICLO DE VIDA DE *S. coelicolor*  
 ( Chater y Merrick, 1979).

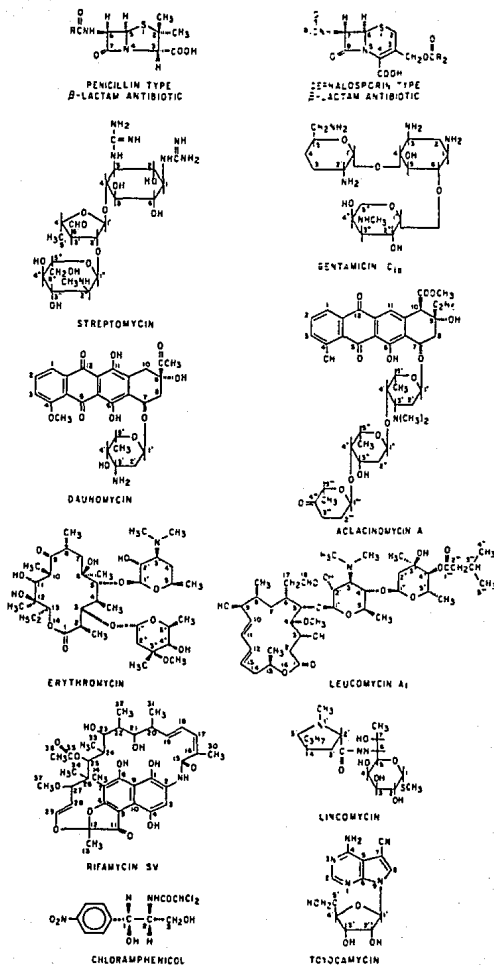
que va del 69 al 74%. Este porcentaje probablemente es lo más alto que puede aceptar el código genético. Se ha comprobado que en secuencias de genes de este género se maximiza el contenido de G+C en la tercera posición de codones (alrededor de 91%), mientras que en la primera y segunda posición se tienen 70 y 47% respectivamente (Baltz, R.H., 1986; Bibb *et al.*, 1984).

Se han planteado hipótesis respecto a la presión selectiva que hace que *Streptomyces* tenga un alto contenido de G+C en su genoma. Algunos autores (Singer y Ames, 1970) sugieren que las bacterias que habitan en suelo están expuestas a una gran cantidad de radiación ultravioleta proveniente de la luz solar, por lo que, para minimizar la frecuencia de timinas adyacentes, objeto de mutación o daño por UV, se tiende a tener mayor contenido de G+C en el genoma. Esta hipótesis no ha sido comprobada.

### **Interés biotecnológico de *Streptomyces***

El principal interés que se ha tenido en torno al estudio de *Streptomyces* se da por su capacidad de producir una gran variedad de antibióticos de diferentes estructuras: aminociclitolos, ansamicinas, antraciclinas,  $\beta$ -lactámicos, macrolidos, glutarimidos, nucleósidos, péptidos, etc. (Crandall, L.W. y Hamill, R.L., 1988)(ver fig. 2)

Se han caracterizado aproximadamente 6000 antibióticos de origen microbiano; de éstos, aproximadamente el 60% son producidos por actinomicetos. Dentro de estos antibióticos aproximadamente 70 se aplican en medicina humana, veterinaria, y en agricultura. En estos antibióticos de uso



**Fig. 2. Estructuras de algunos antibióticos producidos por Streptomyces. (Crandall y Hamill, 1988)**

comercial el 90% son producidos por microorganismos del género *Streptomyces* (Omura, S., 1986).

Además de la producción de antibióticos, se ha tenido gran interés en los *Streptomyces* por la producción de una gran cantidad de enzimas hidrolíticas extracelulares (Piret, J.M. y Demain, A.L., 1986).

Existe una gran cantidad de enzimas de interés biotecnológico producidas por microorganismos de este género. La más conocida es la glucosa isomerasa que se utiliza en la producción de jarabes de maíz fructosados (Piret, J.M. y Demain, A.L., 1986). Otras enzimas de interés comercial son glicosidasas tales como amilasas, celulasas, xilanasas y quitinasas para degradación de biomasa; proteasas para el encurtido de cuero y para uso en detergentes; enzimas líticas (mutanolisina) para clarificación de vino y pectinasas para el procesamiento de jugo de frutas.

### ***Streptomyces* como sistema de clonación**

La producción comercial de enzimas y antibióticos por *Streptomyces*, y la idea de mejorar estos procesos ha estimulado el interés en el desarrollo de algunas técnicas de mejoramiento genético. En la investigación industrial el mejoramiento genético se lleva a cabo generalmente por la obtención de mutantes sobreproductoras del metabolito de interés; en este tipo de estudios el objetivo no es conocer la fisiología del microorganismo, sino simplemente la sobreproducción de algún producto. En la investigación académica el objetivo es saber cómo se llevan a cabo diferentes procesos bioquímicos en el



microorganismo, la estructura de sus proteínas, la relación evolutiva que pudiera encontrarse entre organismos dada la similitud entre vías metabólicas o entre sus proteínas, etc.

A la fecha se ha desarrollado ampliamente a *Streptomyces* como un sistema genético. Se encuentran los primeros reportes en los años cincuentas, con estudios sobre recombinación genética en *S. coelicolor* (Sermonti, G. et al, 1956, Bibb, M.J., 1978). La compleja diferenciación morfológica de *Streptomyces*, así como su capacidad de síntesis de antibióticos y pigmentos ha estimulado grandemente el progreso en análisis genético, utilizando elementos como plásmidos y actinofagos para la manipulación genética de estos microorganismos (Hopwood, D. A. et al. 1985).

Los *Streptomyces* poseen una gran variedad de elementos extracromosomales: tienen plásmidos circulares o lineales, secuencias de inserción, profagos y minicírculos. Los plásmidos son de tamaño muy diverso, desde menos de 4 kb hasta más de 200 kb, y tienen un número de copias desde uno hasta varios cientos por célula. El contenido de G+C en su DNA es similar al del cromosomal, de aproximadamente 70 a 75% (Hopwood, D.A. et al. 1986).

Se han clonado y secuenciado una gran cantidad de genes, como los de parte de las vías biosintéticas de los antibióticos actinorrodina y undecilprodigiosina (de *S. coelicolor* A3(2)) (Malpartida, F. y Hopwood, D.A., 1984; Malpartida *et al.*, 1990), granaticina (de *S. violaceoruber* Tü22) (Sherman, D.H. *et al.*, 1989). así como algunos genes de la biosíntesis de cafalosporina en *S. clavuligerus* (Piret, J. *et al.*, 1990), entre muchos otros. También se han

clonado, como ya se mencionó anteriormente, genes relacionados con la diferenciación de estos microorganismos (*bldA*, *bldB*, *whiB*, *whiG* y *sapB*) (Piret, J. y Chater, K.F., 1985; Soliveri, J. *et al.*, 1992; Mendez, C. y Chater, K.F., 1987 y Willey, J. *et al.*, 1991), así como diversos genes de enzimas de interés.

Las ventajas de los *Streptomyces* como hospederos potenciales de la expresión de genes incluyen su carencia de patogenicidad (excepto la especie *S. scabies*, patógeno de plantas), la capacidad de secreción de proteínas y el largo tiempo de utilizarse en fermentaciones a nivel industrial.

### **Vectores de clonación derivados del plásmido pIJ101**

pIJ101 es un plásmido circular de 8.9 kb, de alto número de copias, que se encontró originalmente en *S. lividans* ISP5434 (Kieser, T. *et al.*, 1982). Puede replicarse en un rango amplio de cepas de *Streptomyces*. Es un plásmido capaz de transferirse a sí mismo por conjugación, y de conferir fertilidad cromosómica, promoviendo la recombinación entre cepas. A la fecha se tiene totalmente secuenciado (Kendall, K.J. y Cohen, S.N., 1988).

Se han desarrollado varios vectores de clonación a partir del pIJ101 (ver tabla 1) (Hopwood, D.A. 1986). El plásmido pIJ486, de 6.2 kb, una de estas construcciones, posee las siguientes características: Tiene el origen de replicación del pIJ101, el gen de resistencia al antibiótico tioestreptona, *tsr*, (de *S. azureus*), el gen de resistencia a neomicina sin región promotora, localizado hacia abajo de un polienlazador con sitios únicos para clonar. Hacia arriba de la secuencia del polienlazador hay un terminador, éste con el fin de asegurar

VECTOR	TAMAÑO	MARCADORES	SITIOS UNICOS	REFERENCIAS
pIJ303	10.8kb	tsr, Ltz <sup>+</sup>	SstI, KpnI	Kieser <i>et al.</i> 1982
pIJ361	11.6kb	tsr, vph	EcoRI, HindIII, KpnI	Kieser <i>et al.</i> 1982
pIJ364	5.3kb	tsr, vph	PstI, KpnI, SstI SphI, EcoRV, PvuII, ClaI	Kieser <i>et al.</i> 1982
pIJ385	6.0kb	aph, tsr	PstI, XbaI, ClaI, SstI, EcoRI, PvuII KpnI	Hopwood <i>et al.</i> 1985
pIJ425	6.7kb	tsr	BglII	M.J. Bibb <i>et al.</i> (no publicado)
pIJ702	5.7kb	tsr, mel	BglII, SphI, SstI PstI, KpnI	Katz <i>et al.</i> 1983; Birch y Cullum, 1985
pIJ860	10.3kb	tsr, aphII	BglII, HindIII EcoRI	Martin y Gil, 1984
pPZ12	6.2kb	tsr	BglII, KpnI HindIII, SphI	Chambers y Hunter, 1984

**Tabla 1.** Algunos vectores derivados del pIJ101. (Hopwood, D.A., 1986)

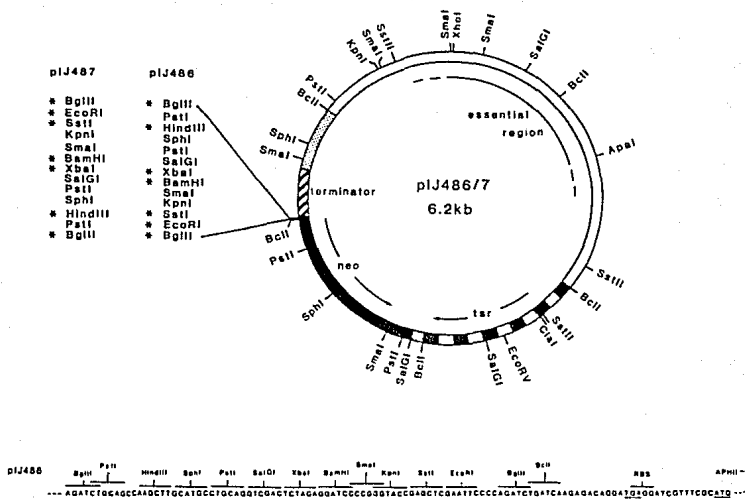
que sólo se transcribirá el gen de resistencia a neomicina por la presencia de un promotor clonado (ver fig. 3) (Ward, J.M. *et al.*, 1986). Dado el alto número de copias por célula de este plásmido (aproximadamente 200), se puede conseguir la sobreexpresión de los genes que sean clonados en él. La eficiencia de transformación en *S. lividans* 66 es de más de  $5 \times 10^6$  transformantes por microgramo de DNA.

### ***Streptomyces lividans* 66 como hospedero**

*S. lividans* tiene varias ventajas como hospedero sobre *E. coli*, para la clonación y expresión de genes de *Streptomyces*. Entre éstas pueden incluirse su habilidad para la secreción de proteínas y el que reconocen un gran número de promotores. La diferencia entre promotores utilizados en *Streptomyces*, impiden la expresión eficiente de genes provenientes de éstos al clonarlos en *E. coli* (Hopwood, D.A. *et al.*, 1986).

Una característica que aumenta la importancia de esta cepa para su uso como hospedero, es el que secreta sólo cantidades muy pequeñas de enzimas proteolíticas (Henderson, G. *et al.*, 1987), por lo que el producto clonado no será hidrolizado al ser secretado. Además, el hecho de carecer de un sistema de restricción-modificación, asegura una eficiente transformación de plásmidos en las células (Guzek, T.W. y Kinsella, J.E., 1992).

Se ha demostrado (Bibb y Cohen, 1982, y Jaurin y Cohen, 1984) que la RNA polimerasa de *S. lividans* reconoce las señales de control transcripcional de bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* y *Serratia marcescens*, así

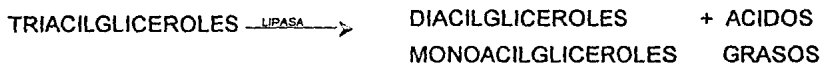


**Fig. 3.** Mapa de restricción del vector pIJ486. (Ward, *et al.* 1986)

como de la bacteria Gram positiva *Bacillus licheniformis*. *S. lividans* también utiliza los promotores de *Mycobacterium bovis* (orden Actinomycetales) tan eficientemente como sus propios promotores, evitando así que se deba desarrollar un sistema de clonación para estas bacterias relacionadas.

### Lipasas

Las lipasas (glicerol éster hidrolasas) son un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces éster de triacilgliceroles en la interfase aceite - agua, siendo productos de estas reacciones ácidos grasos libres, di y mono acilgliceroles y glicerol. (fig. 4; Macrae y Hammond, 1985).



**Fig. 4.** Reacciones catalizadas por lipasas.

Las lipasas son producidas por animales, vegetales y diferentes tipos de microorganismos. En animales se han identificado lipasas en tracto digestivo (linguales, pancreáticas, hepáticas), en tejido de mamíferos (corazón, cerebro, riñón) y también en leche. Se ha tenido interés por algunas de estas enzimas, por lo que se han purificado y comercializado. En plantas se han encontrado lipasas en semillas como arroz, trigo, soya y otras (Desnuelle, 1972)

La fuente más importante de lipasas a nivel industrial, actualmente, son los microorganismos. Se han encontrado lipasas en bacterias, levaduras y hongos filamentosos (tabla 2; Sztajer y Maliszewska, 1988)

## BACTERIAS

*Chromobacter lipolyticum*  
*Alcaligenes faecalis*  
*Bacillus cereus*  
*B. mycoides*  
*B. subtilis*  
*Corynebacterium acnes*  
*Chromobacterium viscosus*  
*Leptospira pomona*  
*Moraxella* sp.  
*Mycobacterium freudenreichii*  
*M. lipolyticus*  
*M. nacreaceus*  
*M. phlei*  
*Pseudomonas aeruginosa*  
*P. fluorescens*  
*P. fragii*  
*P. gladioli*  
*P. nitroreductans*  
*Serratia* sp.  
*Staphylococcus aureus*

## LEVADURAS

*Candida cylindracea*  
*C. parapolytica*  
*Pichia* sp.  
*Sporobolomyces* sp.  
*Torulopsis* sp.  
*Trichosporon* sp.

## HONGOS

*Aspergillus flavus*  
*A. lipolyticus*  
*A. niger*  
*Fusarium oxysporum*  
*Geotrichum candidum*  
*Humicola lanuginosa*  
*Mucor japonicus*  
*M. lipolyticus*  
*M. miehei*  
*Penicillium candidum*  
*P. cycloprum*  
*P. roqueforti*  
*Rhizopus arrhizus*  
*R. delemar*  
*R. chinensis*  
*R. japonicum*  
*R. oligosporus*

**Tabla 2.** Microorganismos productores de lipasas. (Sztajer y Maliszewska, 1988).

Las lipasas tienen diferentes aplicaciones en industrias como la farmacéutica, química y de alimentos: Se utilizan en la formulación de detergentes, encurtido de pieles, para la transesterificación de grasas y aceites, en análisis clínicos para determinación de lípidos, y para la creación de sabores en la industria de alimentos (Macrae y Hammond, 1985)

### **Características de genes de lipasa ya clonados**

Se han clonado, a la fecha varios genes de lipasa, los cuales provienen de diversos orígenes: bacterianos, de hongos filamentosos y de mamíferos (Feller, G. *et al.*, 1990; Jørgensen, S. *et al.*, 1991; Ihara, F. *et al.*, 1991; Iizumi, T. *et al.*, 1991; Chung, G.H. *et al.*, 1991; Aoyama, S. *et al.*, 1988; Kugimiya, W. *et al.*, 1986; Götz, F. *et al.*, 1985; Yamaguchi, S., *et al.*, 1991; Shimada, Y. *et al.*, 1989; Kawaguchi, Y. *et al.*, 1989; Haas, M.J. *et al.*, 1991; Enerbäck, S. *et al.*, 1987; Lowe, M.E. *et al.*, 1989; Komaromy, M.C. 1987).

Existe una gran heterogeneidad entre las lipasas a nivel de secuencia de aminoácidos. Existe, sin embargo, una región altamente conservada (Gly-X<sub>1</sub>-Ser-X<sub>2</sub>-Gly) la cual ha sido identificada en todas las lipasas secuenciadas. Esta región se ha implicado en la unión de las lipasas a sustratos micelares (Guidoni *et al.* 1981), o como el sitio de la serina activa. En estudios sobre la estructura tridimensional de dos lipasas, de tejido pancreático humano (Winkler, 1990) y de *Rhizomucor miehei* (Brady, 1990), se encontró una tríada catalítica (Ser...His...Asp) similar a la de serín-proteasas, en que la serina implicada es la de la región conservada mencionada anteriormente. Además, Davis (1990) hizo



estudios de mutagénesis dirigida en una lipasa hepática, en que demostró que esta serina es importante en la actividad catalítica de la lipasa.

Se han encontrado ciertas similitudes entre lipasas cuyo origen sea similar. Komaromy (1987) encontró en secuencias de lipasas lipoprotéicas provenientes de mamíferos, fragmentos que se encuentran altamente conservados entre sí. Por otro lado, Feller (1991) encontró homología a lo largo de dos fragmentos entre lipasas provenientes de diferentes organismos como *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Rhizopus* y las lipasas 2 y 3 de *Moraxella* TA144. Cabe observar que la secuencia del gen de la lipasa 1 de este microorganismo carece de uno de estos motivos, sólo conservando la homología en el fragmento que contiene la serina del sitio activo.

Iizumi (1991) estudió secuencias de genes de lipasas provenientes de *Pseudomonas* y *Staphylococcus* y encontró que cinco regiones de la secuencia de aminoácidos están muy conservadas, aún cuando la homología general entre todas las secuencias es muy baja. Además, el orden de las cinco regiones conservadas en estas lipasas también es idéntico (fig.5). En este trabajo, Iizumi concluye que estas regiones conservadas podrían ser esenciales para la expresión de la actividad enzimática. De hecho, la segunda región conservada incluye el motivo conservado con la serina activa, y, además, en las otras regiones existen residuos de histidina y ácido aspártico, los cuales podrían ser parte de la tríada del sitio activo mencionada anteriormente (Brady, 1990).

## Genes necesarios para la expresión de genes de lipasa

En algunos reportes de clonación de genes de lipasa provenientes de *Pseudomonas* (Iizumi, 1991; Jørgensen, 1991 y Wohlfarth, 1992) se ha encontrado que, para la expresión de los genes de lipasa por ellos clonados, se requiere de la presencia de otro gen (modulador o activador) el cual de alguna forma interactúa a nivel de transcripción o traducción. Sin la expresión de estos genes, las clonas no presentan actividad lipolítica.

El gen *limA* de *P. cepacia* (Jørgensen, 1991), que se encuentra hacia abajo del gen *lipA* y es expresado por el mismo promotor de éste último gen, codifica para una proteína de 344 aminoácidos. Al analizar esta secuencia se encontró que el amino terminal parece un péptido señal; además, se cree que pueda ser una proteína asociada a membrana, ya que un fragmento de la secuencia puede formar una hélice transmembranal. El gen *limA* es muy parecido al gen *act* de *Pseudomonas* sp. KWI-56 (Iizumi, 1991): se encuentra hacia abajo del gen *lip*, expresándose con el promotor de éste, y codifica para una proteína de 344 aminoácidos, con una homología muy significativa respecto a *limA*.

A diferencia de los dos genes activadores descritos anteriormente, el gen *lipH*, necesario para la expresión del gen *lipA* de *P. aeruginosa* PA01, se transcribe independientemente del gen estructural de la lipasa, ya que tiene su propio promotor y sitio de unión a ribosomas, además de que existe una secuencia repetida invertida entre ambos genes. La proteína codificada por *lipH* tiene 383 aminoácidos y muestra una homología de 40% respecto a la proteína

codificada por *limA* de *P. cepacia*. Por otra parte, *lipH* no muestra homología con genes involucrados en la secreción de proteínas, y tampoco posee ninguna región común a proteínas activadoras. (Wohlfarth, 1991).

El mecanismo de activación por parte de los genes *act*, *limA* y *lipH* todavía no es conocido. Se han propuesto algunos mecanismos (sin poder comprobar alguno): (1) Activación a nivel de transcripción, (2) estabilización del RNA mensajero del gen de lipasa, (3) activación a nivel de traducción, (4) ayuda en el procesamiento o 'doblado' del precursor de la lipasa, y (5) activación como cofactor. (Iizumi, 1991)

## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar lipasas extracelulares producidas por cepas de *Streptomyces*.

Clonar los genes estructurales de lipasa para un estudio posterior de regulación de esta enzima a nivel transcripcional, y purificar y caracterizar la enzima.

## **OBJETIVO PARTICULAR**

Clonar un gen de lipasa extracelular de una cepa de *Streptomyces*, y caracterizar el producto clonado.

## **ESTRATEGIA**

1. Selección de cepas productoras.
2. Preparación de bancos genómicos de la cepa seleccionada.
3. Selección y análisis de clones productoras de lipasa.
4. Purificación de la lipasa clonada y caracterización de su gen estructural.

GENE 06851

## Cloning, characterization, and expression in *Streptomyces lividans* 66 of an extracellular lipase-encoding gene from *Streptomyces* sp. M11

(Signal peptide; promoter; lipase active site; recombinant DNA; terminator)

Cristina Pérez<sup>a</sup>, Katy Juárez<sup>a</sup>, Esther Garcia-Castells<sup>a</sup>, Gloria Soberón<sup>b</sup> and Luis Servín-González<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, D.F. 04510, México; and <sup>b</sup>Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Mor, México. Tel. (52-73) 17-2799

Received by K.F. Chater: 3 March 1992; Revised/Accepted: 27 August 1 September 1992; Received at publishers: 18 September 1992

### SUMMARY

A gene encoding an extracellular lipase from *Streptomyces* sp. M11 was cloned in the high-copy-number vector pJ486, using *S. lividans* 66 as host. A 28-kDa protein was secreted by *S. lividans* carrying pB13, which harbors a 6-kb insert, and identified as the product of the cloned gene. Comparison of the N-terminal amino acid (aa) sequence of the purified extracellular lipase with the nucleotide (nt) sequence of the *lip* gene revealed the presence of a 48 aa long signal peptide. The nucleotide sequence also revealed the presence of a motif, Gly-His-Ser-Met-Gly, similar to the one found surrounding the active-site Ser in other lipases. The gene is most likely monocistronic. Subcloning experiments indicated that another gene might be required for high-level expression, since subcloning of the structural gene alone resulted in diminished extracellular lipase activity. The lipase gene promoter was identified by S1 mapping experiments, and found to be similar to other *Streptomyces* vegetative promoters.

### INTRODUCTION

Members of the genus *Streptomyces* are saprophytic, Gram<sup>+</sup> bacteria that exhibit a mycelial growth habit. They rely for their nutrition on the secretion of a wide variety of extracellular hydrolytic enzymes. While considerable data on proteases, carbohydrases and other enzymes of unusual properties have accumulated (Peczyńska-Czoch and Mordarski, 1988) there is little information regarding the production of lipases by these

micro-organisms, even though it has been recently demonstrated that some *Streptomyces* species can be highly lipolytic (Sztajer et al., 1988).

Microbial lipases have a wide range of biotechnological applications (Björkling et al., 1991), and those produced by the streptomycetes might add enzymes with novel characteristics; understanding the mechanisms that regulate lipase synthesis in these organisms might also help in improving the utilization of different oils and fats used as carbon sources in many industrial streptomycete fermentations (Bader, 1986). In this paper we describe the cloning and characterization of an extracellular lipase-encoding gene (*lip*) from *Streptomyces* sp. M11 and its expression in *S. lividans* 66.

*Correspondence to:* Dr. L. Servín-González, Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M., Apartado Postal 70228, Ciudad Universitaria, D.F. 04510, México. Tel. (52-5) 550-3893; Fax (52-5) 550-0048.

Abbreviations: aa, amino acid(s); bp, base pair(s); ExoIII, *E. coli* exonuclease III; kb, kilobase(s) or 1000 bp; LB, Luria-Bertani (medium); *lip*, gene encoding extracellular lipase; nt, nucleotide(s); ORF, open reading frame; PAGE, polyacrylamide gel-electrophoresis; RBS, ribosome-binding site(s); *S.*, *Streptomyces*; SDS, sodium dodecyl sulfate; Th, thio-strepton; *tsp*, transcription start point(s).

### EXPERIMENTAL AND DISCUSSION

#### (a) Cloning of an extracellular lipase-encoding gene

Several *Streptomyces* strains from our collection (Biomedical Research Institute, National University of Mex-

ico) were tested for extracellular lipase production by assaying culture supernatants on plates containing an emulsion of tributyrin (Arima et al., 1972; Sztajer et al., 1988; data not shown). *Streptomyces* sp. M11 gave a clear positive result, whereas *S. lividans* 66, which has been described by others (Daza et al., 1990) as being lipolytic, always gave a negative result for extracellular lipase in our hands. We therefore decided to use the latter strain as a host for cloning the lipase-encoding gene from *Streptomyces* sp. M11. Total DNA from this strain was partially cut with *Sau3A*I, size fractionated, ligated to *Bam*HI-cut pJ486 (Ward et al., 1986), and the ligation mixture used to transform *S. lividans*. Three lipolytic clones were identified using the lipase-specific plate assay of Kouker and Jaeger (1987) as described in Fig. 1. Their plasmids were analysed and named pB13, pB17 and pB18, with inserts of 6.0, 7.0 and 10 kb, respectively. All three plasmids carried the same region of the *Streptomyces* sp. M11 chromosome, as indicated by Southern hybridization (data not shown). The plasmid with the smallest insert, pB13, was chosen for more detailed analysis. From the data in Fig. 1 and Table I it can be seen that the *lip* gene must be contained in the internal 1.7-kb *Bam*HI fragment and that the leftmost *Kpn*I site interrupts it.

#### (b) Identification and purification of the cloned gene product

Total extracellular protein preparations were analyzed by SDS-PAGE, which showed large amounts of a protein with a molecular size of about 28 kDa in culture superna-

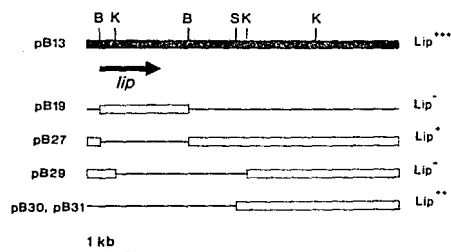


Fig. 1. Physical map of the pB13 insert and subclones. In pB13 the region shown is cloned in pJ486 (Ward et al., 1986) in an orientation such that the *fd* terminator is just upstream from *lip* (i.e., to the left as shown here). B, *Bam*HI, K, *Kpn*I, *S. Sall*. Thin lines, fragments present in the subclones; open bars, deletions of DNA present in the original insert. Lip, lipase production, assayed qualitatively by measuring the formation of fluorescent halos around colonies on olive oil-rhodamine B agar plates as described by Kouker and Jaeger (1987) except that plates containing minimal medium (Hopwood et al., 1985) lacking glucose and supplemented with 0.2% Casamino acids/1% emulsified olive oil/  $\mu$ g per ml of rhodamine B were used.

TABLE I  
Lipase activity in culture supernatants

Strain [plasmid]*	% activity <sup>b</sup>
M11	0.4
1326[pJ486]	<0.1
1326[pB13]	100.0
1326[pB17]	110.0
1326[pB27]	3.6
1326[pB30]	16.8

\*M11, *Streptomyces* sp. M11; 1326, *S. lividans* 66 strain 1326. Plasmids are described in Fig. 1.

<sup>b</sup>Cultures were grown as described in Fig. 2. Supernatants were used directly in an esterase assay essentially as described by Isobe et al. (1988) using *p*-nitrophenyl laurate as substrate. Activities referred to that of *S. lividans* carrying pB13 (100%), these varied slightly between different experiments, and could be as high as 402 nmol *p*-nitrophenol liberated/min/ml of supernatant. Results for a representative experiment are shown.

tants of *S. lividans* carrying pB13, which was absent from supernatants of *S. lividans* carrying the vector (Fig. 2). This protein was purified from *S. lividans* carrying pB13 by a combination of gel filtration and ion exchange chromatography and tested for lipase activity. It can be clearly seen in Fig. 2 that this protein is indeed responsible for the lipolytic activity showed by *S. lividans*[pB13].

#### (c) Nucleotide sequence analysis of *lip*

The nt sequence of the 1.7-kb *Bam*HI fragment and of the small fragment from the beginning of the insert to the first *Bam*HI site was determined (Fig. 3). FRAME analysis (Bibb et al., 1984; not shown) revealed only one complete ORF in the 1965 nt long sequence: the only possible start codon in the region identified by FRAME analysis as the start of this ORF would be the GTG codon at nt 256. Seven bp upstream from this start codon there is a sequence with the characteristics of an RBS (Bibb and Cohen, 1982) which in fact overlaps the first *Bam*HI site. This explains the greatly reduced lipase activity of *S. lividans* carrying pB27 (Fig. 1 and Table I), since in this case expression would require transcription originating elsewhere in the vector, and the RBS would be partially removed (although an alternative RBS with sequence 5'-GGGGA is generated). Immediately after the start codon the sequence reveals a region with all the properties of a signal peptide, including a charged domain with several arginines, followed by a hydrophobic region rich in Ala and Leu residues, and several putative processing sites (which usually in *Streptomyces* conform to an Ala-Xaa-Ala motif; Hütter and Eckhardt, 1988). That only one of these is used, and that this ORF is indeed the lipase-encoding gene was shown by determining the N-terminal sequence of the purified extracellular lipase, which gave

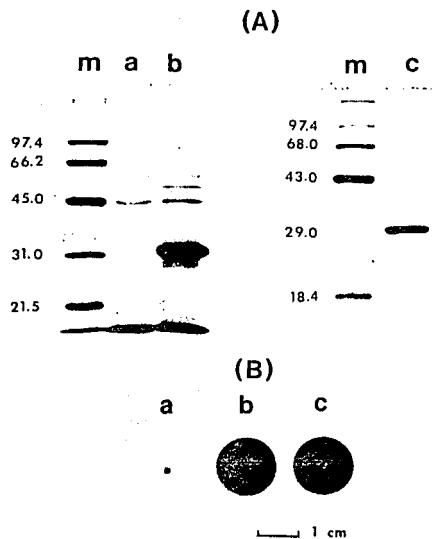


Fig. 2. Analysis of extracellular proteins produced by *S. lividans*[pB13], and identification of the cloned gene product. *S. lividans* 66 (John Innes Institute strain 1326) carrying either pIJ486 or pB13 was grown in LB supplemented with 34% sucrose 25 mM Tris-HCl pH 7.50  $\mu$ g Th per ml. 25-ml cultures were grown at 30 C with constant shaking (250 rpm) for 72 h, after which time the mycelia were spun down and 1 ml of culture supernatant was processed as described by Viroille and Bibb (1988). The 28-kDa protein was purified from the supernatant of a 500-ml culture of *S. lividans*[pB13] grown in the same medium at 30 C for 72 h. The protein from the supernatant was precipitated with ammonium sulfate at 60% saturation, collected by centrifugation, resuspended in 5 ml of 50 mM Tris-HCl pH 7, and loaded on a 150-ml Ultrogel AcA54 gel filtration column (IBF) equilibrated with the same buffer. Fractions showing lipase activity were pooled, dialysed extensively against 10 mM K-phosphate buffer, pH 6 and loaded onto a 5-ml carboxymethyl-cellulose column; the column was washed with 20 ml of the same buffer and the bound protein eluted with a 0.1 M to 1 M NaCl gradient. Lipase eluted at about 0.2 M NaCl. (A) 0.1% SDS-12% PAGE of culture supernatants of *S. lividans* carrying either pIJ486 (lane a) or pB13 (lane b), and of 2  $\mu$ g of purified extracellular lipase (lane c). Lanes marked with an m show molecular size markers (in kDa). (B) Lipase assay carried out by allowing 20  $\mu$ l of culture supernatants of *S. lividans* carrying pIJ486 (a), or pB13 (b) to diffuse on 1% agar plates containing an emulsion of 1% tributyrin in 50 mM Tris-HCl, pH 8. Purified lipase (1  $\mu$ g) was allowed to diffuse in the same plate (c).

the sequence AANPYERGPA; therefore, the signal peptide is 48 aa long. Cloned *lip* genes of different origins show little overall similarity, except for a conserved motif surrounding a Ser residue that has been shown to be part of the catalytic site (Brady et al., 1990; Winkler et al., 1990). This motif is Gly-Xaa<sub>1</sub>-Ser-Xaa<sub>2</sub>-Gly where Xaa can be any aa, although some preference for His at the

Xaa<sub>1</sub> position has been observed (Boel et al., 1988; Shimada et al., 1989). Such a sequence is indeed present in this ORF, as indicated in Fig. 3. The predicted molecular size of the protein, according to the sequence, would be 32.6 kDa, and that of the extracellular enzyme 27.9 kDa, which is in close agreement to the size of the protein determined from SDS-PAGE (Fig. 2).

A search for secondary structures was carried out using the PCFOLD program of Zucker (1989). An inverted repeat is predicted to be present upstream from the gene (nt 68-109), with a  $\Delta G$  of  $-33.2$  kcal/mol; downstream from *lip* is another inverted repeat (nt 1272-1309), with a predicted  $\Delta G$  of  $-27.6$  kcal/mol. The most likely function of this downstream structure would be to act as a transcriptional terminator, which would imply that the *lip* gene is monocistronic. A 6-bp direct repeat is present starting at nt 148 and 156. FRAME analysis also revealed the presence of an interrupted ORF in the *Bam*HI fragment, which would read in the same orientation as *lip*. The most likely start codon for this ORF would be a GTG codon at nt 1584, preceded by a sequence with the characteristics of an RBS (nt 1576-1580); upstream from it is a sequence that shows an almost perfect match with a typical consensus  $-35$  region for a vegetative promoter (starting at nt 1471), which would make the hexanucleotide 5'-GGCGGT at nt 1495-1500 a likely, albeit unusual,  $-10$  promoter region. Given the distance between the two genes, the presence of a putative terminator downstream from *lip* and of a putative promoter upstream from the second ORF it seems unlikely that these two genes are cotranscribed.

An unexpected result was obtained with pB30 and pB31 (Fig. 1); these two plasmids harbor the same insert in opposite orientations in pIJ702 (Katz et al., 1983). With either plasmid, lipase activities were always 6 to 10-fold lower than with pB13 (Table I). The same fragment was also cloned in pIJ486 in both orientations and the same low activities were observed. The most likely explanation would be that another gene in the original pB13 insert is required for the high-level expression of *lip*. This effect could be at either the transcriptional or translational level, or it might reflect a requirement for the processing or secretion of the enzyme into the medium. In *Pseudomonas cepacia lip* expression requires not only the structural gene but a second gene whose function is not completely clear, although it appears to be involved in secretion of the mature enzyme (Jorgensen et al., 1991); in this case, however, both genes are closely linked and in fact may be cotranscribed. If there is a another gene required for high level expression of *lip*, then it is either interrupted by the *Sall* site shown on Fig. 1 or is to its right. Further subcloning and sequencing are under way to identify the responsible gene(s).

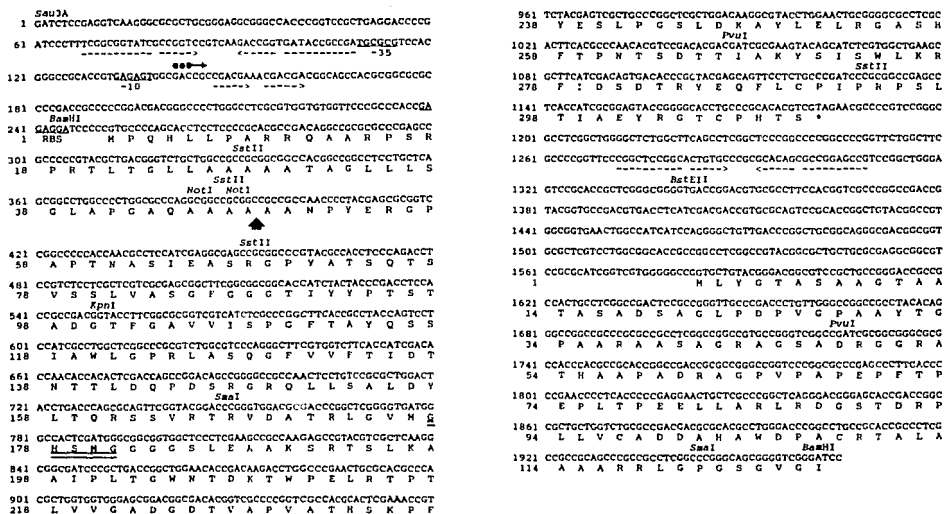


Fig. 3. The nt sequence of the *Streptomyces* sp. M11 structural gene and flanking regions was determined using the Sequemase 2.0 and TAQuence kits from USB (Cleveland, OH), according to the manufacturer's instructions. Fragments were cloned in M13mp18 in both orientations and a series of overlapping ExoIII-generated deletions were obtained according to Sambrook et al. (1989). The -10 and -35 regions of the lipase gene promoter are underlined, as is the RBS. Arrows below the sequence indicate inverted or direct repeat sequences. A thick upward arrow indicates the processing site for signal peptidase; this was determined by carrying out N-terminal sequencing of the purified extracellular protein by binding 500 pmol to a PVDF Immobilon membrane and running ten sequencing cycles on a MilliGene Bioscience ProSequencer with an integrated phenylisothiodantoin analyzer (Millipore). The *tsp* is indicated by circles followed by an arrow in the direction of transcription. The conserved region surrounding the active-site Ser is double-underlined. This sequence has been submitted to EMBL GenBank DDBJ databases under accession No. M86351.

#### (d) Identification of the *lip* promoter

Since the pB13 insert starts only 255 bp upstream from the start of *lip*, and since it is cloned downstream from the *fd* terminator of pIJ486, then all transcription should originate in this region. The *tsp* was identified by S1 mapping (Fig. 4), leaving the hexanucleotide 5'-GAGAGT (starting at nt 133) as the -10 region, separated by 17 nt from the most likely -35 region, TGGCGG, at nt 110. The -10 region is similar to that of other *Streptomyces* vegetative promoters (compare with the *gyl*, *erm* and pIJ101 promoters, Hütter and Eckhardt, 1988); on the other hand, the -35 region has a poor match with the *Streptomyces* consensus (Hopwood et al., 1986) but the most conserved base (the first T) is present. Despite this, the gene can be expressed at high levels during vegetative growth, as indicated by the large amounts of lipase secreted by cells carrying pB13. As was previously mentioned an inverted repeat is present just upstream from the -35 region of the promoter; one might speculate that it functions in the positive regulation of *lip*, given the finding that another gene

appears to be required for high-level expression. Further transcriptional analysis, and identification of any regulatory gene(s) will be required to confirm this. Such work is in progress in our laboratory.

#### (e) Conclusions

(1) A *lip* gene from *Streptomyces* sp. M11 can be efficiently expressed when cloned in a high-copy-number vector in *S. lividans*, leading to overproduction of the extracellular enzyme.

(2) The *lip* gene from *Streptomyces* sp. M11 is most likely monocistronic, and is expressed from a promoter resembling other *Streptomyces* vegetative promoters.

(3) The nt sequence of *lip* reveals the presence of a 48-aa signal peptide, and of a motif surrounding the active-site Ser which is similar to that of other lipases of different prokaryotic and eukaryotic origins. The enzyme has a molecular size of about 28 kDa.

(4) Expression of the *lip* gene seems to be positively regulated by another, as yet unidentified, gene.



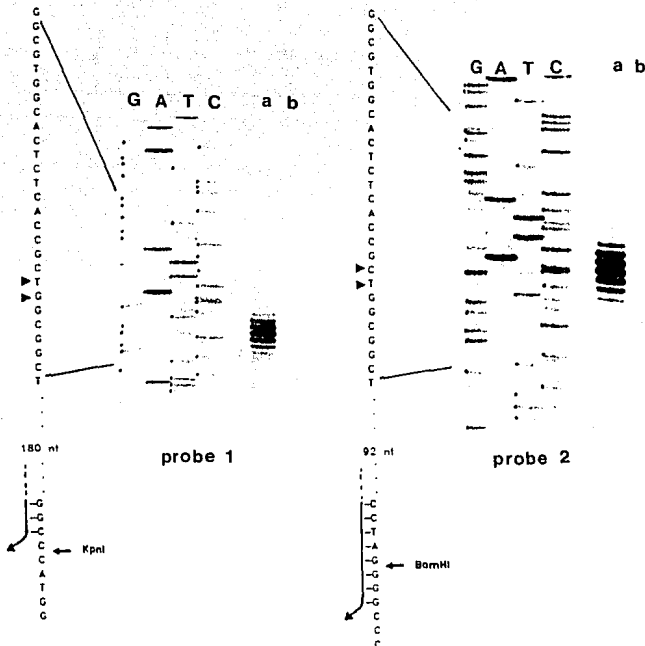


Fig. 4. S1 nuclease mapping of the *lip* gene *tsp* and promoter.  $^{32}$ S-labeled probes were essentially prepared as described by Aldea et al. (1988) except that Sequenase 2.0 (from USB) was used in probe preparation. The 2.8-kb *Sma*I fragment from the pJ486 polylinker to the *Sma*I site shown in Fig. 1 was cloned in the *Sma*I site of M13mp19 in an orientation such that the lipase template strand would be generated by primer extension of the M13 universal primer. This clone was then cut with *Sma*II, blunt-ended with Klenow DNA polymerase in the absence of dNTPs, *Sma*I digested and ligated. This construct was used to generate probe 1. Probe 2 was generated from a construct obtained by *Bam*HI digestion of the same *Sma*I insert in M13mp19. Cultures were grown as described in Fig. 2, and total RNA purified as described in Hopwood et al. (1985). Total RNA (20  $\mu$ g) from cultures of *S. lividans* carrying either pB13 (lane a) or pJ486 (lane b) were lyophilized with the probe, and resuspended in 20  $\mu$ l of 2 M Na-trichloroacetate buffer (Murray, 1986); hybridizations and S1 nuclease treatment were as described by Aldea et al. (1988). S1 protected fragments were run together with sequencing reactions generated from the same M13 clone used to obtain the probe, that were later precipitated and digested with either *Kpn*II in the case of probe 1, or *Bam*HI in the case of probe 2. Note that the point of sequence divergence between the mRNA and the probe (and therefore the 5' end of each protected fragment) does not correspond to the 5' end of the digested sequencing ladders (it is 1 nt shorter in the case of probe 1, and 3 nt longer in the case of probe 2; this difference has been corrected for, and arrowheads point to the most likely *tsp*. Also note that the sequencing reactions could not be digested to completion, even though an excess of enzyme was used, as indicated by the presence of a few extra bands that correspond to the undigested sequence: this is particularly evident in the A and T lanes, in the case of probe 1, and in the G and C lanes in the case of probe 2.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We are very grateful to F. Zamudio for determining the N terminus of the purified lipase, to M. Ortiz and C. Castro for technical assistance, to Mr. S.J. Lucania (E.J. Squibb and Sons, New Brunswick, NJ) for the gift of Th, and to Dr. F. Bastarrachea for continuous encouragement and his review of the manuscript. This work was supported in part by grant DGAPA-IN301191 from the National University of Mexico.

#### REFERENCES

- Aldea, M., Claverie-Martin, F., Diaz-Torres, M.R. and Kushner, S.R.: Transcript mapping using [ $^{32}$ S]DNA probes, trichloroacetate solvent and dideoxysequencing ladders: a rapid method for the identification of transcriptional start sites. *Gene* 65 (1988) 101-110.
- Arima, K., Liu, W.-H. and Beppu, T.: Isolation and identification of the lipolytic and thermophilic fungus. *Agric. Biol. Chem.* 36 (1972) 1913-1917.
- Bader, F.G.: Physiology and fermentation development. In: Queener, S.W. and Day, L.E. (Eds.), *The Bacteria*. Vol IX. Antibiotic Producing *Streptomyces*. Academic Press, Orlando, FL, 1986 pp. 281-321.

- Bibb, M.J. and Cohen, S.N.: Gene expression in *Streptomyces*: construction and application of promoter-probe plasmid vectors in *Streptomyces lividans*. *Mol. Gen. Genet.* 187 (1982) 265-277.
- Bibb, M.J., Findlay, P.R. and Johnson, M.W.: The relationship between base composition and codon usage in bacterial genes and its use for the simple and reliable identification of protein-coding sequences. *Gene* 30 (1984) 157-166.
- Björkling, F., Godtfredsen, S.E. and Kirk, O.: The future impact of industrial lipases. *Trends Biotechnol.* 9 (1991) 360-363.
- Boel, E., Høge-Jensen, B., Christensen, M., Thim, L. and Fiil, N.: *Rhizomucor miehei* triglyceride lipase is synthesized as a precursor. *Lipids* 23 (1988) 701-706.
- Brady, L., Brzozowski, A.M., Derewanda, Z.S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J.P., Christiansen, L., Høge-Jensen, B., Nørskov, L., Thim, L. and Menge, U.: A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* 343 (1990) 767-770.
- Daza, A., Gil, J.A., Vignal, T. and Martin, J.F.: Cloning and characterization of a gene of *Streptomyces griseus* that increases production of extracellular enzymes in several species of *Streptomyces*. *Mol. Gen. Genet.* 222 (1990) 384-392.
- Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiate, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M. and Schrempf, H.: *Genetic Manipulation of Streptomyces: A Laboratory Manual*. John Innes Foundation, Norwich, UK, 1985.
- Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Janssen, G.R., Malpartida, F. and Smith, C.P.: Regulation of gene expression in antibiotic-producing *Streptomyces*. In: Booth, I.R. and Higgins, C.F. (Eds.), *Regulation of Gene Expression: 25 Years On*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1986, pp. 251-276.
- Hütter, R. and Eckhardt, T.: Genetic manipulation. In: Goodfellow, M., Williams, S.T. and Mordarski, M. (Eds.), *Actinomycetes in Biotechnology*. Academic Press, San Diego, CA, 1988, pp. 89-184.
- Isobe, K., Akiba, T. and Yamaguchi, S.: Crystallization and characterization of lipase from *Penicillium cyclopium*. *Agric. Biol. Chem.* 52 (1988) 41-47.
- Jørgensen, S., Skov, K.W. and Diderichsen, B.: Cloning, sequence and expression of a lipase gene form *Pseudomonas cepacia*: lipase production in heterologous hosts requires two *Pseudomonas* genes. *J. Bacteriol.* 173 (1991) 559-567.
- Katz, E., Thompson, C.J. and Hopwood, D.A.: Cloning and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans*. *J. Gen. Microbiol.* 129 (1983) 2703-2714.
- Kouker, G. and Jaeger, K.-E.: Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (1987) 211-213.
- Murray, M.G.: Use of sodium trichloroacetate and mung bean nuclease to increase sensitivity and precision during transcript mapping. *Anal. Biochem.* 158 (1986) 165-170.
- Peczyńska-Czoch, W. and Mordarski, M.: Actinomycete enzymes. In: Goodfellow, M., Williams, S.T. and Mordarski, M. (Eds.), *Actinomycetes in Biotechnology*. Academic Press, San Diego, CA, 1988, pp. 220-283.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- Shimada, Y., Sugihara, A., Tominaga, Y., Izumi, T. and Tsunasawa, S.: cDNA molecular cloning of a *Geotrichum candidum* lipase. *J. Biochem.* 106 (1989) 383-388.
- Sztajer, H., Maliszewska, I. and Wiczorek, J.: Production of exogenous lipases by bacteria, fungi and actinomycetes. *Enzyme Microb. Technol.* 10 (1988) 492-497.
- Virole, M.-J. and Bibb, M.J.: Cloning, characterization and regulation of an  $\alpha$ -amylase gene from *Streptomyces limosus*. *Mol. Microbiol.* 2 (1988) 197-208.
- Ward, J.M., Janssen, G.R., Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J. and Bibb, M.J.: Construction and characterisation of a series of multicopy promoter-probe plasmid vectors for *Streptomyces* using the aminoglycoside phosphotransferase gene from *Tn5* as indicator. *Mol. Gen. Genet.* 203 (1986) 468-478.
- Winkler, F.K., D'Arcy, A., and Hunziker, W.: Structure of human pancreatic lipase. *Nature* 343 (1990) 771-774.
- Zuker, M.: Computer prediction of RNA structure. *Meth. Enzymol.* 180 (1989) 262-288.

## ANALISIS DE SECUENCIAS DE GENES DE LIPASAS

Dados los antecedentes respecto a la existencia de homología entre algunas regiones de secuencias de lipasas (Feller, G., 1991; Izumi, T., 1991), se realizó un análisis de la secuencia de aminoácidos de la lipasa clonada de *Streptomyces* sp. M11, con el fin de encontrar, si existieran, zonas de homología con otras lipasas.

Inicialmente se realizó una búsqueda de secuencias similares a la lipasa clonada en la base de datos SWISSPROT20 (la cual contiene 22 654 secuencias de proteínas) utilizando el programa FSTPSCAN de PC/Gene (v. 6.6) de IntelliGenetics. En esta búsqueda se encontró que solamente una secuencia posee una homología significativa respecto a la secuencia de la lipasa de *Streptomyces* sp. M11; la secuencia pertenece a la lipasa 1 de *Moraxella* TA144 la cual fue aislada de agua marina de la Antártida. Este microorganismo tiene una temperatura de crecimiento cercana a los 0°C y las lipasas clonadas y caracterizadas de éste tienen actividad a temperaturas menores a los 10°C (Feller, G. et al., 1990).

Feller (1991) analiza las secuencias de las tres lipasas clonadas de *Moraxella* TA144, y plantea la hipótesis de que la presencia de residuos de glicina cercanos al sitio activo permite la conformación de éste a bajas temperaturas, y por lo tanto se presenta actividad en estas condiciones. Al comparar las secuencias de la lipasa 1 de *Moraxella* con la lipasa clonada de *Streptomyces*, se pudo observar que esta última posee igual mayor número de

residuos de glicina cercanos al sitio activo. Cabe mencionar que la lipasa clonada tiene actividad a temperaturas entre 30 y 37°C.

Considerando que existe una gran heterogeneidad entre secuencias de lipasas y que se han encontrado pequeñas regiones conservadas entre lipasas provenientes de *Pseudomonas* y *Staphylococcus* (Iizumi, T., 1991), se trataron de localizar estos fragmentos sobre la secuencia de la lipasa clonada.

Como puede observarse en la figura 5, existe una cierta variación en los aminoácidos presentes en estas regiones conservadas, por lo que en la localización de estas regiones sobre la secuencia de la lipasa clonada, se consideró este problema, utilizando subsecuencias de búsqueda con ciertas ambigüedades como puede observarse en la fig. 5. Al no obtener ningún resultado positivo en esta búsqueda (excepto en el caso de la región 2, la cual contiene el motivo Gly-X<sub>1</sub>-Ser-X<sub>2</sub>-Gly), se redujo la extensión de las subsecuencias, a considerar solamente las regiones perfectamente conservadas y que contuvieran los residuos His y Asp, los cuales, de acuerdo a Iizumi, podrían ser parte de la tríada del sitio activo Ser...His...Asp. Tampoco en este caso se obtuvieron resultados positivos. Cabe mencionar que se realizó la misma búsqueda de regiones conservadas sobre la secuencia de la lipasa 1 de *Moraxella*, encontrándose los mismos resultados.

## HOMOLOGIA ENTRE ALGUNAS SECUENCIAS DE LIPASAS

Utilizando algunas secuencias de lipasas (Tabla 3), se trató de encontrar si existía alguna secuencia de lipasa (además de la lipasa 1 de *Moraxella*

## REGION 1

P.sp.KWI-56 6 A T R Y P I I L V H G L S G T  
P.fragi 6 N T R Y P I L L V H G L F G F  
S.aureus 302 L N K Y P V V F V H G F L G L  
S.hyicus 260 K N K D P F V F V H G F T G F

subsec. 1 P # # # V H G # X G  
subsec. 1' V H G

## REGION 2

P.sp.KWI-56 79 T K V N L V G H S Q G G L T S R Y  
P.fragi 75 Q R V N L I G H S Q G A L T A R Y  
S.aureus 404 K K V H L V G H S M G G Q T I R L  
S.hyicus 361 H P V H F I G H S M G G Q T I R L

subsec. 2 # # G H S X G 0

## REGION 3

P.sp.KWI-56 102 D L V A S V T T I G T P H R G S E F A D F  
P.fragi 98 E L I A S V T S V S G P N H G S E L A D R  
S.aureus 453 N M V A S I T T L A T P H N G S Q A A D K  
S.hyicus 410 N M V T S I T T I A T P E N G T H A S D D

subsec. 3 V X S # T X X X T P H X G X X X X D  
subsec. 3' S # T

## REGION 4

P.sp.KWI-56 262 Q N D G L V S K C S A L  
P.fragi 236 E N D G M V G R F S S H  
S.aureus 601 K N D G V V P V I S S L  
S.hyicus 557 P N D G L V S E I S S Q

subsec. 4 N G D # V 3 X X S  
subsec. 4 D = X # X X X S

## REGION 5

P.sp.KWI-56 283 K W N H L D E I N Q  
P.fragi 257 P L D H L D T I N H  
S.aureus 642 G W D H V D F I G V  
S.hyicus 597 G W D H S D F I G N

subsec. 5 H X D X #  
subsec. 5' H X D

**Fig. 5.** Regiones conservadas entre secuencias de lipasas (Iizumi *et al.*, 1991), y las subsecuencias utilizadas en este trabajo. Símbolos: X: cualquier aminoácido, #: aa. hidrofóbicos neutros, =: aa. hidrofílicos neutros, 0: aa. pequeños, 3: aa. formadores de doblez beta. (Programa PESEARCH de PC/Gen v. 6.6)

CLAVE	FUENTE	REFERENCIA
LIP\$STRM11	<i>Streptomyces</i> sp. M11	Pérez, C. <i>et al.</i> 1993
LIP\$MORAX1	<i>Moraxella</i> TA144 (lip 1)	Feller, G. <i>et al.</i> , 1990
LIP\$MORAX2	<i>Moraxella</i> TA144 (lip 2)	Feller, G. <i>et al.</i> , 1991a
LIP\$MORAX3	<i>Moraxella</i> TA144 (lip 3)	Feller, G. <i>et al.</i> , 1991b
LIP\$PSEUD1	<i>Pseudomonas cepacia</i> DSM3959	Jorgensen, S. <i>et al.</i> , 1991
LIP\$PSEUD2	<i>Pseudomonas</i> nov sp. 109	Ihara, F. <i>et al.</i> , 1991
LIP\$PSEUD3	<i>Pseudomonas</i> sp. KWI-56	Iizumi, T. <i>et al.</i> , 1991
LIP\$PSEUD4	<i>P. fluorescens</i> SIK W1	Chung, G.H. <i>et al.</i> , 1991
LIP\$PFRAG1	<i>P. fragi</i> IFO-12049	Aoyama, S. <i>et al.</i> , 1988
LIP\$PFRAG2	<i>P. fragi</i> IFO-3458	Kugimiya, W. <i>et al.</i> , 1986
LIP\$STAPHY	<i>Staph. hycus</i> DSM 20459	Götz, F. <i>et al.</i> , 1985
LIP\$PENICI	<i>Penicillium camembertii</i> U150	Yamaguchi, S. <i>et al.</i> , 1991
LIP\$GEOTR1	<i>Geotrichum candidum</i> ATCC 34614 (lip I)	Shimada, Y. <i>et al.</i> , 1989a
LIP\$GEOTR2	<i>Geotrichum candidum</i> ATCC 34614 (lip II)	Shimada, Y. <i>et al.</i> , 1989b
LIP\$RHIZOP	<i>Rhizopus delemar</i> ATCC 34612	Haas, M.J. <i>et al.</i> , 1991
LIP\$CANDID	<i>Candida cylindracea</i> MS-5	Kawaguchi, Y. <i>et al.</i> , 1989
LIP\$GUINEA	Conejillo de indias. Lipasa lipoprotéica	Enerbäck, S. <i>et al.</i> , 1987
LIP\$HUMANP	Lipasa pancreática humana	Lowe, M.E., <i>et al.</i> , 1989
LIP\$RATHEP	Lipasa hepática de rata	Komaromy, M.C. <i>et al.</i> , 1987

**Tabla 3.** Secuencias de lipasas utilizadas en este estudio.

TA144), que resultara significativamente homóloga con la lipasa de *Streptomyces* sp. M11. Esto se hizo utilizando los programas PALIGN y PCOMPARE de PC/Gene (v. 6.6). En este estudio no se encontró ninguna secuencia que resultara similar a la lipasa clonada, con excepción de la lipasa 1 de *Moraxella*, como puede observarse en la figura 6.

Finalmente, se construyó un dendrograma con las secuencias de lipasas utilizadas en la comparación anteriormente mencionada. Esto se hizo utilizando el programa CLUSTAL, de PC/Gene, el cual agrupa secuencias de proteínas de acuerdo a su similitud. (ver fig. 7).

En el dendrograma construido se pueden observar diferentes grupos de secuencias; prácticamente todas las secuencias provenientes de *Pseudomonas* se encuentran juntas, así como las de mamíferos y hongos filamentosos. También se puede observar que la lipasa 1 de *Moraxella* TA144 queda formando un grupo con la lipasa de *Streptomyces* sp. M11.

## ALINEAMIENTO ENTRE SECUENCIAS DE LIPASA

Secuencias a alinear:

LIP\$STRM11.

ORIGEN: *Streptomyces* sp. M11

Número total de residuos: 310.

LIP\$MORAX1.

ORIGEN: *Moraxella* TA144 (lip 1)

Número total de residuos: 319.

Matriz de comparación: Dayhoff MDM-78

Aminoácidos idénticos: '|'

Aminoácidos similares: '.'

Aminoácidos 'similares': A,S,T; D,E; N,Q; R,K; I,L,M,V; F,Y,W

```

LIP$STRM11- MPQHLLPARRQAARPSRPRTLTLGLLAAAATAGLLSGLAPGAQAAAAAA -50
| . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
LIP$MORAX1- M---FIMIKKSELAKAIIVTGALVFSIPTLAEVTLSETTVSSIKSEATVS -47

LIP$STRM11- NPYERGPAPTNASIEASR-----GPYATSQTSVSSILVASFVGG -88
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
LIP$MORAX1- STKKALPATPSPDCIADSKITAVALSQTRDNGPFISIRTKRISRQSAKGFVGG -97

LIP$STRM11- GTIYYPTSTAD-GTFGAVVISPGFTAYQSSIAWLGPRLASQGFVVTIDT -137
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
LIP$MORAX1- GTIHYPTNASCGGLGAIADVPGYVSYENSIKWWGPRLASWGFVVTINT -147

LIP$STRM11- NTTLDQPDSSRGRQLLSALDYLTQRSSVVRTRVDATRLGVMGHSMGGGGGLE -187
| . | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
LIP$MORAX1- NSIYDDPDSRAAQLNAALDNMIADDTVGSMDPKRLGAIWGSMMGGGGALK -197

LIP$STRM11- AAKSRTSLKAAIPLTGWNTDKTWPELRTPTLVVGDGDTVAPVATHSKPF -237
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
LIP$MORAX1- LATERSTVRAIMPLAPYH-DKSYGEVKTPTLVIACEDDRIAETKKYANAF -246

LIP$STRM11- YESLPGSLDKAYLELRGASHFTPN--SDTTIAKYSISWLKRFIDSDTRY -285
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
LIP$MORAX1- YKNAIGP--KMKVEVNNGSHFCPSYRFNEILLKSGIAWMQRYINNDTRF -294

LIP$STRM11- EQFLCPIPRPSLTIAEYRGTCPHTS -310
. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
LIP$MORAX1- DKFLCANENYSKSPRISAYDYKDCP -319

```

Aminoácidos idénticos: 104 ( 33.5%)

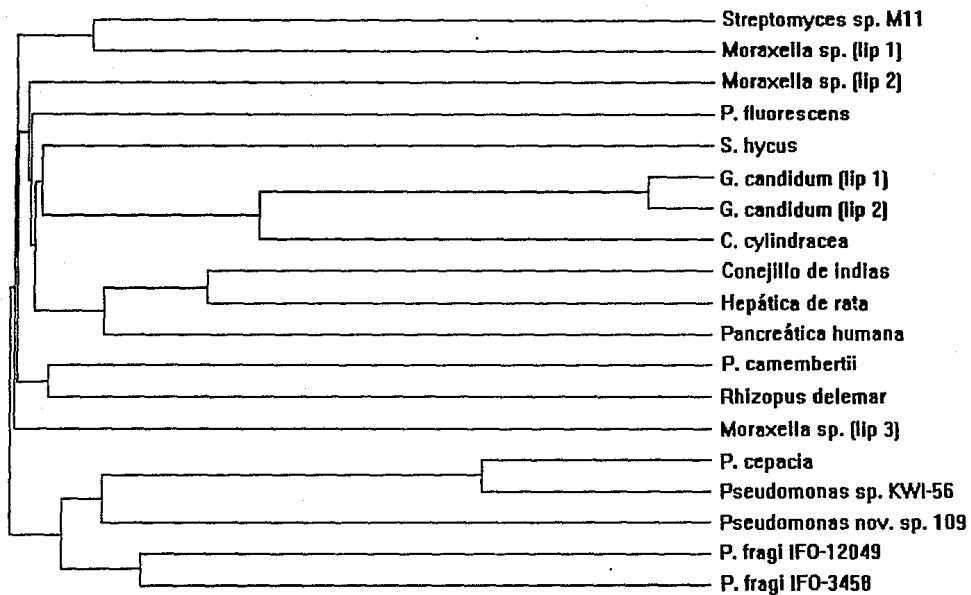
Aminoácidos similares: 56 ( 18.1%)

Número de gaps insertados en LIP\$STRM11: 3

Número de gaps insertados en LIP\$MORAX1: 3

**Fig. 6.** Alineación entre la secuencia de la lipasa de *Streptomyces* sp. M11 y la proveniente de *Moraxella* TA144.





**Fig. 7.** Dendrograma con secuencias de lipasas de diferentes orígenes.

## CONCLUSIONES

1. El gen de lipasa de *Streptomyces* sp. M11 pudo ser clonado y expresado eficientemente en *S. lividans* 66, utilizando el vector de alto número de copias pIJ486.
2. El gen de lipasa de *Streptomyces* sp. M11 debe ser monocistrónico, y se expresa por un promotor similar a otros promotores vegetativos de *Streptomyces*.
3. En la secuencia del gen de lipasa se puede ver un péptido señal de 48 aminoácidos, y un motivo (Gly-X-Ser-X-Gly), perteneciente al sitio activo y que es característico de todas las lipasas.
4. La expresión del gen de lipasa parece ser regulada positivamente por el producto de otro gen, todavía no identificado.
5. La secuencia de este gen de lipasa es significativamente parecida a la secuencia del gen de lipasa 1 de *Moraxella* sp. TA144, por lo que puede pensarse en la existencia de al menos dos grupos de lipasas en procariontes.

## REFERENCIAS

- Aoyama, S., Yoshida, N., Inouye, S. (1988). Cloning, sequencing and expression of the lipase gene from *Pseudomonas fragi* IFO-12049 in *E. coli*. FEB 242(1): 36-40.
- Baltz, R.H. (1986). Mutation in *Streptomyces*, en *The Bacteria* vol. 9. Sokatch, J.R., Ornston, L.N., Eds., Academic Press, London.
- Bibb, M.J., Cohen, S.N. (1982). Gene expression in *Streptomyces*: construction and application of promoter-probe plasmid vectors in *Streptomyces lividans*. Mol. Gen. Genet. 187: 265-277.
- Bibb, M.J., Findlay, P.R., Johnson, M.W. (1984). The relationship between base composition and codon usage in bacterial genes and its use for the simple and reliable identification of protein-coding sequences. Gene 30: 157-166.
- Bibb, M.J., Ward, J.M., Hopwood, D.A. (1978). Transformation of plasmid DNA into *Streptomyces* at high frequency. Nature, 274: 398-400.
- Brady, L., Brzozowski, A.M., Derewenda, Z.S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J.P., Christiansen, L., Høge-Jensen, B., Nørskov, L., Thim, L., Menge, U. (1990). A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. Nature 343: 767-770.
- Chater, K.F. Morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*, in *Microbial Development*, Losick, R. y Shapiro, L., Eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1984.
- Chater, K.F. (1989). Multilevel regulation of *Streptomyces* differentiation. TIG, 5(11): 372-377.
- Chung, G.H., Lee, Y.P., Jeohn, G.H., Yoo, O.J., Rhee, J.S. (1991). Cloning and nucleotide sequence of the thermostable lipase gene from *Pseudomonas fluorescens* SIK W1. Agric. Biol. Chem. 55(9): 2359-2365.
- Crandall, L.W., Hamill, R.L. Antibiotics produced by *Streptomyces*: major structural classes, in *The Bacteria: A Treatise on Structure and Function*, Vol. 9, Sokatch, J.R. y Ornston, L.N., Eds., Academic Press, NY, 1986.
- Davis, R.C., Stahnke, G., Wong, G., Doolittle, M.H., Ameis, D., Will, H., Schotz, M.C. (1990). Hepatic lipase: site-directed mutagenesis of a serine residue important for catalytic activity. J. Biol. Chem. 265: 6291-6295.

Desnuelle, P. (1972). The Enzymes 7, 575-616.

Dietz, A. Structure and taxonomy of *Streptomyces*, in The Bacteria: A Treatise on Structure and Function. Vol. 9. Sokatch, J.R. y Ornston, L.N., Eds., Academic Press, NY, 1986.

Enerbäck, S., Semb, H., Bengtsson-Olivecrona, G., Carlsson, P., Hermansson, M.L., Olivecrona, T., Bjursell, G. (1987). Molecular cloning and sequence analysis of cDNA encoding lipoprotein lipase of guinea pig. *Gene* 58: 1-12.

Feller, G., Thiry, M., Arpigny, J.L., Mergeay, M. Gerday, C. (1990). Lipases from psychrotrophic antarctic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 66: 239-244.

Feller, G., Thiry, M., Gerday, C. (1990). Sequence of a lipase gene from the antarctic psychrotroph *Moraxella* TA144. *Nucleic Acid Res.* 18(21): 6431 .

Feller, G., Thiry, M., Gerday, C. (1991a). Nucleotide sequence of the lipase gene lip3 from the antarctic psychrotroph *Moraxella* TA144. *Biochim. et Biophys. Acta* 1088: 323-324.

Feller, G., Thiry, M., Gerday, C. (1991b). Nucleotide sequence of the lipase gene lip2 from the antarctic psychrotroph *Moraxella* TA144 and site-specific mutagenesis of the conserved serine and histidine residues. *DNA and Cell Biol.* 10(5): 381-388.

Fernandez-Moreno, M.A., Caballero, J.L., Hopwood, D.A., Malpartida, F. (1991). The *act* cluster contains regulatory and antibiotic export genes, direct targets for translational control by the *bldA* tRNA gene of *Streptomyces*. *Cell*, 66: 769-780.

Goodfellow, M., Cross, T. (1984). Classification, in The Biology of the Actinomycetes, Goodfellow, M., Mordarski, M., y Williams, S.T., Eds., Academic Press, London.

Götz, F., Popp, F., Korn, E., Schleifer, K.H. (1985). Complete nucleotide sequence of the lipase gene from *Staphylococcus hyicus* cloned in *Staphylococcus carnosus*. *Nucleic Acids Res.* 13(16): 5895-5906.

Guidoni, A., Benkouka, F., DeCaro, J., Rovey, M. (1981). Characterization of the serine reacting with diethyl p-nitrophenyl phosphate in porcine pancreatic lipase. *Biochim. Biophys. Acta.* 660, 148.

Gusek, T.W., Kinsella, J.E. (1992). Review of the *Streptomyces lividans*/ vector plJ702 system for gene cloning. *Critical Reviews in Microb.* 18 (4): 247-270.

Haas, M.J., Allen, J., Berka, T.R. (1991). Cloning, expression and characterization of a cDNA encoding lipase from *Rhizopus delemar*. *Gene* 109: 107-113.

Henderson, G., Krygsmann, P., Liu, C.J., Davey, C.C. Malek, L.T. (1987). Characterization and structure of genes for proteases A and B from *Streptomyces griseus*. *J. Bact.* 169: 3778.

Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiate, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M., Schrepf, H. *Genetic manipulation of Streptomyces: A laboratory Manual*. The John Innes Foundation, Norwich, England, 1985.

Hopwood, D.A., Kieser, T., Lydiate, D.J., Bibb, M.J. *Streptomyces plasmids: their biology and use as cloning vectors*, in *The Bacteria: A Treatise on Structure and Function*, vol. 9. Sokatch, J.R. y Ornston, L.N., Eds., Academic Press, 1986.

Ihara, F., Kageyama, Y., Hirata, M., Nihira, T., Yamada, Y. (1991). Purification, Characterization, and molecular cloning of lactonizing lipase from *Pseudomonas* species. *J. Biol. Chem.* 266(27): 18135-18140.

Iizumi, T., Nakamura, K., Shimada, Y., Sugihara, A., Tominaga Y., Fukase, T. (1991). Cloning, nucleotide sequencing, and expression in *Escherichia coli* of a lipase and its activator genes from *Pseudomonas* sp. KWI-56. *Agric. Biol. Chem.* 55(9): 2349-2357.

Jaurin, B., Cohen, S.N. (1984). *Streptomyces lividans* RNA polymerase recognizes and uses *Escherichia coli* transcriptional signals. *Gene*, 28: 83.

Jorgensen, S., Skov, K.W., Diderichsen, B. (1991). Cloning, sequence, and expression of a lipase gene from *Pseudomonas cepacia*: lipase production in heterologous hosts requires two *Pseudomonas* genes. *J. Bact.* 173(2): 559-567.

Kawaguchi, Y., Honda, H., Taniguchi-Morimura, J., Iwasaki, S. (1989). The codon CUG is read as serine in an asporogenic yeast *Candida cylindracea*. *Nature* 341: 164-166.

Kendall, K.J., Cohen, S.N. (1988). Complete nucleotide sequence of the *Streptomyces lividans* plasmid pIJ101 and correlation of the sequence with genetic properties. *J. Bact.* 170(10): 4634-4651.

Kieser, T., Hopwood, D.A., Wright, H.M., Thompson, C.J. (1982). pIJ101, a multi-copy broad host-range *Streptomyces* plasmid: functional analysis and development of DNA cloning vectors. *Mol. Gen. Genet.* 185: 223.

- Komaromy, M.C., Schotz, M.C. (1987). Cloning of rat hepatic lipase cDNA: evidence for a lipase gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 1526-1530.
- Kugimiya, W., Otani, Y., Hashimoto, Y., Takagi, Y. (1986). Molecular cloning and nucleotide sequence of the lipase gene from *Pseudomonas fragi*. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 141(1): 185-190.
- Lowe, M.E., Rosenblum, J.L., Strauss, A.W. (1989). Cloning and characterization of human pancreatic lipase cDNA. *J. of Biol. Chem.* 264(33): 20042-20048.
- Malpartida, F., Hopwood, D.A. (1984). Molecular cloning of the whole biosynthetic pathway of a *Streptomyces* antibiotic and its expression in a heterologous host. *Nature* 309: 462-464.
- Malpartida, F., Niemi, J., Navarrete, R., Hopwood, D.A. (1990). Cloning and expression in a heterologous host of the complete set of genes for biosynthesis of the *Streptomyces coelicolor* antibiotic undecylprodigiosin. *Gene* 93: 91-99.
- Mendez, C., Chater, K.F. (1987). Cloning of *whiG*, a gene critical for sporulation of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bact.* 169 (12): 5715-5720.
- Omura, S. Introduction, en *The Bacteria: A Treatise on Structure and Function*, Vol. 9, Sokatch, J.R. y Ornston, L.N., Eds., Academic Press, New York, 1986.
- Piret, J.M., Demain, A.L. (1988) *Actinomycetes in Biotechnology: an overview*, en *Actinomycetes in Biotechnology*, Goodfellow, M., Williams, S.T. y Mordarski, M., Eds. Academic Press, London.
- Piret, J., Resendiz, B., Mahro, B., Zhang, J.Y., Serpe, E., Romero, J., Connors, N., Demain, A.L. (1990). Characterization and complementation of a cephalosporin-deficient mutant of *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 560.
- Piret, J.M., Chater, K.F. (1985). Phage-mediated cloning of *bldA*, a region involved in *Streptomyces coelicolor* morphological development, and its analysis by genetic complementation. *J. Bact.* 163 (3): 965-972.
- Sermonti, G., Spada-Sermonti, I. (1956). Gene recombination in *Streptomyces coelicolor*. *J. Gen. Microbiol.* 15: 609.
- Sherman, D.H., Malpartida, F., Bibb, M.J., Kieser, H.M., Bibb, M.J., Hopwood, D.A. (1989). Structure and deduced function of the granaticin-producing poliketide synthase gene cluster of *Streptomyces violaceoruber* Tü22. *EMBO Journal*, 8(9): 2717-2725.

- Shimada, Y., Sugihara, A., Iizumi, T., Tominaga, Y. (1990). cDNA cloning and characterization of *Geotrichum candidum* lipase II. J. Biochem. 107(5): 703-707.
- Shimada, Y., Sugihara, A., Tominaga, Y., Iizumi, T., Tsunasawa, S. (1989). cDNA molecular cloning of *Geotrichum candidum* lipase. J. Biochem. 106(3): 383-388.
- Singer, C.E., Ames, B.N. (1970). Sunlight ultraviolet and bacterial DNA base ratios. Science 170: 822-826.
- Soliveri, J., Brown, K.L., Buttner, M.J., Chater, K.F. (1992). Two promoters for the *whiB* sporulation gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and their activities in relation to development. J. Bact. 174 (19): 6215-6220.
- Sztajer, H., Maliszewska, I. (1988). Production of exogenous lipases by bacteria, fungi and actinomycetes. Enzyme Microb. Technol. 10: 492-497.
- Ward, J.M., Janssen, G.R., Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Bibb, M.J. (1986). Construction and characterisation of a series of multi-copy promoter probe plasmid vectors for *Streptomyces* using the aminoglycoside phosphotransferase gene from Tn5 as indicator. Mol. Gen. Genet. 203: 468-478.
- Wholfarth, S., Hoesche, C., Strunk, C., Winkler, U.K. (1992). Molecular genetics of the extracellular lipase of *Pseudomonas aeruginosa* PA01. J. of Gen. Microbiol. 138: 1325-1335.
- Willey, J., Santamaria, R., Gujjarro, J., Geistlich, M., Losick, R. (1991). Extracellular complementation of a developmental mutation implicates a small sporulation protein in aerial mycelium formation by *S. coelicolor*. Cell 65: 641-650.
- Winkler, F.K., D'Arcy, A., Hunziker, W. (1990). Structure of human pancreatic lipase. Nature 343: 771-774.
- Yamaguchi, S., Mase, T., Takeuchi, K. (1991). Cloning and structure of the mono- and diacylglycerol lipase-encoding gene from *Penicillium camembertii* U-150. Gene 103: 61-67.