



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**"ESTUDIO SOBRE EL TRANSPORTE Y
FOSFORILACION DE DIFERENTES FUENTES DE
CARBONO REPRESORAS EN
Streptomyces peucetius VAR. *caesius*"**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
ALMA ITZEL RAMOS SOLIS



MEXICO, D. F.

1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

101
2e-

255/16



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

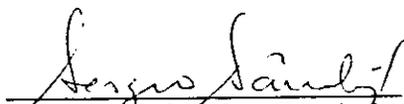
Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

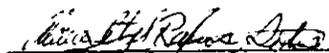
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

Jurado asignado

Presidente QFB Guadalupe Vélez Pratt
Vocal QFB Elsa Escudero García
Secretario Dr. Sergio Sánchez Esquivel
1er Suplente M. en C. Ma. Guadalupe Tsuzuki Reyes
2o Suplente M. en C. Manuel B. Aguilar Ramírez

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio de Microbiología Industrial en el Depto. de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.


Dr. Sergio Sánchez Esquivel
Asesor


Alma Itzel Ramos Solís
Sustentante

*¡Si uno supiera encontrar lo que
hay que decir, cuando todas las
palabras se han levantado del
campo como palomas asustadas!*

Jaime Sabines

*A mi familia
mi papá, mi mamá y mis hermanos Juan Pablo, Amaya e Ileri*

A Sergio

*Al Dr. Sergio Sánchez Esquivel
Por todo su apoyo, dedicación y enseñanzas*

A mis profesores y compañeros de la Facultad

*A mis amigos del laboratorio de Microbiología Industrial por su
amistad y valiosas aportaciones*

A mis amigos de toda la vida

A la Universidad Nacional Autónoma de México

FALTAN PAGINAS

De Ia: \mathcal{I}

A Ia: \mathcal{W}

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

- 1.1 Características de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* 2
- 1.2 Represión catabólica por fuente de carbono 6
 - 1.2.1 Represión catabólica en bacterias Gram-negativas 7
 - 1.2.2 Regulación del metabolismo de carbono en bacterias Gram-positivas 10
- 1.3 Antecedentes 18

2. OBJETIVOS 20

3. MATERIAL Y MÉTODOS

- 3.1 Microorganismos 22
- 3.2 Medios y condiciones de cultivo 22
 - 3.2.1 Preparación de inóculos 22
 - 3.2.2 Cultivos 23
 - 3.2.3 Obtención de extractos enzimáticos libres de células 23
- 3.3 Métodos analíticos 24
 - 3.3.1 Transporte de las fuentes de carbono represoras 24
 - 3.3.2 Determinación de peso seco 26
 - 3.3.3 Fosforilación *in vitro* de carbohidratos 26
 - 3.3.4 Determinación de la actividad de glucosa cinasa 28
 - 3.3.5 Determinación de proteína por el método de Lowry 29

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Transporte de fuentes de carbono represoras en la cepa original y en una mutante 2-Dog^R de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* 32

4.2 Fosforilación *in vitro* de carbohidratos 39

4.3 Transporte de glucosa en la cepa original de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* y en tres cepas sensibles a 2-DOG obtenidas a partir de la mutante 2-Dog^R-21 42

5. CONCLUSIONES 50

APÉNDICE 52

REFERENCIAS 53

ILUSTRACIONES

FIGURAS

- Figura 1.1.**-Ciclo de vida de *Streptomyces* 3
- Figura 1.2.**-Estructura química de la doxorubicina 4
- Figura 1.3.**-Mecanismo propuesto para la regulación del metabolismo de carbono en *E. coli* 9
- Figura 1.4.**-Modelo de regulación catabólica en *Bacillus subtilis* 11
- Figura 1.5.**-Posible mecanismo de represión catabólica en *Streptomyces* 17
- Figura 4.1.**-Transporte de glucosa en la cepa original y en la mutante 2-Dog^R-21 de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* 33
- Figura 4.2.**-Transporte de galactosa en la cepa original y en la mutante 2-Dog^R-21 de *S. peucetius* var. *caesius* 34
- Figura 4.3.**-Transporte de arabinosa en la cepa original y en la mutante 2-Dog^R-21 de *S. peucetius* var. *caesius* 34
- Figura 4.4.**-Transporte de glutamato en la cepa original y en la mutante 2-Dog^R-21 de *S. peucetius* var. *caesius* 35
- Figura 4.5.**-Actividad específica de Glk en la cepa original crecida en diferentes fuentes de carbono 37
- Figura 4.6.**-Fosforilación relativa *in vitro* de glucosa, galactosa y arabinosa por la cepa original y la mutante 2-Dog^R-21 40
- Figura 4.7.**-Ensayo de actividad de Glk sobre glucosa en la cepa original de *S. peucetius* var. *caesius*, en presencia de otras fuentes de carbono represoras 41

Figura 4.8.-Actividad específica de Glk en la cepa original y en las mutantes 2-Dog^R-21, 2-Dog^S-2, 2-Dog^S-11 y 2-Dog^S-53 de *S. peucetius* var. *caesius* 43

Figura 4.9.-Transporte de glucosa en la cepa original y en las mutantes 2-Dog^R-21, 2-Dog^S-2, 2-Dog^S-11 y 2-Dog^S-53 de *S. peucetius* var. *caesius* 46

TABLAS

Tabla 3.1.-Condiciones de cultivo para la determinación del transporte de glucosa, galactosa, arabinosa y glutamato en la cepa original y en la mutante 2-Dog^R-21 de *S. peucetius* var. *caesius* 24

Tabla 3.2.-Actividad específica y actividad ajustada de las fuentes de carbono marcadas empleadas en la determinación del transporte 25

Tabla 3.3.-Condiciones para la determinación de la fosforilación *in vitro* de carbohidratos 27

Tabla 3.4.-Condiciones para la determinación de la actividad de Gik en las cepas de *S. peucetius* var. *caesius* estudiadas 29

Tabla 4.1.-Fenotipo presentado por las diferentes cepas de *S. peucetius* var. *caesius* estudiadas 47

Abreviaturas

l	litros
ml	mililitros
μ l	microlitros
mmol	milimol
mM	milimolar
N	normal
mg	miligramos
μ g	microgramos
mm	milímetros
nm	nanómetros
mCi	milicuries
μ Ci	microcuries
kDa	kilo daltones
h	horas
min	minutos
seg	segundos
rpm	revoluciones por minuto
$^{\circ}$ C	centígrados
MOPS	ácido 3-[N-Morfolino] propansulfónico
Tris-HCl	amortiguador de tris-hidroximetilaminometano-HCl
PPO	2,5-Difeniloxazol
POPOP	1,4-bis[5-fenil-2-oxazolil]bencen;2,2'-p-fenilen-bis [5-feniloxazol]
TCA	ácido tricloro acético
NAD	nicotin adenin dinucleótido fosfato
NADH	nicotin adenin dinucleótido fosfato reducido
ATP	adenin trifosfato
AMP _c	adenin monofosfato forma cíclica
ADN	ácido desoxirribonucléico
2-DOG	2-desoxiglucosa
G6P	glucosa-6-fosfato
ASB	albúmina sérica bovina
SSI	solución salina isotónica (0.85% NaCl)
Gik	glucosa cinasa
G6PDH	glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GC	guanina:citocina

1. INTRODUCCIÓN

1.INTRODUCCIÓN

1.1 CARACTERÍSTICAS DE *STREPTOMYCES PEUCETIUS* VAR. *CAESIUS*

El género *Streptomyces* está constituido por una gran variedad de organismos procariontes Gram-positivos. Estos organismos son generalmente aerobios estrictos y aunque pocos de ellos pueden ser encontrados en ambientes acuáticos, están ampliamente distribuidos en suelos. De hecho, el olor característico de la tierra es a causa de la presencia de una serie de metabolitos llamados geosminas producidos por de estos microorganismos (Hirsch *et al.*, 1985; Madigan *et al.*, 1997). Los estreptomicetos son las bacterias más complejas morfológicamente. Su ciclo de vida involucra la formación de hifas ramificadas que después de un período de crecimiento vegetativo, responden a señales específicas para la producción de cadenas de esporas por unas estructuras especializadas llamadas hifas aéreas (fig.1.1). La formación de las hifas aéreas comúnmente coincide con la producción de metabolitos secundarios (Hirsch *et al.*, 1985; Hopwood, 1988). Los estreptomicetos poseen gran capacidad de sintetizar numerosos antibióticos, moléculas farmacológicamente activas y enzimas extracelulares esenciales en la degradación de biomasa y la asimilación de diversas fuentes de nutrientes (Crandall & Hamill, 1986; Frost *et al.* 1987, Rose, 1979). Más de 500 antibióticos diferentes son producidos por organismos del género *Streptomyces* y una gran cantidad de ellos ha sido estudiada químicamente. Algunos de estos organismos son capaces de producir más de un antibiótico. Esta capacidad, aunada a su complejidad morfológica, ha conferido a estos microorganismos gran importancia industrial y científica.

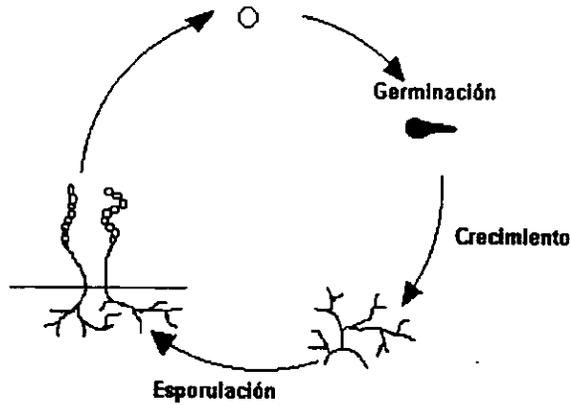


Fig. 1.1. Representación esquemática del ciclo de vida de los microorganismos del género *Streptomyces*.

S. peucetius es una de las especies más importantes en la síntesis de antraciclinas. En 1969 Federico Arcamone y colaboradores aislaron a partir de este microorganismo, por tratamiento mutagénico, una nueva cepa a la que llamaron *Streptomyces peucetius* var. *caesius* (Arcamone, et al., 1969). Esta cepa es la productora de doxorubicina (fig. 1.2), un antibiótico del grupo de las antraciclinas que posee una importante actividad antitumoral. El espectro bactericida de este antibiótico comprende principalmente bacterias Gram-positivas y sólo en algunos casos Gram-negativas (Vanek et al. 1977), sin embargo, no se le ha dado uso como agente antimicrobiano. La doxorubicina posee una acción anticancerígena de más amplio espectro frente a tumores sólidos que la daunomicina, el antibiótico producido por su antecesor, así como una menor toxicidad (Arcamone, 1981). Actualmente, la

doxorubicina es el agente antitumoral de origen microbiano más utilizado clínicamente (Hershberger, 1989; Vandamme, 1984).

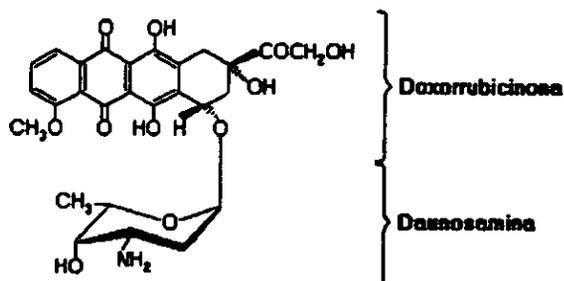


Fig. 1.2. Estructura química de la doxorubicina.

La disponibilidad de metabolitos primarios precursores del metabolismo secundario puede ser un factor determinante en la producción de antibióticos; dentro de estos factores nutricionales podemos mencionar las fuentes de carbono y nitrógeno, los fosfatos y algunos elementos traza como Fe^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} . Además, diversos factores ambientales como la disponibilidad de oxígeno, la temperatura y el pH, repercuten directamente sobre la síntesis de estos metabolitos (Grein, 1987).

La fuente de nitrógeno posee, en general, un efecto estimulador de la producción de antraciclinas en este género; sin embargo, el amonio ejerce un

efecto negativo sobre la expresión del regulón de nitrógeno *Ntr*. Este regulón se induce normalmente en presencia de bajas concentraciones de amonio, lo que es detectado por la proteína NtrB, cuya actividad de cinasa es activada para permitir la fosforilación y activación de un activador transcripcional (NtrC) que controla la expresión de los genes del regulón Ntr (Baumberg *et al.*, 1991; Braña *et al.*, 1986; Kolter & Siegele, 1992).

El fosfato afecta también negativamente la síntesis de antraciclinas. Este nutriente tiene un efecto inhibitorio sobre la producción de tilosina y estreptomicina en *S. kitasatoensis*. Se tiene evidencia sobre el efecto inhibitorio que posee el fosfato sobre la síntesis de doxorubicina por *S. coeruleorubidus*. En *S. peucetius* niveles de fosfato inorgánico superiores a 10 mg/mL afectan negativamente la producción de antraciclinas, sin embargo, aun no se conoce el mecanismo por el cual se lleva a cabo esta regulación por fosfatos (Dekleva *et al.*, 1985).

S. peucetius es capaz de crecer y producir antraciclinas en presencia de diversas fuentes de carbono, como glucosa, manosa, celobiosa, lactosa, fructosa, maltosa y almidón, sin embargo, la glucosa es la fuente de carbono más empleada para la producción de antibióticos (Dekleva *et al.*, 1985). La síntesis de metabolitos secundarios es frecuentemente afectada por la presencia de algunas fuentes de carbono (Demain, 1989; Hodgson, 1982). Este mecanismo de regulación llamado represión catabólica por fuente de carbono esta ampliamente distribuido entre los sistemas microbianos, donde se pueden encontrar diversos y complejos sistemas en un mismo organismo (Saier, 1995). El medio empleado para la producción de antraciclinas por *S. peucetius* var. *caesius*, contiene concentraciones de 60g/l de glucosa (Arcamone *et al.*, 1969). Debido a que estas concentraciones son

consideradas inhibitorias en otras especies de estreptomicetos al presentarse el fenómeno de represión catabólica por fuente de carbono, se había sugerido que en la síntesis de antraciclinas este fenómeno no tenía lugar (Dekleva *et al.*, 1985). Sin embargo, la presencia de altas concentraciones de glucosa favorece la acidificación del medio por la producción de piruvato y diversos intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos como, 2-oxoglutarato y citrato, afectando negativamente la síntesis de antraciclinas (Dekleva & Strohl, 1987). Además, Segura y colaboradores demostraron que la glucosa posee un efecto inhibitor adicional al efecto de pH, que afecta tanto el metabolismo primario como el metabolismo secundario de *S. peucetius var. caesius* (Segura *et al.* 1996).

1.2 REPRESIÓN CATABÓLICA POR FUENTE DE CARBONO

Todos los organismos están dotados de gran capacidad para producir la energía necesaria en sus procesos metabólicos. Sin embargo, poseen también estrategias que evitan la generación de mayor cantidad de energía de la que realmente necesitan. Estos mecanismos reguladores controlan todos los aspectos del metabolismo celular. Así, el metabolismo del carbono se encuentra también regulado.

La presencia de fuentes de carbono rápidamente metabolizables, como es el caso de la glucosa, puede resultar en la modificación de las funciones metabólicas en diversas bacterias impidiendo la expresión de un gran número de genes requeridos en el metabolismo de fuentes de carbono alternativas, así como en la producción de metabolitos secundarios. Este proceso de regulación del metabolismo es conocido como represión catabólica por fuente

de carbono y se encuentra ampliamente distribuido entre los sistemas microbianos, donde se han encontrado gran complejidad y diversidad en los mecanismos de regulación por este nutriente.

En los organismos procariontes, el estudio del fenómeno de represión catabólica por fuente de carbono se ha realizado principalmente en dos grandes grupos: bacterias entéricas Gram-negativas, como *Escherichia coli*; y bacterias Gram-positivas con bajo contenido de GC, como *Bacillus subtilis*. Poco se sabe acerca del proceso de regulación por carbono en los microorganismos Gram-positivos con alto contenido de GC, donde el mejor caracterizado con respecto a este fenómeno es el género *Streptomyces*, en particular *S. coelicolor*.

1.2.1 REPRESIÓN CATABÓLICA EN BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS.

El organismo mejor caracterizado hasta ahora es, por mucho, *Escherichia coli* y sobre él se han realizado más ampliamente los estudios sobre regulación del metabolismo de carbono. En este microorganismo el metabolismo de carbono está controlado por el sistema de transporte de fosfotransferasa dependiente de fosfoenol piruvato (PTS de sus siglas en inglés). El PTS es un sistema de transporte de carbohidratos que domina y regula la actividad de otros transportadores de azúcares presentes en la célula (Saier, 1989; Saier *et al.*, 1995).

Los niveles intracelulares de AMP cíclico (AMPC) tienen un efecto acelerador sobre la síntesis de muchas enzimas catabólicas sensibles a la represión. El AMPC se une a su proteína receptora (CRP) y actúa sobre los

promotores de cientos de genes estimulando su transcripción (Botsford *et al.*, 1992, Ishiuka *et al.* 1993).

Saier (1989) ha propuesto un mecanismo de regulación mediada por el PTS (fig. 1.3). Según este modelo, una pequeña enzima glucosa-específica IIA (IIA^{glc}) constituyente de este sistema de transporte es el efector alostérico que controla dicho mecanismo. Esta enzima se fosforila reversiblemente en un residuo de histidina por la enzima I y por la HPr del sistema de fosfotransferasa, a partir del fosfoenolpiruvato (PEP). La enzima IIA^{glc} puede donar su grupo fosfato a la glucosa en presencia de una enzima membranal específica para el carbohidrato (la enzima IIBC), dando glucosa-6-fosfato como producto que se incorpora a la célula. Una vez desfosforilada la enzima IIA^{glc}, su forma libre puede unirse a algunas permeasas de carbohidratos (permeasas simportadoras de lactosa-H⁺) o a la glicerol cinasa, enzimas que existen normalmente en su forma activa. Esta unión inhibe alostéricamente la actividad de estas proteínas y como consecuencia la incorporación y utilización de fuentes de carbono como lactosa y glicerol pueden verse afectadas.

La adenilato ciclasa, enzima que se encarga de sintetizar AMPc a partir de ATP y que se encuentra normalmente en una forma de baja actividad, al parecer se activa al unirse a la forma fosforilada de la IIA^{glc} y se desactiva cuando esta última enzima es desfosforilada. La disminución de la actividad de la adenilato ciclasa resulta en una baja en los niveles intracelulares de AMPc y en la prevención de la transcripción de genes que codifican para enzimas catabólicas.

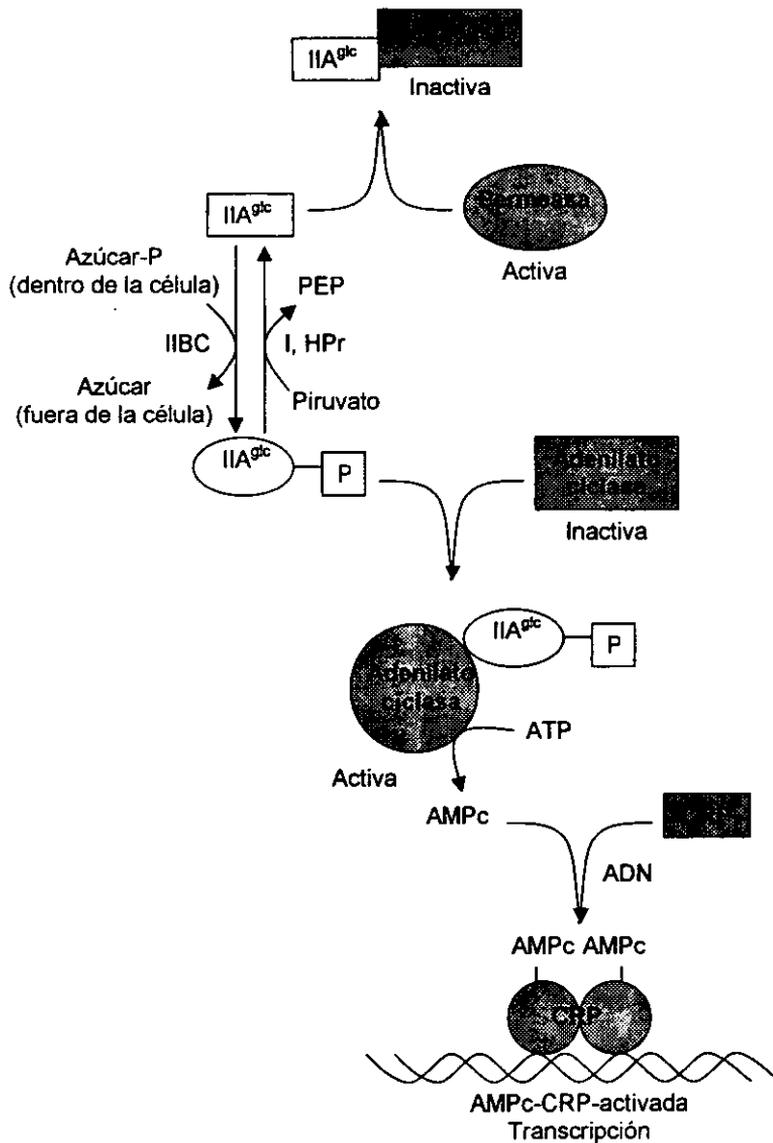


Fig. 1.3. Mecanismo propuesta para la regulación del metabolismo de carbono en *E. coli*. PEP: fosfoenol piruvato. I y HPr: enzimas constituyentes del sistema de transporte de azúcares dependiente de PEP. IIA^{glc}: enzima glucosa específica. IIBC: enzima membranal de transporte específica para el carbohidrato. P: grupo fosfato. CRP: proteína receptora de AMPc.

1.2.2 REGULACIÓN DEL METABOLISMO DE CARBONO EN BACTERIAS GRAM-POSITIVAS.

Dentro de las bacterias Gram-positivas se pueden considerar dos grandes grupos: las de bajo y las de alto contenido de GC. Dentro del primer grupo, *Bacillus subtilis* ha servido como organismo modelo en el estudio de la regulación del metabolismo de carbono, mecanismo en el cual se han identificado tres elementos importantes: 1) un factor de transcripción llamado proteína CcpA homólogo a varias proteínas represoras, 2) secuencias consenso presentes en el ADN, llamadas elementos de represión catabólica (CRE de sus siglas en inglés) y 3) la proteína HPr del sistema fosfoenolpiruvato fosfotransferasa para el transporte de azúcares (Hueck & Hillen, 1995; Saier *et al.*, 1995).

Para ilustrar el mecanismo de represión catabólica en *B. subtilis*, existe un modelo en el que se propone que la producción de intermediarios metabólicos como fructosa 1,6-bisfosfato (FBP) o 6-fosfogluconato, resultado del metabolismo de las fuentes de carbono represoras, inducen la activación de una proteína-cinasa que fosforila a la HPr en la serina 46. La HPr fosforilada se une y activa a la proteína CcpA produciendo un aumento en su afinidad por los CRE presentes en las regiones reguladoras de los operones sensibles a represión. Este complejo formado entre la CcpA activada y el ADN, en conjunto con otras moléculas efectoras podría retardar o bloquear la transcripción (fig. 1.4) (Hueck & Hillen, 1995; Saier *et al.*, 1995).

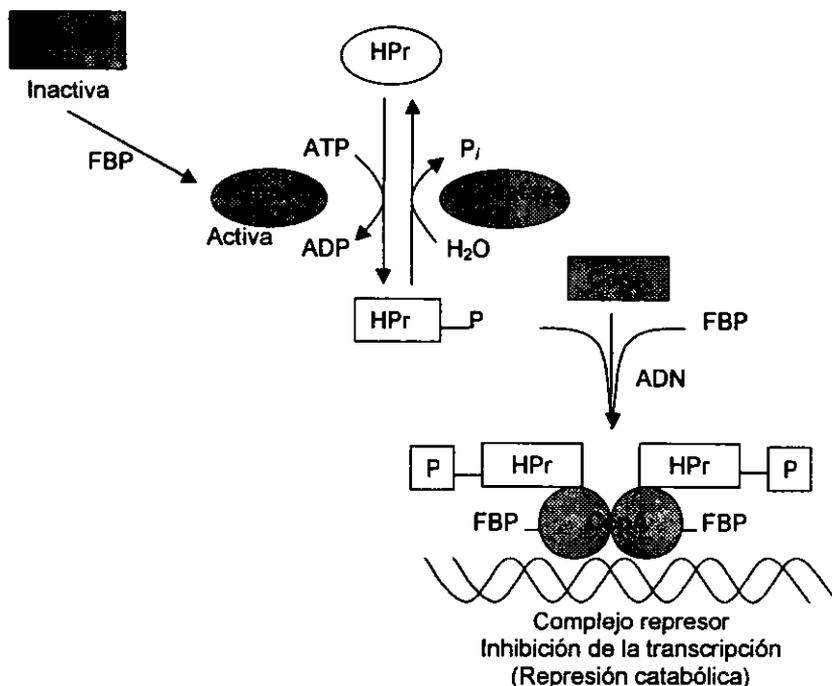


Fig. 1.4. Modelo del mecanismo de represión catabólica propuesto para *B. subtilis*. HPr: proteína constituyente del sistema de transporte de azúcares dependiente de fosfoenol piruvato (PTS). FBP: fructosa 1,6-bisfosfato. CcpA: factor de transcripción homólogo a proteínas represoras.

Los microorganismos del género *Streptomyces* son bacterias Gram-positivas que poseen un contenido alto de GC, entre 68 y 72%. *Streptomyces coelicolor* es el organismo mejor caracterizado de este género y se ha utilizado ampliamente en el estudio del fenómeno de represión catabólica por fuente de carbono. Sin embargo, poco es conocido acerca de este mecanismo regulatorio en los estreptomicetos. El fenómeno de represión catabólica presentado en *Streptomyces* es fundamentalmente diferente al que encontramos en *E. coli*, donde los niveles de AMPc juegan un papel

importante en la regulación de la expresión de enzimas inducibles. En el género *Streptomyces* los niveles de AMPc no se ven afectados en el proceso de represión catabólica (Gersh, 1980; Chaterjec & Vining, 1982; Hodgson, 1982). Mientras que en los organismos Gram-positivos de bajo contenido de GC la enzima HPr fosforilada en un residuo de serina parece jugar un importante papel en el fenómeno de represión catabólica, en *Streptomyces*, aunque se ha reportado la identificación de las enzimas I y HPr del sistema de fosfotransfera, así como del complejo enzimático específico para fructosa en tres especies de este género (Titgemeyer *et al.*, 1995), hasta ahora no se ha encontrado evidencia de que algún factor constituyente de este sistema de transporte intervenga en el mecanismo de represión catabólica. Además, estos organismos al parecer no poseen la serina-cinasa ni la serina-fosfatasa de la enzima HPr presentes en *B. subtilis* (Titgemeyer *et al.*, 1995).

En *Streptomyces* diversas fuentes de carbono afectan la expresión de genes involucrados en el transporte (Hodgson, 1982) y utilización de fuentes de carbono alternativas (Hodgson, 1982; Mattern *et al.*, 1993; Smith & Chater, 1988), así como en la síntesis de enzimas extracelulares y metabolitos secundarios (Delic *et al.*, 1992; Segura *et al.*, 1996; Servin-González *et al.*, 1994).

Diversos genes sensibles a represión catabólica por fuente de carbono han sido clonados con el objeto de estudiar el mecanismo que regula su expresión. De esta manera se han identificado secuencias reguladoras presentes en los operones de los genes *chi63* de *S. plicatus* (Delic *et al.* 1992), *aml* de *S. limosus* (Virolle & Gagnat, 1994) y *gal* de *S. coelicolor* (Mattern *et al.*, 1993), donde la presencia de deleciones o modificaciones afecta la regulación negativa por carbono. Probablemente se trate de secuencias reguladoras que actúan en *cis* uniéndose a proteínas o complejos

represores. Sin embargo, estas regiones no muestran estructuras similares o secuencias consenso, como sucede en las bacterias Gram-positivas con bajo contenido de GC.

A partir de *S. coelicolor* se obtuvieron mutantes resistentes a represión catabólica por fuente de carbono, capaces de crecer en lactosa y en presencia de un análogo de la glucosa, la 2-deoxiglucosa (2-DOG), y se aislaron para el estudio de este mecanismo de regulación (Hodgson, 1982). Estas mutantes, que mostraron pérdida de actividad de la enzima glucosa cinasa ATP-dependiente (Glc), fueron incapaces de utilizar glucosa sin que el transporte de este carbohidrato se encontrara afectado (Hodgson, 1982). Esto ha sugerido un importante papel de la enzima Glc en el mecanismo de represión catabólica en el género *Streptomyces*. Se ha clonado el gen que codifica para esta enzima, *glkA* (Ikeda *et al.* 1984), mostrando el restablecimiento de la sensibilidad a represión catabólica en las mutantes resistentes a 2-DOG.

La secuenciación del *glkA* ha mostrado que dicho gen es transcrito por dos promotores, uno de ellos se encuentra inmediatamente después del gen hacia el extremo 3' y el otro se encuentra más alejado hacia esta misma dirección (Angell *et al.* 1992). El fragmento secuenciado contiene un marco abierto de lectura parcial (*orf1*) y dos marcos abiertos de lectura completos que codifican para proteínas de aproximadamente 30 kDa (*orf2* y *orf3*). Se ha encontrado que el *glkA-orf3* por sí solo restablece la actividad de glucosa cinasa y la utilización de glucosa, así como la sensibilidad a 2-DOG y la represión catabólica de diversos genes como el *dagA*, en las mutantes de *Streptomyces coelicolor* resistentes a 2-DOG (Angell *et al.*, 1992). Sin embargo, para alcanzar los niveles de la actividad de glucosa cinasa

encontrados en la cepa silvestre, es necesaria la expresión tanto del *glkA-orf3* como del *glkA-orf2*.

No se ha encontrado ninguna función o similitud del producto del *glkA-orf2* con otras proteínas conocidas. Esta secuencia es transcrita junto con el resto del gen *glkA*, por lo que se ha pensado que posee un papel en el metabolismo de glucosa, o en el mecanismo de represión catabólica.

El producto del gen *glkA-orf3* muestra extensas secuencias de aminoácidos similares a las encontradas en una familia de proteínas que incluye diversas glucocinasas y proteínas represoras como la NagC de *E. coli* y la XylR de *B. subtilis* (Titgermeyer *et al.*, 1994). Sin embargo, esta proteína carece de una extensión N-terminal que posee dominios de unión a ADN y que está presente en dichas proteínas represoras.

Angell *et al.* (1994) reportaron el aislamiento de mutantes de *S. coelicolor* que tenían una delección en el gen *glkA*, capaces de utilizar glucosa y con niveles de Glk similares a los de la cepa original. Al parecer estas mutantes presentaron una segunda actividad de glucosa cinasa (Glk-II), que restablece la sensibilidad a 2-DOG y la utilización de glucosa, pero no así la sensibilidad del gen *dagA* a la represión catabólica (Angell *et al.*, 1994). Además, la expresión del gen análogo de Glk de *Zymomonas mobilis* en mutantes *glkA* de *S. coelicolor* restablece la actividad de esta enzima pero no la sensibilidad a represión por glucosa (Angell *et al.*, 1994).

Kwakman & Postma (1994) estudiaron el efecto represor de diversas fuentes de carbono como glucosa, arabinosa, galactosa, citrato y glutamato, sobre la expresión de la glicerol cinasa y la agarasa en mutantes de *S. coelicolor* con delecciones en el gen *glkA*. Encontraron que la sensibilidad a represión catabólica ejercida por dichas fuentes de carbono se pierde aun

cuando estas fuentes no sean metabolizadas vía glucosa cinasa. La presencia de deleciones en el gen *glkA* y la sobre-expresión de este gen en *S. coelicolor*, muestran un efecto derregulador en el mecanismo de represión catabólica ejercido por varias fuentes de carbono (Angell *et al.*, 1994; Kwakman & Postma, 1994). Aunque el papel de la Glk en el fenómeno de represión por fuente de carbono aun no es claro, existen evidencias que indican que este posible papel es independiente de su actividad catalítica y que la fosforilación de la glucosa no es suficiente para llevar a cabo la represión catabólica.

En contraste con las evidencias encontradas que sugieren un papel determinante de la Glk en el mecanismo de represión catabólica, se han obtenido resultados que involucran otros factores diferentes a esta enzima y que pudieran estar participando de manera importante en el fenómeno de represión por carbono. De acuerdo a estos antecedentes se ha propuesto que el mecanismo de represión catabólica pudiera llevarse a cabo por la unión directa de la Glk a las regiones promotoras de los operones sensibles a regulación por carbono, impidiendo su transcripción. O bien, que la Glk se una a algún otro factor proteico de unión a ADN para formar un complejo represor que actúe al nivel de transcripción de los genes sensibles a la represión catabólica (Kwakman & Postma, 1994). La presencia de la fuente de carbono represora en el medio podría generar una señal que resulte en un cambio conformacional de la Glk favoreciendo su actividad represora debido a la unión o interacción de esta enzima con alguna molécula cuya concentración intracelular varíe considerablemente dependiendo de la fuente de carbono. Estas moléculas podrían ser intermediarios del metabolismo de la fuente de carbono, como por ejemplo, los intermediarios de la glucólisis como la glucosa, la glucosa-6-fosfato, la fructosa-1,6-difosfato, o bien, nucleótidos de importancia en el mantenimiento y balance de los niveles de

energía celular, como ATP, ADP, etc. Esto se apoya en el hecho de que uno de los papeles de la represión por glucosa es mantener los niveles de energía en la célula.

Ingram y colaboradores (1995) reportaron la identificación y caracterización de una mutación en *S. coelicolor*, *ccrA1*, que afecta la expresión de diversos promotores regulados catabólicamente. Estas mutantes muestran una transcripción alterada de los promotores *galP1*, *gyl* y *chi63* sensibles a glucosa. Sin embargo, esta mutación no tiene efecto sobre la expresión de promotores *galP2* que dirige la transcripción constitutiva de los genes *galE* y *galK*. La mutación *ccrA1* parece tener un efecto específico sobre la transcripción de promotores sensibles a represión catabólica, sin embargo, estos promotores permanecen sensibles a dicha regulación. El mapeo de esta mutación indicó que se encuentra localizada cercana al locus *argA* y es distinta de otras mutaciones que se sabe que están involucradas en el control catabólico, como la *glkA*. Las mutantes *ccrA1*, a diferencia de las *glkA*, pueden utilizar glucosa como única fuente de carbono y no son resistentes a 2-DOG (Ingram *et al.*, 1995). De acuerdo a estos resultados, Ingram y colaboradores sugieren que la mutación *ccrA1* afecta un gen cuyo producto puede estar involucrado en el mecanismo general de regulación por represión catabólica en *Streptomyces*.

El mecanismo de regulación del metabolismo de carbono en el género *Streptomyces* aún se encuentra poco entendido. Existen diversas preguntas por contestar para determinar el papel de los factores hasta ahora relacionados con este fenómeno, así como para encontrar nuevos elementos que participen en esta regulación aún no conocidos.

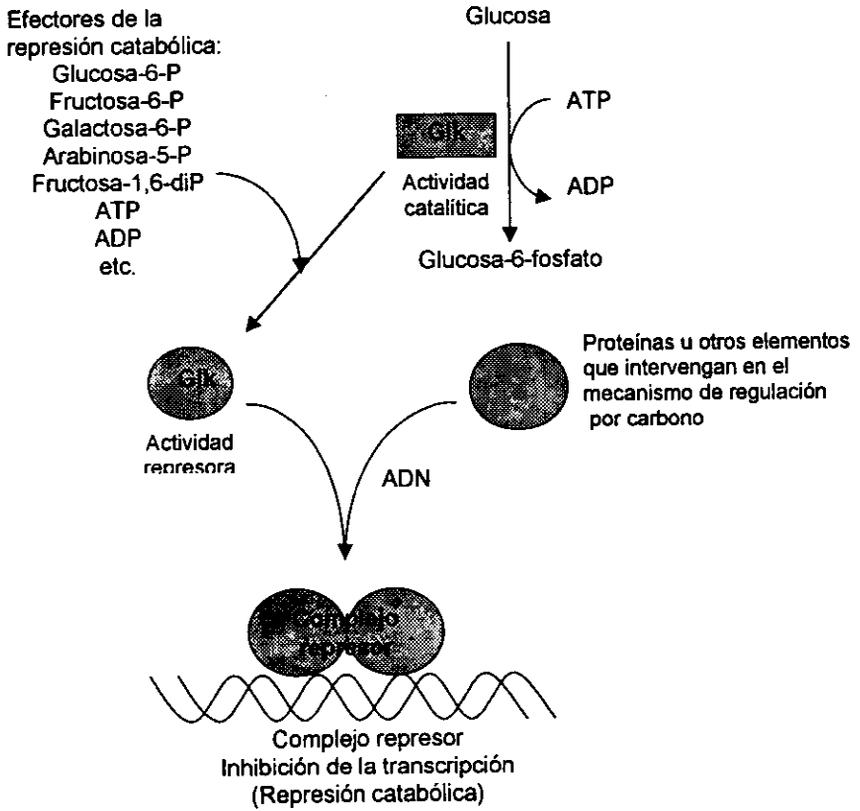


Fig. 1.5 Posible mecanismo de represión catabólica en *Streptomyces*.

1.2.3 ANTECEDENTES

Streptomyces peucetius var. *caesius* es un microorganismo de gran importancia industrial y médica ya que es el productor de doxorubicina, el agente antineoplásico de origen microbiano más utilizado actualmente en el tratamiento de tumores cancerosos. Sin embargo, al igual que en otros microorganismos, en el género *Streptomyces* el metabolismo de carbono y la síntesis de metabolitos secundarios, se encuentran sujetos a represión catabólica (Hodgson, 1982; Demain, 1989). Este mecanismo regulador asegura la utilización organizada y secuencial de las fuentes de carbono cuando más de un tipo se encuentra presente en el medio. Los mecanismos responsables de la represión catabólica en los sistemas microbianos son diversos y complejos y posiblemente existan diferentes sistemas en un solo microorganismo (Saier, 1995). Poco se sabe acerca del proceso que regula el metabolismo de carbono en este género y aún existen una serie de incógnitas por resolver. En *Streptomyces peucetius* var. *caesius* la utilización de diversas fuentes de carbono así como la síntesis de metabolitos secundarios se ve reprimida por glucosa (Segura *et al.*, 1996). Mutantes de este microorganismo, aisladas por su habilidad para crecer en lactosa en presencia de un análogo de glucosa, la 2-desoxiglucosa (2-DOG), resultaron insensibles a represión por carbono y presentaron bajos niveles de la enzima glucosa cinasa (Glc); entre el 19 y 30% de la actividad encontrada en la cepa original (Segura *et al.*, 1996). En dichas mutantes la síntesis de β -galactosidasa, D-xilosa isomerasa y la producción de antraciclinas totales resultaron ser insensibles al efecto negativo de la glucosa.

Las mutantes 2-Dog^R perdieron también su sensibilidad al efecto negativo ejercido por fuentes de carbono diferentes a la glucosa, tales como galactosa, arabinosa y glutamato, que no son metabolizadas vía Glc. Esto

sugiere algún tipo de relación entre la actividad de Gik y la sensibilidad a la represión por carbono (Segura *et al.*, 1996).

Para explicar la pérdida de la sensibilidad a la represión catabólica por fuente de carbono en estas mutantes 2-DOG^R y determinar el papel de la Gik en este mecanismo, hemos tomado en cuenta las siguientes posibilidades:

- Que la enzima Gik esté involucrada en la incorporación de las fuentes de carbono represoras, de manera que al disminuir su actividad el transporte se vea afectado.
- Que la Gik intervenga directamente en el metabolismo de las diferentes fuentes de carbono represoras y no sólo de glucosa, lo que se podría determinar de manera indirecta midiendo la capacidad de esta enzima para fosforilar otros carbohidratos diferentes a su substrato natural.
- Que el papel regulador de la Gik en la represión catabólica, no dependa de su actividad catalítica, sino de una actividad represora de la misma que le permita actuar directamente sobre los genes regulados catabólicamente impidiendo su transcripción.
- Que la Gik no participe en el fenómeno de represión catabólica y que éste se lleve a cabo por un mecanismo diferente.

El determinar la incorporación en las diferentes cepas de *S. peucetius* var. *caesius*, así como la medición de la capacidad de la Gik para fosforilar las diferentes fuentes de carbono represoras, podría ayudar a establecer el papel de esta enzima en el mecanismo de regulación catabólica.

2. OBJETIVOS

- Medir el transporte de las fuentes de carbono represoras: glucosa, galactosa, arabinosa y glutamato en la cepa original de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* y en una mutante 2-Dog^R (2-Dog^R-21).
- Medir la capacidad de la enzima Glk de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* para fosforilar carbohidratos diferentes a glucosa, como arabinosa y galactosa.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MICROORGANISMOS.

La cepa original utilizada en este trabajo fue *Streptomyces peucetius* variedad *caesius* ATCC 27952 perteneciente a la colección de cultivos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Se utilizó una cepa insensible al efecto negativo de glucosa, llamada 2-Dog^R-21, aislada anteriormente en el laboratorio por Daniel Segura de acuerdo con lo reportado para *Streptomyces coelicolor* (Hodgson, 1982) por su capacidad para crecer en lactosa en presencia de un análogo no metabolizable de glucosa, la 2-desoxiglucosa (2-DOG). Se emplearon tres cepas aisladas en el laboratorio por Rosalba González a partir de la mutante 2-Dog^R-21, por la pérdida de su capacidad para crecer en lactosa en presencia de 2-DOG, a las que se llamaron 2-Dog^S-2, 2-Dog^S-11 y 2-Dog^S-53. Las cepas 2-Dog^S-2 y 2-Dog^S-11 conservaron su resistencia al efecto negativo de glucosa sobre la producción de antraciclinas, mientras que la cepa 2-Dog^S-53 perdió esta característica.

3.2 MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.

3.2.1 PREPARACIÓN DE INÓCULOS. Los cultivos de las cepas se realizaron a partir de inóculos obtenidos en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 5 perlas de vidrio de 5 mm para dispersar el micelio y 25 ml de medio YMG, que contenía extracto de levadura 0.4%, extracto de malta 1.0%, glucosa 0.4% y agua destilada, pH ajustado a 7.2 (Dekleva *et al.*, 1985). Los matraces se inocularon con una asada del micelio crecido en cajas Petri con medio YMG sólido y se incubaron durante 72 h a 29°C con agitación de 180 rpm. El micelio obtenido se lavó tres veces con solución salina isotónica estéril (NaCl

0.85%) y se resuspendió en 5 ml de la misma solución, volumen con el que se inoculó cada matraz de cultivo.

3.2.2 CULTIVOS. Los cultivos para la determinación del transporte de las fuentes de carbono, se obtuvieron en matraces Fernbach con 10 perlas de vidrio de 5 mm y 500 ml de medio mínimo suplementado con extracto de levadura (0.3%) y la fuente de carbono correspondiente: glucosa 100 mM, galactosa 100 mM, arabinosa 100 mM o glutamato de sodio 30 mM. La composición del medio mínimo (MM) fue la siguiente: NaCl 0.5%, K_2HPO_4 0.03 %, $(NH_4)_2SO_4$ 0.133%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.002%, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005%, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.0001%, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.0001%, MOPS 100 mM, agua destilada, pH ajustado a 7.2. Los cultivos se incubaron durante 36 h a 29°C, con agitación de 180 rpm.

3.2.3 OBTENCIÓN DE EXTRACTO ENZIMÁTICO LIBRE DE CÉLULAS. Para la obtención del extracto enzimático, tanto de la cepa original como de la mutante 2-Dog^R-21, se prepararon inóculos en matraces Erlenmeyer de 125 ml como se indica en la preparación de inóculos. Cada matraz Fernbach con 10 perlas de vidrio de 5 mm y 500 ml de medio YM, que contenía extracto de levadura 0.3% y extracto de malta 0.3%, adicionado con la fuente de carbono (glucosa, galactosa o arabinosa) al 6%, se inoculó con el micelio obtenido por cada dos matraces Erlenmeyer de 125 ml. Se incubaron durante 48 h a 29°C y 180 rpm. El micelio contenido en 25 ml de los 500 ml totales, se lavó dos veces con solución salina isotónica (NaCl 0.85%), el botón resultante se transfirió a tubos de ultracentrífuga y se resuspendió en 3 ml de amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7, frío. A partir de este paso todo se realizó en frío. Las células se rompieron con sonicador de punta chica aplicando 6 ciclos de 10 segundos continuos, con intervalos de enfriamiento de 1 a 1.5

minutos. Una vez roto el micelio, los tubos se llevaron hasta el borde con amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7 para evitar que se colapsaran. Se centrifugaron a 45,000 rpm y 5 °C durante 1 h. El sobrenadante (extracto enzimático) se separó con pipeta Pasteur y se guardó a -20°C.

3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS.

3.3.1 TRANSPORTE DE LAS FUENTES DE CARBONO REPRESORAS. El transporte de glucosa, galactosa, arabinosa y glutamato, se determinó tanto en la cepa original de *S. peucetius* var. *caesius* ATCC 27952 como en la mutante 2-Dog^R-21 resistente a 2-DOG. La determinación de la incorporación de las fuentes de carbono se realizó bajo dos condiciones. En la primera condición (A) se creció al microorganismo en medio mínimo adicionado de extracto de levadura 0.3% y en presencia de la fuente de carbono a probar (glucosa 100 mM, galactosa 100 mM, arabinosa 100 mM o glutamato de sodio 30 mM según fuera el caso). Para la segunda condición (B) se creció el microorganismo en presencia de una fuente de carbono diferente a la que se le determinaría el transporte: glucosa 100 mM para la determinación del transporte de galactosa, arabinosa y glutamato, y en presencia de galactosa 100 mM para la determinación del transporte de glucosa.

	Fuente de carbono incorporada			
	Glucosa	Galactosa	Arabinosa	Glutamato
Sistema A	crecimiento en glucosa 100 mM	crecimiento en galactosa 100 mM	crecimiento en arabinosa 100 mM	crecimiento en glutamato 30 mM
Sistema B	crecimiento en galactosa 100 mM	crecimiento en glucosa 100 mM	crecimiento en glucosa 100 mM	crecimiento en glucosa 100 mM

Tabla 3.1 Condiciones de cultivo para la determinación del transporte de las fuentes de carbono represoras en la cepa original y en la mutante 2-Dog^R-21 de *S. peucetius* var. *caesius*.

De cada cepa se colectó por filtración el micelio obtenido después de incubar a 29°C con agitación de 180 rpm, durante 36 h y se lavó dos veces con solución salina isotónica (NaCl 0.85 %). Posteriormente se secó sobre un papel filtro quitando el exceso de líquido. Se pesaron y resuspendieron 250 mg de micelio de cada cepa (peso húmedo) en 4.5 ml de medio Y (extracto de levadura 0.075%, agua destilada, pH ajustado a 7.2). Después de incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente y con agitación constante, se añadieron 0.5 ml de una solución de la fuente de carbono correspondiente que contenía 25 µl de la misma marcada radioactivamente con ¹⁴C y 475 µl de la fuente de carbono fría 10mM como acarreador. Las actividades específicas de las fuentes de carbono marcadas se muestran en la Tabla 3.2. Después de agregar la marca se tomaron muestras de 1 ml a los 10, 30 y 60 segundos sin dejar de agitar. Cada muestra se filtró inmediatamente en membranas de 0.45 mm en un aparato multifiltrador conectado a una bomba de vacío y después de lavar dos veces con agua destilada se dejaron secar las membranas. La marca incorporada se determinó introduciendo las membranas en viales con 4 ml de solución de PPO 0.4 %, POPOP 0.04 % en tolueno, para medir las cuentas por minuto en un contador de centelleo Beckman modelo LS 1500.

Fuente de carbono	Actividad específica (mCi/mmol)	Actividad ajustada (µCi/mol)
D-[U- ¹⁴ C]glucosa	297	1.049
D-[1- ¹⁴ C]galactosa	56.50	521.458
D-[1- ¹⁴ C]arabinosa	4	465.116
ácido L-[1- ¹⁴ C] glutámico	262	525.260

Tabla 3.2 Actividad específica y actividad ajustada de las fuentes de carbono marcadas radioactivamente, empleadas en la determinación del transporte.

3.3.2 DETERMINACIÓN DE PESO SECO. Del micelio obtenido para la determinación del transporte de las fuentes de carbono, se pesaron adicionalmente 250 mg de cada cepa (peso húmedo) y se colocaron en charolas de aluminio secas y previamente pesadas. El micelio se secó en la estufa a una temperatura de 50 a 60°C, durante 14 h hasta obtener peso constante.

3.3.3 FOSFORILACIÓN *IN VITRO* DE CARBOHIDRATOS. Se determinó la capacidad para fosforilar glucosa, galactosa y arabinosa por parte de los extractos enzimáticos libres de células obtenidos del micelio crecido en glucosa, de la cepa original de *S. peuceetius* var. *caesius* y de la mutante 2-Dog^R-21. Además, se midió la fosforilación *in vitro* de galactosa y arabinosa, empleando para cada uno de estos carbohidratos el extracto enzimático libre de células obtenido de cada cepa, al crecer en la fuente de carbono a probar. La fosforilación se llevó a cabo en tubos de 20 ml que contenía 1.746 ml del sistema de reacción (7.0 ml de amortiguador Tris-HCl 100 mM pH 7, 1.4 ml MgCl₂ 250 mM, 1.4 ml ATP 10 mM y 2.422 ml de agua destilada para preparar 12.222 ml del sistema de reacción), 50 µl del extracto enzimático, 200 µl de una solución de la fuente de carbono (150 µl de la fuente de carbono fría 50 mM y 50 µl de la fuente de carbono marcada radioactivamente) y 4 µl de agua destilada. La reacción se detuvo a los 120 segundos añadiendo a cada tubo 6 ml de una mezcla de acetona/agua destilada 3:1. Posteriormente se centrifugó cada muestra durante 15 minutos a 8000 rpm para separar las proteínas precipitadas. Se evaporó la acetona del sobrenadante burbujeando nitrógeno y se liofilizaron las muestras hasta quedar completamente deshidratadas. El liofilizado se resuspendió en 200 µl de agua destilada y se guardó en congelación. Simultáneamente, se llevó a

cabo para ambas cepas otra reacción bajo las mismas condiciones pero en un sistema de reacción sin ATP, considerando esta determinación como control negativo de la fosforilación. Para descartar la interferencia de diversos metabolitos o proteínas presentes en los extractos enzimáticos, se realizó un blanco para cada cepa tratándolo de la misma forma que las muestras pero sin añadir la solución de la fuente de carbono, cuyo liofilizado resuspendido se aplicó junto con los estándares del carbohidrato y del carbohidrato fosforilado (tabla 3.3).

Tubo	Sistema de Reacción (ml)	Extracto enzimático libre de células (μl)	Solución de la fuente de carbono (μl)	Agua destilada (μl)
1. Blanco (original)	1.746	50 ¹	-	204
2. Blanco (2-Dog ^R -21)	1.746	50 ²	-	204
3. Original	1.746	50 ¹	200	4
4. Mutante 2-Dog ^R -21	1.746	50 ²	200	4
5. Original sin ATP	1.746*	50 ¹	200	4
6. Mutante 2-Dog ^R -21 sin ATP	1.746*	50 ²	200	4

Tabla 3.3 Condiciones para la determinación de la fosforilación *in vitro* de carbohidratos. *Sistema de reacción sin ATP. ¹Extracto enzimático libre de células obtenido del micelio de la cepa original. ²Extracto enzimático libre de células obtenido del micelio de la mutante 2-Dog^R-21.

Los productos de la reacción de fosforilación, para todos los casos, se detectaron por cromatografía en capa fina. La cromatografía se realizó en placas de aluminio Kieselgel 60 de 0.2 mm de espesor. Se eluyó en cámaras cromatográficas con doble pozo utilizando una mezcla de n-butanol/piridina/agua destilada (1:1:1), durante 2 h. Las placas se revelaron rociando con una solución de metanol absoluto/ácido sulfúrico (1:4) y calentando posteriormente sobre una parrilla eléctrica de 100 a 150°C durante 5 a 10 minutos hasta la aparición de las manchas. Las muestras se corrieron junto con un estándar del carbohidrato (glucosa, galactosa o arabinosa) y un estándar del carbohidrato fosforilado (glucosa-6-fosfato,

galactosa-6-fosfato o arabinosa-5-fosfato) ambos con una concentración de 0.5 mg/100 μ l. Se aplicaron 5 μ l de la muestra por carril, o bien 5 μ l del estándar más 5 μ l del blanco de extracto enzimático tratado de la misma manera que las muestras pero sin añadir la solución del carbohidrato frío y marcado radioactivamente.

Una vez revelada la cromatografía, se localizó el corrimiento de los estándares y las muestras. Se recortó cuidadosamente sobre el carril de cada muestra, un cuadro a la altura de lo que correspondía al corrimiento del carbohidrato no fosforilado y un cuadro a la altura de lo que correspondía al carbohidrato fosforilado. Cada recorte se colocó dentro de un vial con 4 ml de solución de centelleo (PPO 0.4%, POPOP 0.04% en tolueno) y se determinó la marca contenida en cada vial, en un contador de centelleo Beckman modelo LS 1500 contra un blanco de 4 ml de solución de centelleo y un cuadro de Aluminio Kieselgel 60 sin muestra y del mismo tamaño que el de las muestras.

3.3.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE GLUCOSA CINASA. La actividad se determinó por la formación de glucosa-6-fosfato (G6P), la cual se detectó en una reacción acoplada con glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) midiendo espectrofotométricamente la reducción de NADP a 340 nm (Angell *et al.*, 1992). Los extractos enzimáticos se obtuvieron a partir del micelio crecido en medio YM (extracto de levadura 0.3%, extracto de malta 0.3%, pH 7.2) adicionado con glucosa al 6% e incubado a 29°C y 180 rpm, durante 48 h. El micelio contenido en 25 ml de cultivo se centrifugó a 8000 rpm y se lavó dos veces con SSI. Las células se resuspendieron en 3 ml de Tris-HCl 50 mM pH 7.2 y se rompieron con sonicador de punta chica aplicando 6 ciclos de 10 segundos continuos, con intervalos de enfriamiento de 1 a 1.5 minutos. Una

vez roto el micelio, el volumen se llevó hasta el borde de los tubos con amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7. Se centrifugaron a 45,000 rpm y 5 °C durante 1 h. El extracto enzimático se guardó a -20 °C.

La reacción para la determinación de la actividad de glucosa cinasa se realizó a temperatura ambiente en tubos de 5 ml que contenían los reactivos en las cantidades que se muestra en la tabla 3.4. La reacción se inició con el extracto enzimático y se leyó la absorbancia a 340 nm a los 20, 40, 60, 80, 100 y 120 segundos.

Tubo	Sistema de reacción (ml)	Agua Destilada (μl)	Glucosa 200 mM (μl)	G6PDH (μl)	Extracto enzimático (μl)
1. Blanco *	-	1950	-	-	50 ¹
2. Blanco de reactivo*	1.746	200	-	4	50 ¹
3. Cepa original	1.746	-	200	4	50 ¹
4. Mutante 2-Dog ^R -21	1.746	-	200	4	50 ¹
5. Mutante 2-Dog ^S -2	1.746	-	200	4	50 ¹
6. Mutante 2-Dog ^S -11	1.746	-	200	4	50 ¹
7. Mutante 2-Dog ^S -53	1.746	-	200	4	50 ¹

Tabla 3.4 Determinación de la actividad de glucosa cinasa en extractos enzimáticos libres de células. *Se hizo un blanco para cada cepa, empleando el extracto enzimático respectivo. ¹Extracto enzimático de la cepa correspondiente.

2.3.5 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DE LOWRY. La cantidad de proteína contenida en los extractos libres de células se cuantificó por el método desarrollado por Oliver H. Lowry (Lowry, 1951), para lo cual se tomaron 100 μl del extracto enzimático, se colocaron en un tubo Eppendorf y se añadieron 100 μl de ácido tricloroacético al 10 %. Se agitó vigorosamente y se congeló a -20 °C durante por lo menos 24 h. Después de descongelar, la muestra se centrifugó durante 10 minutos a 5000 rpm. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 100 μl de NaOH 0.4 N. Se

incubó durante 2 h a 37°C para acelerar la hidrólisis de la proteína y se realizó la cuantificación de la misma. Todas las determinaciones se hicieron por duplicado como se indica a continuación.

Los 100 μ l de cada muestra se llevaron a 1 ml con agua destilada y se añadieron 5 ml del reactivo de Lowry, mezclando perfectamente y dejando reposar durante 10 minutos. Posteriormente se añadieron 0.5 ml del reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu diluido 1:2, se agitó perfectamente y se dejó reaccionar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de que la muestra reactiva desarrolló una coloración azul, su absorbancia fue leída a 595 nm contra un blanco de 1 ml de agua tratado de la misma manera que las muestras. Para calcular la concentración de proteína contenida en las muestras, se interpoló la lectura obtenida para cada una de ellas en una curva estándar de albúmina sérica bovina (ASB), de concentraciones de 50, 100, 150, 200 y 250 μ g/ml.

Reactivo de Lowry:

- 1) Carbonato de sodio al 2% en NaOH 0.1 N (98% v/v)
- 2) Tartrato de sodio y potasio al 2% (1% v/v)
- 3) Sulfato de cobre pentahidratado al 1% (1% v/v)

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 TRANSPORTE DE FUENTES DE CARBONO REPRESORAS EN LA CEPA ORIGINAL DE *STREPTOMYCES PEUCETIUS* VAR. *CAESIUS* Y EN UNA MUTANTE 2-DOG^R.

La glucosa, la galactosa, la arabinosa y el glutamato son algunas fuentes de carbono capaces de ejercer un efecto negativo sobre la producción de metabolitos secundarios y sobre la síntesis de diversas enzimas necesarias en el metabolismo de otras fuentes de carbono, en el género *Streptomyces* (Kwakman & Postma, 1994; Segura *et al.*, 1996). Las mutantes de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* resistentes a 2-desoxiglucosa (2-DOG), cuya actividad de glucosa cinasa se encuentra disminuida, carecen de sensibilidad al efecto negativo de estas fuentes de carbono (Segura *et al.*, 1996).

Según estudios realizados en *Streptomyces coelicolor*, las mutantes de este microorganismo resistentes a 2-DOG e insensibles a la represión por carbono, no presentan cambios en el transporte de glucosa con respecto a la cepa silvestre (Hodgson, 1982). Sin embargo, en *S. peucetius* var. *caesius* se ha reportado que la incorporación de 2-DOG se encuentra disminuida en este tipo de mutantes (Segura, 1996).

Con el fin de determinar si el transporte de diferentes fuentes de carbono represoras se encontraba afectado en estas mutantes resistentes a 2-DOG, se cuantificó la incorporación de glucosa, galactosa, arabinosa y glutamato marcados con C¹⁴, tanto en la mutante 2-Dog^R-21 como en la cepa original de *S. peucetius* var. *caesius*. Esta determinación se realizó en dos condiciones: a) en un sistema al que llamamos inducido y b) en un sistema no inducido. En el sistema inducido, los microorganismos fueron crecidos en

presencia de la fuente de carbono de la que se determinaría el transporte, mientras que para el sistema no inducido las cepas se crecieron en una fuente de carbono diferente. En la figura 4.1 se muestran los resultados de esta determinación.

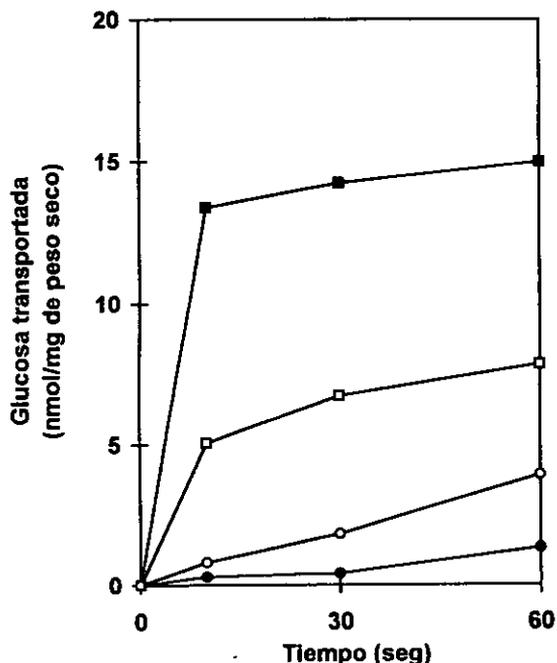


Fig. 4.1 Transporte de glucosa en la cepa original en un sistema inducido (■) y no inducido (●), y en la mutante 2-Dog^R-21 en un sistema inducido (□) y no inducido (○).

La mutante 2-Dog^R-21 transportó sólo un 52% de la glucosa incorporada por la cepa original en el sistema inducido. Como podemos observar en las figuras 4.2 y 4.3, sucede algo similar en el caso del transporte de galactosa y arabinosa, donde la incorporación de estos carbohidratos se vió afectada considerablemente en la mutante 2-Dog^R-21.

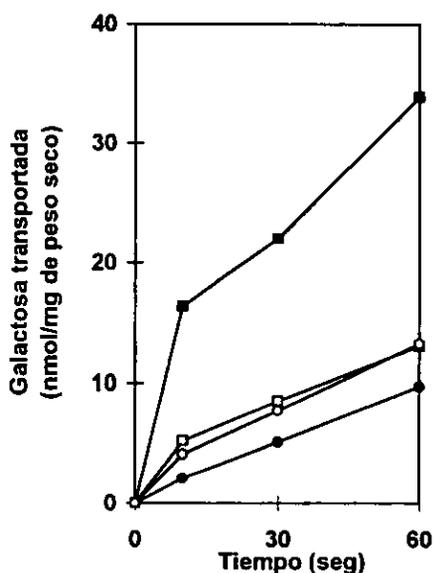


Fig. 4.2 Transporte de galactosa en la cepa original en un sistema inducido (■) y no inducido (●), y en la mutante 2-Dog^R-21 en un sistema inducido (□) y no inducido (○).

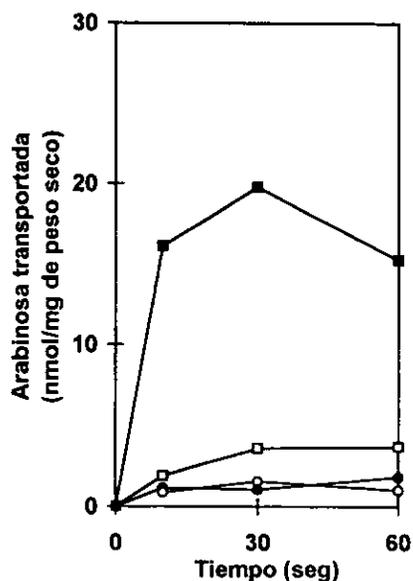


Fig. 4.3 Transporte de arabinosa en la cepa original en un sistema inducido (■) y no inducido (●), y en la mutante 2-Dog^R-21 en un sistema inducido (□) y no inducido (○).

En los sistemas inducidos, la incorporación de galactosa y de arabinosa por la mutante 2-Dog^R-21 fue del 38% y 18.6% respectivamente, comparada con el transporte de dichos carbohidratos en la cepa original.

A diferencia de lo obtenido para los carbohidratos, el transporte de glutamato (figura 4.4) no se vio afectado con la disminución de la actividad de glucosa cinasa en la mutante 2-Dog^R-21.

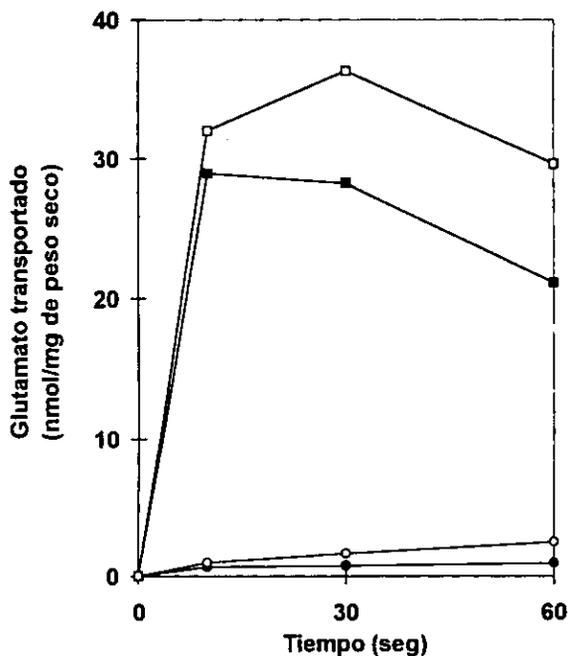


Fig. 4.4 Transporte de glutamato en la cepa original en sistema inducido (■) y no inducido (●), y en la mutante 2-Dog^R-21 en sistema inducido (□) y no inducido (○).

Al crecer las cepas en ausencia de la fuente de carbono inductora, es decir, en una fuente de carbono diferente a la que se le determinaría el transporte (sistema no inducido), la incorporación de las fuentes de carbono se vio abatida lo cual, a diferencia de lo reportado por Hodgson para *S. coelicolor*, nos indica que los sistemas de transporte de glucosa, galactosa, arabinosa y glutamato en *S. peucetius* var. *caesius* fueron estimulados específicamente por la fuente de carbono. Esta estimulación podría deberse

ya sea a una inducción de la síntesis de proteínas constituyentes de los sistemas de transporte, o bien, a la activación de las enzimas ya existentes en la célula. Los estudios hasta ahora realizados no nos permiten definir el mecanismo por el cual es estimulado el sistema de transporte, sin embargo, es importante destacar que la incorporación de las diferentes fuentes de carbono responde a una estimulación ejercida específicamente por su substrato.

La baja incorporación de los carbohidratos por parte de la mutante 2-Dog^R-21 con respecto a la cepa original podría llevarnos a pensar en la existencia de una relación entre la actividad de la glucosa cinasa (Gik) y el transporte de glucosa, galactosa y arabinosa en este microorganismo, de manera que al disminuir dicha actividad, la incorporación de los carbohidratos se viera afectada. Esto explicaría la escasa incorporación de glucosa en el sistema no inducido, ya que además, como puede ser observado en la figura 4.5, la actividad de la glucosa cinasa fue estimulada al crecer en presencia de glucosa y en ausencia de este carbohidrato dicha actividad resultó menor. Sin embargo, el escaso transporte de galactosa y arabinosa en los sistemas no inducidos, donde el microorganismo se creció en presencia de glucosa, nos sugiere que la Gik no es la responsable de la incorporación de dichos carbohidratos a la célula, aunque cabe la posibilidad de que de alguna forma regule su entrada a la misma de manera independiente a su actividad de cinasa. La Gik podría así interactuar con las proteínas que forman parte del sistema de transporte general o específico de cada carbohidrato, regulando su actividad.

En diversas bacterias se tiene caracterizado un sistema de transporte de carbohidratos, dependiente de fosfoenolpiruvato, llamado sistema de fosfotransferasa (PTS de sus siglas en inglés). Las proteínas de este sistema se han visto involucradas en el control del metabolismo de carbono en

bacterias entéricas Gram-negativas, como *Escherichia coli*, y en bacterias Gram-positivas con bajo contenido de GC, como es el caso de *Bacillus subtilis* (Saier, et al. 1995; Saier,1989). En el género *Streptomyces* no se han identificado, hasta ahora, todas las proteínas que constituyen el sistema de transporte de fosfotransferasa, sin embargo, Titgemeyer y colaboradores (1995) reportaron la presencia de las enzimas I y Hpr, así como del complejo enzimático específico para el transporte de fructosa en tres especies de *Streptomyces*. La posible existencia de un sistema de transporte de carbohidratos similar al PTS de otras bacterias, puede llevarnos a pensar en un mecanismo de regulación del metabolismo de carbono en *Streptomyces*, que involucre diversas enzimas además de la Glk.

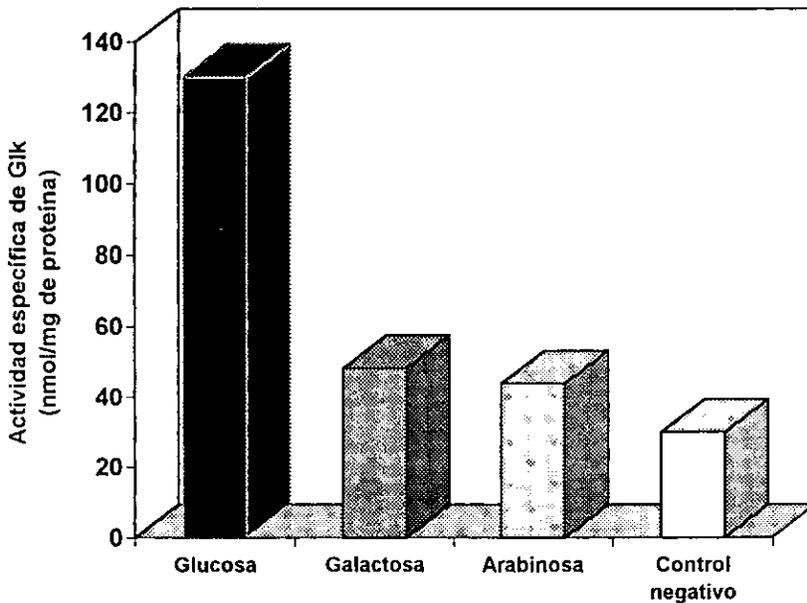


Fig. 4.5 Actividad específica de Glk en extractos enzimáticos de la cepa original de *S. peucetius* var. *caesius* crecida en glucosa (■), galactosa (▨) y arabinosa (▩). Control negativo: actividad específica de Glk en la mutante 2-Dog^R-21 crecida en glucosa (□).

Otra posibilidad, que explica los resultados obtenidos, es que la 2-Dog^R-21 tenga una mutación que afecte directamente el transporte de glucosa y que la baja actividad de Glk detectada, sea debida no a una mutación en el gen que codifica para esta enzima, sino a una menor concentración intracelular de glucosa incapaz de activarla. Sin embargo, la actividad detectada en esta mutante es demasiado baja como para justificar esta hipótesis, ya que la incorporación de glucosa en la cepa 2-Dog^R-21 fue un poco más de la mitad del transporte de dicho carbohidrato detectado en la cepa original crecidas ambas en presencia de glucosa.

Por último, otra posible explicación a los resultados obtenidos es que al producirse la mutación que afectó la actividad de la Glk, se hubiera afectado también algún gen o genes involucrados en el transporte de los carbohidratos. En este caso, la insensibilidad al efecto negativo de estas fuentes de carbono presentada por la mutante 2-Dog^R-21, no estaría directamente relacionada con la actividad de la glucosa cinasa, sino con la escasa incorporación de los carbohidratos represores. Una baja concentración intracelular de las fuentes de carbono represoras, resultaría probablemente en una concentración insuficiente de los efectores responsables de la represión catabólica provenientes del metabolismo de las fuentes de carbono represoras, como podría ser la glucosa-6-fosfato, fructosa-6-fosfato, galactosa-6-fosfato, arabinosa-5-fosfato y otros metabolitos. De esta manera, las fuentes de carbono no podrían ejercer su efecto represor sobre la utilización de otras fuentes, la producción de enzimas y la síntesis de metabolitos secundarios.

4.2 FOSFORILACIÓN *IN VITRO* DE CARBOHIDRATOS

La glucosa cinasa podría estar involucrada en el metabolismo no sólo de glucosa, sino también de otras fuentes de carbono represoras y de esta manera regular su efecto represor sobre el metabolismo primario y secundario. La participación de la Glk en el metabolismo de galactosa y arabinosa, tanto en la cepa original como en la mutante 2-Dog^R-21 de *S. peucetius* var. *caesius*, se determinó de manera indirecta. Esta determinación se llevó a cabo midiendo la capacidad de extractos enzimáticos libres de células obtenidos del micelio de la cepa original y de la mutante 2-Dog^R-21, para fosforilar galactosa y arabinosa. Las cepas fueron crecidas previamente en glucosa. Como control positivo se realizó la fosforilación *in vitro* de glucosa empleando un extracto enzimático obtenido de la cepa original crecida en el mismo carbohidrato. La cantidad de glucosa-6-fosfato obtenida en este ensayo fue considerada como el 100% de fosforilación. La fosforilación de glucosa por parte del extracto enzimático proveniente del micelio de la mutante 2-Dog^R-21 crecida en glucosa, se empleó como control negativo, ya que como se verá en la sección 4.3, esta mutante presentó una actividad de Glk 75% menor a la cepa original (fig. 4.8). Después de llevar a cabo la fosforilación *in vitro* los productos fosforilados se detectaron por cromatografía en capa fina.

En la figura 4.6 se muestran los resultados de la fosforilación relativa de glucosa, galactosa y arabinosa por el extracto enzimático de la mutante 2-Dog^R-21 con respecto al de la cepa original.

El extracto enzimático obtenido de la cepa original fue capaz de fosforilar glucosa en presencia de ATP (control positivo), mientras que la cantidad de galactosa-6-fosfato y arabinosa-5-fosfato obtenida, fue solo alrededor de un 8% de la glucosa-6-fosfato detectada en el control positivo. El

extracto de la mutante 2-Dog^R-21 fosforiló sólo un 17.6% de la glucosa, con respecto a lo obtenido con el extracto de la cepa original, y no se detectó fosforilación de galactosa ni arabinosa.

Los extractos enzimáticos libres de células se obtuvieron del micelio de las cepas crecidas en presencia de glucosa como fuente de carbono, con lo que se aseguró la activación de la glucosa cinasa.

Los resultados sugieren que la actividad catalítica de la Glk es específica para glucosa y dependiente de ATP, ya que en ausencia de este nucleótido se observó muy baja fosforilación de los carbohidratos.

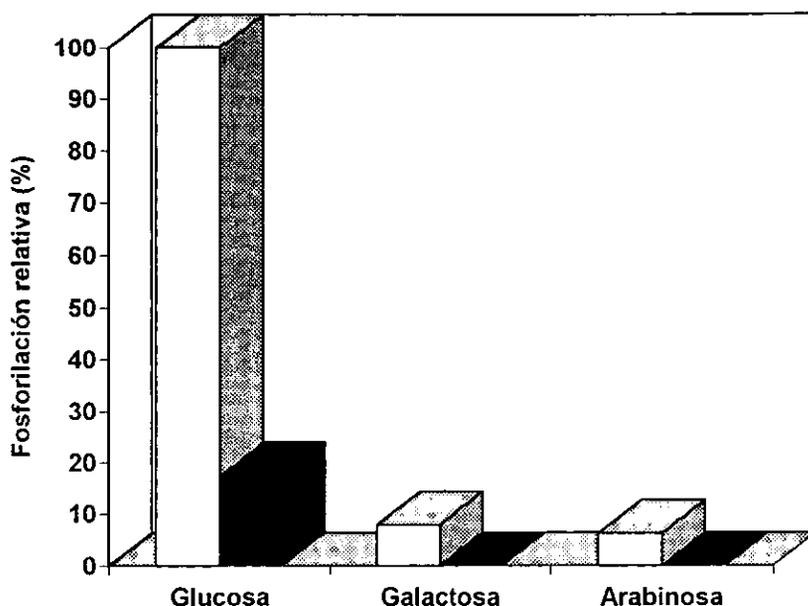


Fig. 4.6 Fosforilación relativa *in vitro* de glucosa, galactosa y arabinosa en un extracto enzimático libre de células de la cepa original (□) y en un extracto enzimático de la mutante 2-Dog^R-21 (■). Reacción en presencia de ATP.

La fosforilación residual de galactosa y arabinosa por el extracto enzimático de la cepa original podría deberse a la actividad de una hexocinasa inespecífica, o bien, a la presencia de actividades basales de las cinasas específicas para dichos carbohidratos.

Con el fin de confirmar estos resultados se realizó un experimento de competencia donde se cuantificó la actividad de Glk en el extracto enzimático de la cepa original en presencia de su substrato natural (la glucosa) y otras fuentes de carbono represoras que hipotéticamente podrían servir también como substratos (galactosa, arabinosa, glutamato o glutamina). Esta determinación se realizó en presencia de tres diferentes concentraciones de cada uno de estos posibles substratos alternativos de la Glk. Los resultados de este experimento se muestran en la figura 4.7.

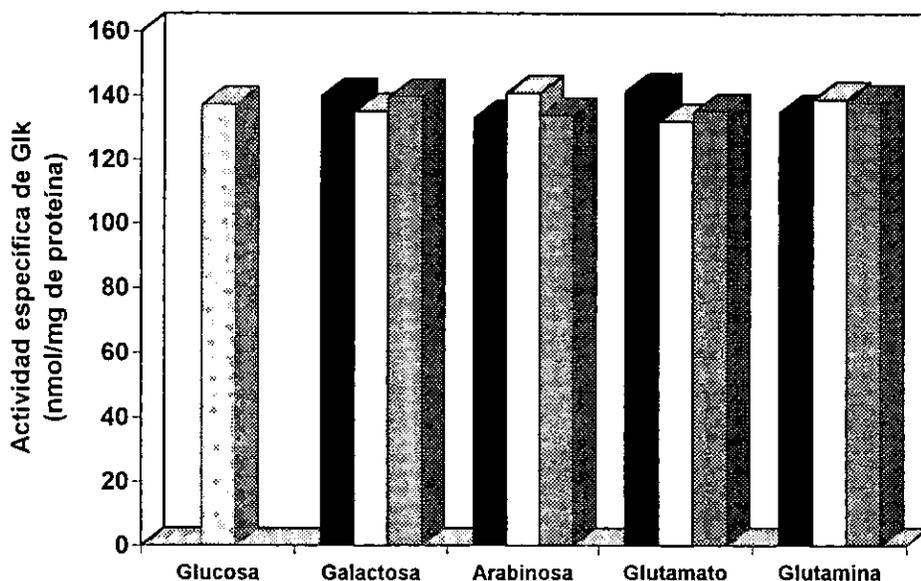


Fig. 4.7 Actividad de Glk en presencia de glucosa 200 mM más galactosa o arabinosa 150 mM (■), 200 mM (□) y 250 mM (▨), o glutamato o glutamina 2.5 mM (■), 5 mM (□) y 7.5 mM (▨). Control positivo con glucosa 200 mM (□).

Como se puede observar, la presencia de otras fuentes de carbono en el medio de reacción no afectó de manera significativa los niveles de actividad de la enzima glucosa cinasa sobre su substrato natural. Al parecer, la afinidad de la Glk hacia la glucosa no sufrió ningún cambio. Lo anterior sugiere fuertemente que la actividad catalítica de esta enzima es específica hacia glucosa.

Dado que la Glk no mostró actividad catalítica sobre otras fuentes de carbono diferentes a glucosa, podemos pensar que muy probablemente no participe, al menos directamente, en el metabolismo de estas fuentes de carbono represoras.

4.3 TRANSPORTE DE GLUCOSA EN LA CEPA ORIGINAL DE *STREPTOMYCES PEUCETIUS* VAR. *CAESIUS* Y EN TRES CEPAS OBTENIDAS A PARTIR DE LA MUTANTE 2-DOG^R-21, SENSIBLES A 2-DOG.

Para determinar el papel de la Glk en el fenómeno de represión catabólica por fuente de carbono en *S. peucetius* var. *caesius*, se aislaron en el laboratorio nuevas cepas a partir de la mutante 2-Dog^R-21, que hubieran recuperado su sensibilidad a la 2-DOG (González, R., resultados sin publicar). Dos de las cepas aisladas a partir de la mutante 2-Dog^R-21 por la pérdida de su capacidad para crecer en medio mínimo suplementado con lactosa 20 mM en presencia de 2-DOG 10 mM, a las que se llamaron 2-Dog^S-2 y 2-Dog^S-11, conservaron su insensibilidad al efecto negativo ejercido por la glucosa, la galactosa y la arabinosa sobre la producción de antraciclinas totales. El resto de las cepas obtenidas, además de recuperar su sensibilidad a 2-DOG, perdieron su resistencia a la represión por glucosa, galactosa y arabinosa (resultados no mostrados).

Con el objeto de explicar las diferencias en la sensibilidad a represión por fuente de carbono observadas en las cepas 2-Dog^S aisladas, se buscó una posible relación entre el fenotipo observado y los niveles de Glk presentes en cada cepa. En diversos trabajos se ha sugerido la posibilidad de que esta enzima este involucrada en el mecanismo de regulación por fuente de carbono en el género *Streptomyces* y con su sensibilidad a 2-DOG (Hodgson, 1982, Seno & Chater, 1983, Angell *et al.*, 1992, Angell *et al.*, 1994, Kwakman & Postma, 1994, Segura *et al.*, 1996), por lo que se midió la actividad de esta enzima en las dos cepas resistentes a represión por glucosa, la 2-Dog^S-2 y la 2-Dog^S-11, y en una cepa que mostró un fenotipo parcialmente sensible a represión por fuente de carbono: la 2-Dog^S-53.

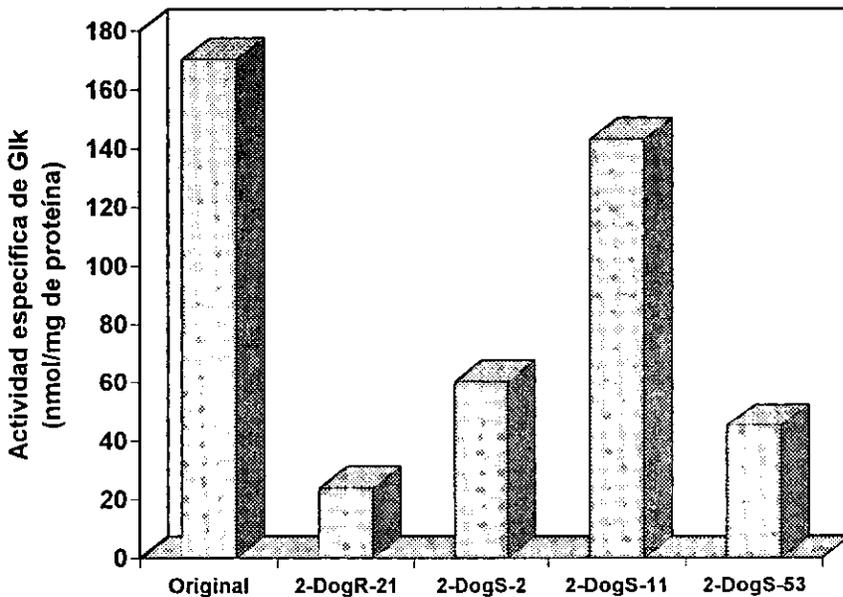


Fig. 4.8 Actividad específica de la enzima glucosa cinasa en la cepa original, en la mutante 2-Dog^R-21 y en las cepas 2-Dog^S-2, 2-Dog^S-11 y 2-Dog^S-53.

Los resultados de esta determinación pueden ser apreciados en la figura 4.8, donde se compara la actividad de Glk detectada en las cepas 2-Dog^S con la actividad de esta enzima presente en la cepa original y en la mutante 2-Dog^R-21.

Las mutantes 2-Dog^R e insensibles a la represión catabólica presentan del 19% al 30% de la actividad mostrada por la Glk en la cepa original (Segura, 1996). En el caso de la mutante 2-Dog^R-21 la actividad de Glk fue de sólo el 15%, mientras que todas las cepas 2-Dog^S presentaron un aumento en la actividad de esta enzima con respecto a la mutante 2-Dog^R-21. La actividad de Glk detectada en las cepas 2-Dog^S-2, 2-Dog^S-11 y 2-Dog^S-53 fue del 35%, 84% y 28% respectivamente, comparada con la actividad de la cepa original. Estos son valores intermedios entre los encontrados en la mutante 2-Dog^R-21 y en la cepa original.

La baja actividad de Glk en la cepa 2-Dog^R-21 y el aumento de esta actividad en las cepas 2-DOG sensibles, sugiere una correlación entre los niveles de la enzima y la sensibilidad a 2-DOG. Al restablecerse parcialmente la actividad de Glk los microorganismos recuperaron su sensibilidad al análogo no metabolizable de la glucosa. Aunado a esto, en estudios realizados previamente en el laboratorio, se observó que la 2-DOG incorporada por la cepa original se encuentra totalmente como 2-DOG-6-fosfato en el interior de la célula, lo que sugiere que este compuesto fosforilado pudiera ser el responsable del efecto tóxico sobre el crecimiento del microorganismo.

A pesar de la correlación que se observa entre la actividad de la Glk y la sensibilidad a 2-DOG mostrada, no se puede establecer una conexión directa entre los niveles de esta enzima y la sensibilidad a la represión por glucosa. La actividad de Glk mostrada por la cepa original fue considerada como el 100% de actividad de esta enzima, además esta cepa presenta sensibilidad a

represión por glucosa. La mutante 2-Dog^R-21 ha perdido el 75% de esa actividad y es ahora resistente al efecto negativo de la glucosa. Por esto, se ha pensado en un papel fundamental de la Glk en el mecanismo de regulación por fuente de carbono. Sin embargo, lejos de lo que se esperaría según esta hipótesis, de las cepas aisladas a partir de esta mutante resistente a represión catabólica, las que conservaron esta característica mostraron actividades de Glk de dos a cuatro veces mayores que la actividad encontrada en la mutante 2-Dog^R-21. Además, en la cepa 2-Dog^S-53 que revirtió el fenotipo de resistencia a represión por glucosa, estos valores no aumentaron considerablemente a pesar de que mostró una actividad de Glk mayor que la mutante 2-Dog^R-21.

Ya que una de las hipótesis se refería a la posible relación de la Glk con el transporte de las fuentes de carbono represoras, se determinó la incorporación de glucosa en estas cepas 2-Dog^S con el objeto de determinar si al haber un cambio en la actividad de la enzima, el transporte se modificaba; así como para determinar la relación entre los niveles de transporte y los valores de actividad de Glk.

En la figura 4.9 se pueden observar los resultados de la determinación del transporte de glucosa en las cepas 2-Dog^S-2 y 2-Dog^S-11. Comparadas con la cepa original, estas cepas presentaron una incorporación de glucosa de sólo 5% y 12%, respectivamente, es decir, una incorporación todavía menor a la presentada por la mutante 2-Dog^R-21.

Estos resultados indican que el restablecimiento parcial de la actividad de Glk en las mutantes 2-Dog^S, no incrementa los niveles de incorporación de glucosa, aun cuando en el caso de la cepa 2-Dog^S-11 se recuperó hasta el 84% de esta actividad con respecto a la cepa original.

La cepa 2-Dog^S-53 incorporó una cantidad de glucosa ligeramente mayor que la cepa 2-Dog^R-21, sin embargo esta diferencia no fue significativa.

Podemos observar que a pesar de que la actividad de Glk no aumentó considerablemente en esta cepa (sólo hasta un 28% con respecto a la cepa original), el transporte de glucosa no disminuyó, como en el caso de las cepas 2-Dog^S 2 y 11.

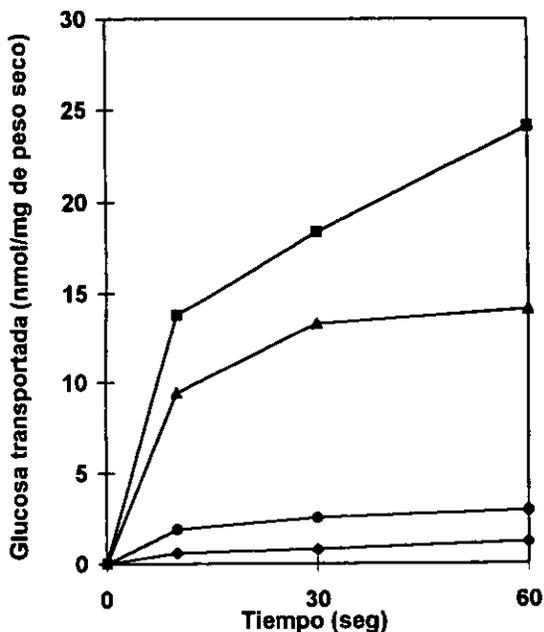


Fig. 4.9 Transporte de glucosa en la cepa original de *S. peuceetius* var. *caesius* (■) y en tres cepas 2-Dog^S obtenidas a partir de la mutante 2-Dog^R-21: la cepa 2-Dog^S-2 (●), la 2-Dog^S-11(◆) y la 2-Dog^S-53 (▲).

Para tener un panorama más claro de los que estaba sucediendo, se buscó una posible relación entre la actividad de la Glk, la sensibilidad a

2-DOG, el transporte de glucosa y la sensibilidad a represión por fuente de carbono en estas cepas 2-Dog^S.

En la tabla 4.1 se puede apreciar que los valores de actividad de Glk y de transporte de glucosa para todas las cepas fueron menores que los mostrados por la cepa original.

Cepa	Sensibilidad a 2-DOG	Transporte de glucosa (%)	Actividad de Glk (%)	Relación A/B	Sensibilidad a represión catabólica
		A	B		
Original	S	100	100	1.0	S
2-Dog ^R -21	R	52	15	3.7	R
2-Dog ^S -2	S	5	35	0.14	R
2-Dog ^S -11	S	12	84	0.14	R
2-Dog ^S -53	S	57	28	2.0	S

Tabla 4.1 Fenotipo presentado por las diferentes cepas de *S. peucetius* var. *caesius* estudiadas. S: sensible, R: resistente.

Como se vió anteriormente, a pesar de que se encontró una correlación directa entre la sensibilidad a 2-DOG y la actividad de Glk, no fue posible determinar una relación entre esta sensibilidad, los niveles de transporte y la susceptibilidad a la represión por glucosa mostrados por cada cepa. Además, los valores de transporte y actividad de la enzima, tampoco mostraron dependencia hacia el fenotipo de resistencia o sensibilidad a represión catabólica por fuente de carbono.

Con el fin de encontrar una explicación a estos resultados, se calculó la relación transporte de glucosa/actividad de Glk. Estos valores se muestran en

la tabla 4.1 (relación A/B), donde se puede observar que existe una correlación entre este cociente y la resistencia a represión catabólica por la fuente de carbono. De las cepas 2-Dog^S, las dos resistentes a represión catabólica (cepas 2 y 11) mostraron una baja incorporación de glucosa, pero su concentración de Glk fue mucho mayor que la de la mutante 2-Dog^R-21, resultando en una relación A/B igual para ambas. En estas condiciones se podría esperar que la formación de glucosa-6-fosfato en el interior de las células estuviera disminuida debido a la escasa incorporación de glucosa. La glucosa-6-fosfato o sus derivados podrían ser importantes efectores en el mecanismo de regulación catabólica, de manera que al verse disminuida su concentración el efecto negativo de la glucosa no podría manifestarse. A diferencia de las cepas 2-Dog^S 2 y 11, la cepa 2-Dog^S-53 con una concentración menor de Glk pero con un transporte de glucosa varias veces superior al de estas dos cepas, presentó un valor de la razón A/B mucho mayor y resultó ser sensible a represión catabólica. Los valores de transporte y actividad de Glk de esta cepa mostraron una tendencia similar a la de la cepa padre 2-Dog^R-21, sin embargo estos valores podrían ser lo suficientemente altos como para pensar en la obtención de una concentración intracelular de glucosa-6-fosfato mayor, capaz de desencadenar el efecto negativo sobre el aprovechamiento de otras fuentes de carbono y sobre la producción de metabolitos secundarios.

Adicionalmente, la sensibilidad a represión catabólica por fuente de carbono, en las cepas 2-Dog^S parece no estar relacionada con los niveles de actividad de la enzima Glk presentes en ellas. En este sentido, Angel *et al.* (1994) reportaron el aislamiento de una mutante *glkA-orf3* supresora de *S. coelicolor* cuyo gen *dagA* mostraba insensibilidad a represión por glucosa, pero expresaba niveles de Glk similares a los de la cepa silvestre. Además, Ingram & Westpheling (1995) demostraron que en una mutante de *S.*

coelicolor que carecía de G1k, la regulación transcripcional por glucosa del promotor *chi63* se llevaba a cabo normalmente como en la cepa silvestre.

Los resultados obtenidos sugieren fuertemente que la G1k por sí misma no posee un papel determinante en el proceso de regulación por fuente de carbono. Dado que la sensibilidad a 2-DOG mostró una relación directa con los niveles de G1k en las cepas estudiadas y recordando que en estudios previos se encontró que toda la 2-DOG transportada por la cepa original se encontraba en el interior de la célula en su forma fosforilada, estos factores en combinación con los niveles de incorporación de las fuentes de carbono represoras, podrían determinar la resistencia o insensibilidad a represión catabólica presentada por las cepas.

La glucosa-6-fosfato podría ser el efector metabólico en la regulación por glucosa, interaccionando con otras moléculas para formar finalmente un complejo represor que actúe sobre los operadores de los genes sensibles a represión. Estas otras moléculas podrían ser proteínas represoras, o bien, componentes de los sistemas responsables del transporte o metabolismo de las fuentes de carbono represoras.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

- El transporte de glucosa, galactosa, arabinosa y glutamato mostró ser estimulado específicamente por la fuente de carbono, tanto en la cepa original como en la mutante 2-Dog^R-21 de *Streptomyces peucetius* var. *caesius*.
- La enzima glucosa cinasa (Glc) no es la responsable de la incorporación de los carbohidratos (glucosa, galactosa y arabinosa) en estas cepas.
- La Glc no participa en la fosforilación de galactosa ni arabinosa. Esta enzima es específica para glucosa y dependiente de ATP.
- Se encontró una correlación directa entre los niveles de Glc y la sensibilidad a la 2-desoxiglucosa (2-DOG) presentada por las cepas de *S. peucetius* var. *caesius*.
- No existe relación entre la actividad de Glc, los niveles de transporte y la sensibilidad a represión catabólica por fuente de carbono en las cepas estudiadas.
- La Glc por sí sola no es capaz de regular el mecanismo de represión catabólica por fuente de carbono en *S. peucetius* var. *caesius*.
- La relación entre el transporte de las fuentes de carbono represoras y la actividad de Glc, podría determinar la producción de un efector metabólico involucrado en la regulación por carbono, y así establecer el fenotipo de resistencia o sensibilidad a este mecanismo en las diferentes cepas de *S. peucetius* var. *caesius*.
- La glucosa-6-fosfato podría ser un efector metabólico del mecanismo de regulación por carbono capaz de interactuar con otras moléculas, proteínas represoras o componentes de los sistemas de transporte o metabolismo de las fuentes de carbono represoras, y regular la expresión de los genes sensibles a represión.

APÉNDICE

Cepas

CEPAS	DESCRIPCIÓN
Original	Cepa original de <i>Streptomyces peucetius</i> var. <i>caesius</i> ATCC27952
2-Dog ^R -21	Mutante resistente a 2-DOG, resistente a represión por carbono
2-Dog ^S -2	Cepa aislada a partir de la mutante 2-Dog ^R -21, sensible a 2-DOG y resistente a represión por carbono
2-Dog ^S -11	Cepa aislada a partir de la mutante 2-Dog ^R -21, sensible a 2-DOG y resistente a represión por carbono
2-Dog ^S -53	Cepa aislada a partir de la mutante 2-Dog ^R -21, sensible a 2-DOG y sensible a represión por carbono

REFERENCIAS

- Angell, S., E. Schwartz, & J.M. Bibb. (1992). The glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2): its nucleotide sequence, transcriptional analysis and role in glucose repression. *Mol. Microbiol.* **6**, 2833-2844.
- Angell, S., C.G. Lewis, M.J. Buttner, & M.J. Bibb. (1994). Glucose repression in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a likely regulatory role for glucose kinase. *Mol. Gen. Genet.* **244**, 135-143.
- Arcamone, F., G. Cassinelli, G. Fantini, A. Grein, P. Orezzi, C. Pol, C. Spalla. (1969). Adriamycin, 14-Hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol. Bioeng.* **11**, 1101-1110.
- Arcamone, F. (1981). Doxorubicin: Anticancer Antibiotics. *Academic Press*. USA.
- Baumberg, S., Krügel, H. and Noack, D. (Eds). (1991). Genetics and product formation in *Streptomyces*. *Plenum Press*. New York.
- Botsford, J. L. & J. G. Harman. (1992). *Microbiol.* **56**, 100-122.
- Braña, A., Paiva, N. and A. L. Demain. (1986). Pathways and regulation of ammonium assimilation in *Streptomyces clavuligerus*. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 1305-1317.
- Chaterjec, S. & L.C. Vining. (1982). Catabolite repression in *Streptomyces venezuelae*. Induction of β -galactosidase, chloramphenicol production, and intracellular cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate concentrations. *Can. J. Microbiol.* **28**, 311-317.
- Crandall, L.W. & R.L. Hamill. (1986). Antibiotics produced by *Streptomyces*: major structural classes. In: Antibiotic-producing *Streptomyces*. S. W. Queener and L.E. Day (ed). *Academic Press, Inc.*, New York. 355-402.
- Dekleva, M.L., J.A. Titus, W.R. Strohl. (1985). Nutrient effects on anthracycline production by *Streptomyces peucetius* in a defined medium. *Can. J. Microbiol.* **31**, 287-294.
- Dekleva, M. & W. Strohl. (1987). Glucose-stimulated acidogenesis by *Streptomyces peucetius*. *Can. J. Microbiol.* **33**, 1129-1132.
- Delic, V., D.A. Hopwood, E.J. Friend. (1970) Mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) in *Streptomyces coelicolor*. *Mut. Res.* **9**, 167-182.
- Delic, I., P. Robbins, & J. Westphelling. (1992). Direct repeat sequences are implicated in the regulation of two *Streptomyces* chitinase promoters that are subject to catabolite control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 1885-1889.

- Demain, A.L. (1989).** Carbon source regulation of idiolite biosynthesis in *Actinomycetes*. In: Regulation of Secondary Metabolism in *Actinomycetes*. S. Shapiro (ed). CRC Press, Inc. Florida. 127-134.
- Frost, G.M., D. A. Moss. (1987).** Production of enzymes by fermentation. In: Biotechnology. Rehmand, H. J., G. Reed, J.F. Kennedy, (ed). VCH Verlagsgesellschaft Weinheim. 7a, 65-211.
- Gersch, D., W. Romero, H. Bocker, & H. Thrum. (1980).** Variations in cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate and cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate in antibiotic-producing strains of *Streptomyces hygroscopicus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 3, 39-41.
- Hershberger, C., S. Queener, G. Hegeman. (1989).** Genetics and molecular biology of industrial microorganism. *American Society for Microbiology*. USA.
- Hirsch, C.F., & P.A. McCann-McCormick .(1985).** Biology of *Streptomyces*. In: Biology of Industrial Microorganisms. Demain, A., Solomon, N. (ed). *Butterworths*. USA, 10, 241-309.
- Hodgson, D.A. (1982).** Glucose repression of carbon uptake and metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its perturbation in mutants resistant to 2-deoxyglucose. *J. Gen. Microbiol.* 128, 2417-2430.
- Hopwood, D.A. (1988).** Towards an understanding of gene switching in *Streptomyces*, the basis of sporulation and antibiotic production. *Proc. R. Soc. Lond. Inglaterra.* 235, 121-138.
- Hueck, C.J., & W. Hillen. (1995).** Catabolite repression in *Bacillus subtilis*: a global regulatory mechanism for the Gram-positive bacteria?. *Mol. Microbiol.* 15, 395-401.
- Ikeda, H., E.T. Seno, C.J. Bruton, & K.F. Chater. (1984).** Genetic mapping, cloning and physiological aspects of the glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Gen. Genet.* 196, 501-507.
- Ingram, C., I. Delic & J. Westpheling. (1995).** *ccrA1*: mutation in *Stretomyces coelicolor* that affects the control of catabolite repression. *J. Bacteriol.* 177, 3579-3586.
- Ingram, C. & J. Westpheling. (1995).** The glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor* is not required for glucose repression of the *chi63* promoter. *J. Bacteriol.* 177, 3587-3588.
- Ishiuka, H., A. Hanamura, T. Kunimura & H. Aiba. (1993).** A lowered concentration of cAMP receptor protein cause by glucose is an important determinant for catabolite repression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 10, 341-350.
- Kolter, R. & D. Siegel. (1992).** Life after log. *J. of Bacteriol.* 174(2), 345-348.

Kwakman, J.H.J.M. & P.W. Postma. (1994). Glucose kinase has a regulatory role in carbon catabolite repression in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **176**, 2694-2698.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr & R. J. Randall. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chemistry.* **193**, 265.

Madigan, M. T., J.M. Martinko & J. Parker. (1997). Biology of Microorganisms. Prentice Hall. Upper Saddle River, New Jersey. USA. 731-740.

Mattern, S. G., M.E. Brawner & J. Westphelling. (1993). Identification of a complex operator for *galP1*, the glucose-sensitive, galactose-dependent promoter of the *Streptomyces* galactose operon. *J. Bacteriol.* **175**, 1213-1220.

Miwa, Y., Kazuya Nagura, Susumu Eguchi, Hirokazo Fukuda, J. Deutscher, & Yasutaro Fujita. (1997). Catabolite repression of the *Bacillus subtilis* *gnt* operon exerted by two catabolite-responsive elements. *Mol. Microbiol.* **23**, 1203-1213.

Paulsen, I.T. (1996). Carbon metabolism and its regulation in *Streptomyces* and other GC Gram-positive bacteria. *14th Forum in Microbiology.* 535-541.

Rose, A.H. (1979). Production and industrial importance of secondary products of metabolism. In: Economic Microbiology. Rose, A. H. (ed). *Academic Press*, New York, N. Y. **3**, 1-33.

Saier, M.H., Jr (1989). Protein phosphorylation and allosteric control of inducer exclusion and catabolite repression by the bacterial phosphoenol-pyruvate:sugar phosphotransferase system. *Microbiol. Rev.* **53**, 109-120.

Saier, M.H., S. Chauvaux, J. Deutscher, J. Reizer, & Jing-Jing Ye. (1995). Protein phosphorylation and regulation of carbon metabolism in Gram-negative versus Gram-positive bacteria. *TIBS*, **20**, 267-271.

Segura, D., R. González, R. Rodríguez, T. Sandoval, L. Escalante, & S. Sánchez. (1996). *Streptomyces* mutants insensitive to glucose repression showed deregulation of primary and secondary metabolism. *Asia Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* **4**, 30-36.

Seno, E.T., & K.F. Chater. (1983). Glycerol catabolic enzymes and their regulation in wild-type and mutant strains of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Gen. Microbiol.* **129**, 1403-1413.

Servin-González, L., M.R. Jensen, J. White & M. Bibb. (1994). Transcriptional regulation of the four promoters of the agarase gene (*dagA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiol.* **140**, 2555-2565.

Smith, C.P. & K.F. Chater (1988). Structure and regulation of controlling sequences for the *Streptomyces coelicolor* glycerol operon. *J. Mol. Biol.* **204**, 569-580.

Smith, D., N.J. Wood, & D.A. Hodgson. (1995). Interaction between primary and secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2): role of pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase. *Microbiol.* 1739-1744.

Stutzman-Engwall, K.J., S.L. Otten, C.R. Hutchinson. (1992). Regulation of secondary metabolism in *Streptomyces* spp. and overproduction of daunorubicin in *Streptomyces peuceetius*. *J. Bacteriol.* **174**, 144-154.

Titgemeyer, F., J. Reizer, A. Reizer, & M.H. Saier. (1994). Evolutionary relationships between sugar kinases and transcriptional repressors in bacteria. *Microbiol.* **140**, 2349-2354.

Titgemeyer, F., J. Walkenhorst, J. Reizer, M.H. Stiver, X. Cui, M.H. & Saier Jr. (1995). Identification and characterization of phosphoenol-pyruvate:fructose phosphotransferase systems in three *Streptomyces* species. *Microbiol.* **141**, 51-58.

Trumbly, R.J. (1992). Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **6**, 15-21.

Vandamme, E. J. (1984). Biotechnology of industrial antibiotics. Marcel Dekker (ed). USA. Vol. XXII.

Vanék, Z., J. Tax, I. Komersova, P. Sedmera, J. Vokoun. (1977). Antracyclines. *Folia Microbiol.* **22**, 139-159.

Virolle, M.J. & J. Gagnat (1994). Sequences involved in growth-phase-dependent expression and glucose repression of *Streptomyces* α -amylase gene. *Microbiol.* **140**, 1059-1067.