

00562  
7  
25



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE CEPAS DE  
*Streptomyces peucetius* VAR. *caesius* SENSIBLES A  
2-DOG, OBTENIDAS A PARTIR DE UNA MUTANTE  
2-DOG<sup>a</sup> INSENSIBLE A REPRESION CATABOLICA  
POR CARBONO”**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUIMICAS  
P R E S E N T A :  
ALMA ITZEL RAMOS SOLIS

272946



MEXICO, D. F.

1999

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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**

<b>Presidente</b>	<b>Dr. José Pedraza Chaverri</b>
<b>Vocal</b>	<b>Dr. Edgardo Escamilla Marván</b>
<b>Secretario</b>	<b>Dr. Guillermo Aguilar Osorio</b>
<b>Suplente</b>	<b>Dra. Laura Camarena</b>
<b>Suplente</b>	<b>Dr. Daniel Segura González</b>

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Microbiología Industrial, Depto. de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, bajo la asesoría del Dr. Sergio Sánchez Esquivel (tutor principal).

*A mis padres y a mis hermanos  
con mucho cariño*

*Al Dr. Sergio Sánchez  
por todo su apoyo, dedicación e inigualable amistad*

*A Sergio  
con todo mi amor*

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

*A la Universidad Nacional Autónoma de México*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Sergio Sánchez Esquivel por su apoyo y su valiosa aportación a mi formación humana y profesional.

A Rosalba González e Iveta Imriskova por sus aportaciones en el desarrollo del presente trabajo.

A Beatriz Ruiz, Laura Escalante, Elizabeth Langley y Ruth Martín por su ayuda y orientación técnica.

A mi comité tutorial y mi jurado de tesis: Dr. José Pedraza Chaverri, Dr. Luis Servín, Dr. Guillermo Aguilar, Dr. Edgardo Escamilla, Dra. Laura Camarena y Dr. Daniel Segura por sus aportaciones, lectura, revisión y evaluación de este trabajo.

A la Dra. Amelia Farrés por toda su ayuda durante la realización de mis estudios de maestría.

# CONTENIDO

## RESUMEN 1

### 1. INTRODUCCIÓN 2

### 2. MARCO TEÓRICO 3

2.1 Características del género *Streptomyces* 4

2.2 *Streptomyces peucetius* var. *caesius* 6

2.3 Mecanismos de regulación metabólica 8

2.3.1 Represión catabólica por fuente de carbono 11

2.3.2 Represión catabólica en *Streptomyces* 13

2.4 Transporte de carbohidratos 18

2.5 Antecedentes en *Streptomyces peucetius* var. *caesius* 21

### 3. OBJETIVO 23

### 4. ESTRATEGIA 24

### 5. MATERIAL Y MÉTODOS 25

5.1 Microorganismos 26

5.2 Estrategia para la obtención de cepas 2-dog<sup>S</sup> a partir de la mutante  
2-dog<sup>R</sup>-21 26

5.3 Medios y condiciones de cultivo 28

5.3.1 Preparación de inóculos 28

5.3.2 Cultivos 29

5.3.3 Obtención de extractos enzimáticos libres de células 29

5.4 Métodos analíticos 30

5.4.1 Determinación de la actividad de glucosa cinasa 30

5.4.2 Zimograma de la actividad de glucosa cinasa 31

5.4.3 Determinación de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa 32

5.4.4	<i>Métodos de extracción y cuantificación de antraciclinas totales</i>	32
5.4.5	<i>Determinación de proteína por el método de Lowry</i>	33
5.4.6	<i>Transporte de las fuentes de carbono represoras</i>	34
5.4.7	<i>Determinación de peso seco</i>	36
6.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	37
6.1	Aislamiento de cepas 2-dog <sup>S</sup> a partir de una mutante 2-dog <sup>R</sup> resistente a represión catabólica por carbono	38
6.2	Sensibilidad a represión catabólica por carbono	39
6.3	Actividad de glucosa cinasa	43
6.4	Transporte de glucosa	46
6.5	Relación entre los parámetros cuantificados en las cinco cepas analizadas	49
6.6	Efecto de la glucosa sobre el sistema de transporte de galactosa	53
7.	<b>CONCLUSIONES</b>	59
8.	<b>PERSPECTIVAS</b>	62
	<b>APÉNDICE</b>	65
	<b>REFERENCIAS</b>	66

## ILUSTRACIONES

### FIGURAS

**Figura 2.1a** Micelio aéreo y esporas de *Streptomyces coelicolor* 5

**Figura 2.1b** Ciclo de vida de *Streptomyces* 5

**Figura 2.2.-** Mapa físico del cromosoma de *S. coelicolor* 6

**Figura 2.3.-** Estructura de la doxorrubicina y otras antraciclinas importantes 7

**Figura 6.1a.-** Efecto de glucosa sobre la síntesis de  $\beta$ -galactosidasa en la cepa original y en las mutantes 2-dog<sup>R</sup>-21, 2-dog<sup>S</sup>-2, 2-dog<sup>S</sup>-11 y 2-dog<sup>S</sup>-53 de *S. peucetius* var. *caesius* 40

**Figura 6.1b.-** Efecto de glucosa sobre la producción de antraciclinas totales en la cepa original y en las mutantes 2-dog<sup>R</sup>-21, 2-dog<sup>S</sup>-2, 2-dog<sup>S</sup>-11 y 2-dog<sup>S</sup>-53 de *S. peucetius* var. *caesius* 40

**Figura 6.2a.-** Efecto de galactosa sobre la síntesis de  $\beta$ -galactosidasa en la cepa original y en las mutantes 2-dog<sup>R</sup>-21, 2-dog<sup>S</sup>-2, 2-dog<sup>S</sup>-11 y 2-dog<sup>S</sup>-53 de *S. peucetius* var. *caesius* 42

**Figura 6.2a.-** Efecto de galactosa sobre la producción de antraciclinas totales en la cepa original y en las mutantes 2-dog<sup>R</sup>-21, 2-dog<sup>S</sup>-2, 2-dog<sup>S</sup>-11 y 2-dog<sup>S</sup>-53 de *S. peucetius* var. *caesius* 42

**Figura 6.3.-** Actividad específica de glucosa cinasa en la cepa original y en las mutantes 2-dog<sup>R</sup>-21, 2-dog<sup>S</sup>-2, 2-dog<sup>S</sup>-11 y 2-dog<sup>S</sup>-53 de *S. peucetius* var. *caesius* 43

**Figura 6.4.-** Zimograma de la actividad de la enzima glucosa cinasa 45

**Figura 6.5.-** Transporte de glucosa en la cepa original y en las mutantes 2-dog<sup>R</sup>-21, 2-dog<sup>S</sup>-2, 2-dog<sup>S</sup>-11 y 2-dog<sup>S</sup>-53 de *S. peucetius* var. *caesius* 48

**Figura 6.6.-** Efecto de glucosa sobre el transporte de galactosa en la cepa original de *S. peucetius* var. *caesius* 55

**Figura 6.7.-** Efecto de glucosa sobre el transporte de galactosa en la mutante 2-dog<sup>R</sup>-21 de *S. peucetius* var. *caesius* 57

## TABLAS

**Tabla 5.1.-** Condiciones para la determinación de la actividad de glucosa cinasa en las cepas de *S. peucetius* var. *caesius* estudiadas 29

**Tabla 5.2.-** Actividad específica y actividad ajustada de las fuentes de carbono marcadas empleadas en la determinación del transporte 33

**Tabla 5.3.-** Condiciones para la determinación del efecto de glucosa sobre el sistema de transporte de galactosa en la cepa original y en la mutante 2-dog<sup>R</sup>-21 33

**Tabla 6.1.-** Características de las cepas progenitoras 39

**Tabla 6.2.-** Fenotipo presentado por las diferentes cepas estudiadas de *S. peucetius* var. *caesius* 50

## ABREVIATURAS

ml	Mililitros
μl	Microlitros
mmol	Milimol
mM	Milimolar
N	Normal
mg	Miligramos
μg	Microgramos
v/v	Relación volumen-volumen
w/v	Relación peso-volumen
cm	Centímetros
mm	Milímetros
nm	Nanómetros
mCi	Milicuries
μCi	Microcuries
kDa	Kilo Daltones
h	Horas
min	Minutos
seg	Segundos
rpm	Revoluciones por minuto
U	Unidades de enzima (mol de producto/min/mol de enzima)
°C	Grados Centígrados
MOPS	Ácido 3-[N-Morfolino] propansulfónico
MM	Medio mínimo
UM	Uptake medium (medio para transporte)
Tris-HCl	Amortiguador de tris-hidroximetilaminometano-HCl
Tris-glicina	Amortiguador de tris-hidroximetilaminometano-glicina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
MTT	Metil-tiazolil-tetrazolium
ONPG	o-nitrofenil-b-galactopiranosido
PPO	2,5-Difeniloxazol
POPOP	1,4-bis[5-fenil-2-oxazolil]bencen;2,2'-p-fenilen-bis [5-feniloxazol]
NADP	Nicotin adenin dinucleótido fosfato
ATP	Trifosfato de adenina
ADP	Difosfato de adenina
AMP	Monofosfato de adenina
AMPc	Monofosfato de adenina forma cíclica
ADN	Ácido desoxirribonucléico

ARN	Ácido ribonucleico
ASB	Albumina sérica bovina
2-dog	2-desoxiglucosa
G6P	Glucosa-6-fosfato
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GC	Guanina:citocina
Gik	Glucosa cinasa
RC	Represión catabólica

## RESUMEN

A pesar de la interesante biología de las especies de *Streptomyces*, poco se sabe acerca de los mecanismos que regulan la expresión de los genes involucrados en el metabolismo primario y secundario. La represión catabólica por fuente de carbono es un importante mecanismo de regulación metabólica en este género, donde se ha sugerido que la enzima glucosa cinasa (Glc) juega un importante papel en dicho mecanismo de regulación. El objetivo de este trabajo fue contribuir al estudio del mecanismo de regulación catabólica por fuente de carbono en *Streptomyces*. Empleando un procedimiento de enriquecimiento con ampicilina, a partir de una mutante resistente a 2-dog (2-dog<sup>R</sup>-21) e insensible a represión catabólica por carbono, se aislaron 8 mutantes de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* por su sensibilidad a un análogo no metabolizable de la glucosa, la 2-desoxiglucosa (2-dog). Estas mutantes y la cepa padre fueron examinadas por su sensibilidad a 2-dog, su actividad de glucosa cinasa (Glc), su capacidad para incorporar glucosa y su sensibilidad a represión catabólica (RC). Dos de las cepas sensibles a 2-dog (2-dog<sup>S</sup>) aisladas mostraron insensibilidad a RC por carbono, mientras que la producción de  $\beta$ -galactosidasa y de antraciclinas totales fue reprimida por glucosa en las 6 cepas restantes. Se encontró una correlación entre la sensibilidad a 2-dog y la actividad de Glc en todas las cepas analizadas. Sin embargo, no se encontró una relación evidente entre la actividad enzimática de Glc, la sensibilidad a RC y el transporte de glucosa. No obstante, a pesar del incremento en la actividad de Glc, las dos cepas 2-dog<sup>S</sup> insensibles RC, prácticamente no incorporaron glucosa. Además, todas las cepas 2-dog<sup>S</sup> aisladas, mostraron una sola banda de actividad de Glc de igual movilidad a la revelada en la cepa original y en la cepa padre 2-dog<sup>R</sup>-21. Los resultados de este estudio sugieren que, en *S. peucetius* var. *caesius*, más que un papel regulador independiente de su capacidad catalítica, la Glc parece participar en el mecanismo de RC en conjunto con otros factores, como el mecanismo de transporte de la fuente de carbono represora, determinando el flujo metabólico y la acumulación de metabolitos efectores de la represión. Por otra parte, se determinó el efecto de glucosa sobre el mecanismo de transporte de galactosa tanto en la cepa original, como en la mutante 2-dog<sup>R</sup>-21. El transporte de galactosa se encontró aun reprimido en la mutante 2-dog<sup>R</sup>-21, y la glucosa por sí misma reprimió e inhibió la incorporación de galactosa en la cepa original de este microorganismo, lo que sugiere que varios mecanismos de represión catabólica por carbono podrían existir en una sola especie de *Streptomyces*.

# 1. INTRODUCCIÓN

Todos los organismos vivos poseen gran capacidad para generar la energía requerida en los procesos celulares. Sin embargo, existen mecanismos de regulación que previenen el gasto superfluo de energía y que controlan todos los aspectos del metabolismo celular. Así, tanto el metabolismo primario como el metabolismo secundario están regulados por la disponibilidad de nutrientes. La presencia de fuentes de carbono rápidamente metabolizables, como la glucosa, controla la actividad de diversas enzimas e impide la expresión de un gran número de genes involucrados en el metabolismo de fuentes de carbono alternativas, y en la biosíntesis de metabolitos secundarios, como los antibióticos (Demain, 1989; Segura *et al.*, 1996). Este mecanismo de control metabólico se conoce como represión catabólica por fuente de carbono y se ha estudiado en diferentes microorganismos, encontrándose gran complejidad y diversidad en los procesos de regulación por este fenómeno (Trumbly, 1992; Hueck and Hillen, 1995; Saier *et al.*, 1995; Paulsen, 1996).

*Streptomyces peuceletii* var. *caesius* es un microorganismo de gran importancia médica e industrial, ya que es el productor de doxorubicina, un antibiótico que posee actividad antineoplásica (Arcamone *et al.*, 1969; Arcamone, 1981; Hershberger, 1989; Vandamme, 1984). La producción de este antibiótico y el metabolismo de fuentes de carbono alternativas se ven afectados negativamente en presencia de altas concentraciones de glucosa (Segura *et al.*, 1996). El mecanismo por el cual se lleva a cabo la represión catabólica por fuente de carbono en el género *Streptomyces* aun no se entiende completamente, sin embargo, se sabe que es considerablemente diferente al que existe en *Escherichia coli* y en bacterias Gram-positivas de bajo contenido en GC como *Bacillus subtilis* (Postma *et al.*, 1993; Postma *et al.*, 1996). La actividad de la enzima glucosa cinasa (Glc), la capacidad de incorporar la fuente de carbono y otros factores o proteínas represoras, parecen mediar el proceso global de regulación por fuente de carbono en este género (Hodgson, 1982; Angell *et al.*, 1994; Kwakman and Postma, 1994; Ingram *et al.*, 1995).

## ***2. MARCO TEÓRICO***

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 CARACTERÍSTICAS DEL GENERO *STREPTOMYCES*

Los actinomicetos son un grupo numeroso de bacterias miceliales o filamentosas, frecuentemente ramificadas, dentro del cual se encuentra clasificado el género *Streptomyces*. Se han descubierto y clasificado más de 500 especies de *Streptomyces* se han descubierto y clasificado. Este género está constituido por bacterias Gram-positivas, generalmente aerobias estrictas, ampliamente distribuidas en suelos, sin embargo, algunas de ellas se han encontrado en ambientes acuáticos, donde participan en la descomposición de materia orgánica. Estas bacterias multicelulares forman micelio filamentososo (fig. 2.1 A) que experimenta un ciclo complejo de diferenciación morfológica (Hirsch *et al.*, 1985; Madigan *et al.*, 1997). Las esporas producidas por estos microorganismos germinan para formar un micelio vegetativo ramificado que coloniza el substrato y, cuando los nutrimentos escasean, desarrollan hifas aéreas que eventualmente se diferenciarán hacia esporas (fig. 2.1 B). La formación de las hifas aéreas comúnmente coincide con la producción de metabolitos secundarios (Hirsch *et al.*, 1985; Hopwood, 1988). El micelio de los *Streptomyces* es multinucleado, cada compartimento de las hifas contiene numerosas copias del cromosoma. En contraste, las esporas contienen solo un cromosoma. El ADN de estos microorganismos es rico en GC (72% en promedio) y son uno de los pocos ejemplos de bacterias con cromosoma lineal (fig. 2.2) (Chen, 1996; Kolsto, 1997). Los extremos terminales del cromosoma, o telómeros, consisten en secuencias repetidas invertidas de diversos tamaños, y proteínas covalentemente unidas al extremo 5' (Lin *et al.*, 1993; Lezhava *et al.*, 1995; Leblond *et al.*, 1996; Pandza *et al.*, 1997). Su cromosoma es muy

inestable y puede experimentar deleciones espontáneas, donde los telómeros son frecuentemente eliminados, con una frecuencia mayor al 0.1% de las esporas cultivadas (Leblond and Decaris, 1994).

Los estreptomicetos poseen gran capacidad para sintetizar numerosos metabolitos secundarios y proteínas extracelulares. La producción de enzimas extracelulares por los microorganismos de este género, esencial en la degradación de biomasa y la asimilación de diversas fuentes de nutrimentos, comprende gran variedad de enzimas hidrolíticas como quitinasas, celulasas, amilasas, xilanasas y proteasas (Crandall and Hamill, 1986; Frost and Moss, 1987, Rose, 1979). Más del 60 % de los antibióticos naturales conocidos son producidos por organismos del género *Streptomyces*. La versatilidad biosintética y la complejidad morfológica del género, confieren a estos microorganismos gran importancia industrial y científica (Hirsch *et al.*, 1985; Hopwood, 1988).

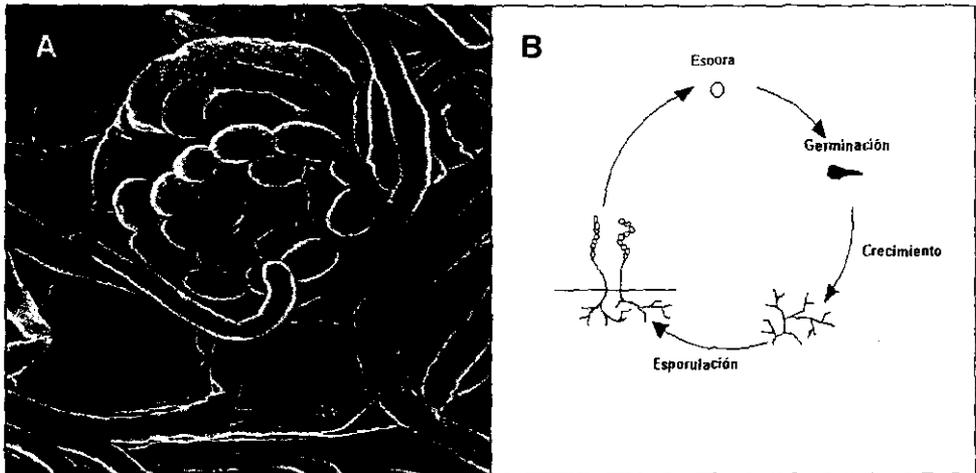


Fig. 2.1 (a) Micelio aéreo y esporas de *Streptomyces coelicolor* (Microscopia electrónica de barrido, Mark Buttner, Kim Findlay, John Innes Centre); (b) Ciclo de vida de los microorganismos del género *Streptomyces*.

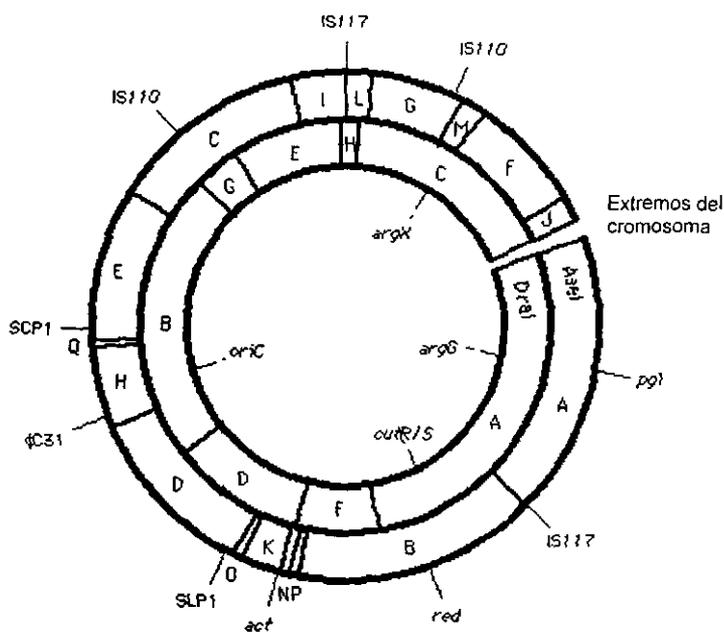


Fig 2.2 Mapa físico del cromosoma de *S. coelicolor*.

## 2.2 STREPTOMYCES PEUCETIUS VAR. CAESIUS

*S. peucetius* variedad *caesius*, obtenido por tratamiento mutagénico a partir de *Streptomyces peucetius*, el microorganismo productor de daunorrubicina, es la cepa productora de doxorrubicina (fig. 2.3), un antibiótico del grupo de las antraciclinas que posee una importante actividad antitumoral (Arcamone, *et al.*, 1969). El espectro bactericida de este antibiótico comprende principalmente bacterias Gram-positivas y sólo en algunos casos Gram-negativas (Vanek *et al.* 1977). Sin embargo, la importancia de este compuesto no radica en su uso como agente antimicrobiano, sino en la capacidad antineoplásica de amplio espectro que

posee (Arcamone, 1981). Actualmente, la doxorubicina, también conocida como adriamicina, es un agente antitumoral de origen microbiano que ha sido ampliamente utilizado en la clínica (Hershberger, 1989; Vandamme, 1984; Myers *et al.*, 1988; Arcamone *et al.*, 1998). Las antraciclinas pueden enlazarse específicamente con el ADN de doble cadena de las células cancerosas, intercalándose entre pares de bases adyacentes en la estructura de la doble hélice. Esto trae como consecuencia una inhibición de la síntesis de ADN y ARN (Di Marco *et al.*, 1975), y por lo tanto inhibición de la mitosis (Simpkins *et al.*, 1984; White and Stroshane, 1984; Tritton and Yee, 1982).

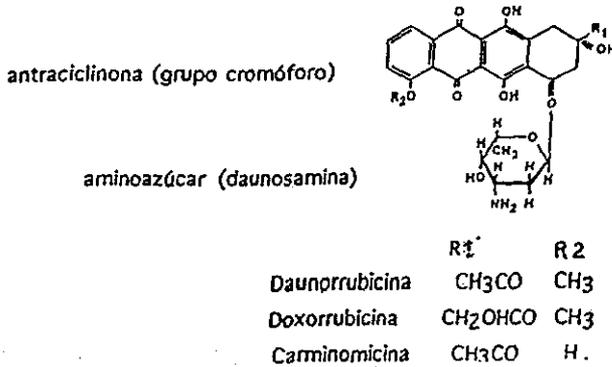


Fig. 2.3 Estructura de la doxorubicina y otras antraciclinas importantes.

*S. peucetius var. caesius* crece y produce antraciclinas en presencia de varias fuentes de carbono como glucosa, manosa, celobiosa, lactosa, fructosa, maltosa y almidón, siendo la glucosa la fuente de carbono más empleada en la producción de antibióticos (Dekleva *et al.*, 1985). Al igual que en otros microorganismos, en *S. peucetius var. caesius* el metabolismo primario y la síntesis de metabolitos secundarios están regulados por la presencia de algunas fuentes de carbono (Demain, 1989; Hodgson, 1982; Segura *et al.*, 1996), nitrógeno y fósforo (Dekleva *et al.*, 1985; Snell, 1997),

así como por diversos factores ambientales como la disponibilidad de oxígeno, la temperatura y el pH (Grein, 1987).

### **2.3 MECANISMOS DE REGULACIÓN METABÓLICA**

El crecimiento, o simplemente la supervivencia, de un organismo requiere un complejo grado de coordinación en sus actividades, que responda a los cambios en el medio ambiente. Todos los procesos fisiológicos están sujetos a alguna forma de regulación para asegurar niveles adecuados de cada metabolito y evitar gastos de energía innecesarios.

Los microorganismos pueden asimilar una amplia variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos, muchos de ellos de gran complejidad. Sin embargo, en presencia de sustratos más fácilmente asimilables, se evita el gasto de la energía empleada en sintetizar enzimas necesarias para el metabolismo de estos complejos nutrimentos.

Además del control de la incorporación de sustratos y de las vías del catabolismo celular, se requiere controlar la biosíntesis de macromoléculas y metabolitos secundarios.

La disponibilidad de metabolitos primarios precursores del metabolismo secundario puede ser un factor determinante en la producción de metabolitos secundarios. La fuente de carbono, nitrógeno y fósforo, así como algunos elementos traza como  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  repercuten directamente sobre la síntesis de estos metabolitos (Grein, 1987).

Las bacterias pueden utilizar una amplia variedad de compuestos como fuentes únicas de nitrógeno celular, que comprende desde compuestos inorgánicos como  $N_2$  y nitratos, hasta aminoácidos como histidina y arginina, o nucleósidos como la citidina. La fuente de nitrógeno más comúnmente usada por las bacterias entéricas es el amonio, siendo el glutamato el

principal producto de su asimilación y el precursor de glutamina, de diversos aminoácidos y de purinas y pirimidinas. En el género *Streptomyces*, la fuente de nitrógeno posee, en general, un efecto estimulador de la producción de antibióticos y metabolitos secundarios; sin embargo, se ha observado que los compuestos nitrogenados afectan la síntesis de antibióticos al nivel de metabolismo secundario mediante su disponibilidad como sustrato para las sintetisas de antibióticos, o a través de la modulación de la biosíntesis, actividad o estabilidad de las enzimas involucradas (Shapiro, 1989).

El fósforo es un elemento esencial en la célula. Está presente en ácidos nucleicos, fosfolípidos, nucleótidos, etc. El metabolismo del fosfato y de los compuestos fosforilados controla un sistema global que comprende diversos genes. Los niveles de nucleótidos reguladores como ATP, ADP, AMP, AMP cíclico, ppGpp, etc., están controlados por varios sistemas ligados al metabolismo energético, transporte de carbohidratos, metabolismo de fosfato, metabolismo de nitrógeno, etc. El fosfato afecta, también negativamente, la síntesis de antraciclinas. Se ha encontrado un efecto inhibitorio del fosfato sobre la síntesis de tilosina y estreptomina en *Streptomyces kitasatoensis* (Tanaka *et al.*, 1984). En *Streptomyces coeruleorubidus* el fosfato inhibe la síntesis de doxorubicina y en *S. peucetius* los niveles de fosfato inorgánico superiores a 10 mg/ml afectan negativamente la producción de antraciclinas (Dekleva *et al.*, 1985). Sin embargo, el mecanismo por el cual se lleva a cabo esta regulación por fosfatos aun no se conoce del todo.

Tanto en bacterias como en microorganismos eucariotes, los genes que codifican vías metabólicas alternas para fuentes de carbono como lactosa, glicerol o maltosa, son inducidos específicamente por sus respectivos sustratos. Sin embargo, si una fuente de carbono rápidamente

metabolizable, generalmente la glucosa, está presente en el medio, se reprime la síntesis de las enzimas catabólicas alternativas. Este mecanismo de regulación es llamado represión catabólica por fuente de carbono y su objetivo es evitar una producción superflua de metabolitos intermediarios comunes (Magasanik, 1961; Postma *et al.*, 1993; Saier *et al.*, 1996).

En la producción de antraciclinas por *S. peucetius* var. *caesius*, se emplea un medio que contiene glucosa como principal fuente de carbono (Arcamone *et al.*, 1969). Sin embargo, la glucosa en altas concentraciones afecta negativamente la síntesis de antraciclinas (incluida la doxorubicina). Dekleva y Strohl (1987) han observado resultados similares en *S. peucetius*. Ellos sugieren que este efecto se debe, no a un fenómeno de represión catabólica por glucosa, sino a un efecto inhibitor favorecido por la acidificación del medio como resultado de la producción de piruvato y diversos intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (Dekleva and Strohl, 1987). Más recientemente, se ha demostrado en *Streptomyces lividans* que la excreción de ácidos orgánicos producida por el metabolismo de glucosa es dependiente de la fuente de nitrógeno (Madden *et al.*, 1996). Las fuentes de nitrógeno como nitrato o aminoácidos favorecen la excreción de niveles elevados de piruvato y 2-oxoglutarato, respectivamente. Sin embargo, la adición de sales de amonio previene completamente la formación de ácidos orgánicos. En *S. peucetius* var. *caesius*, usando un medio químicamente definido con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fuente de nitrógeno y  $\text{CaCO}_3$  como amortiguador, el efecto negativo de la glucosa sobre la síntesis de antraciclinas fue aun evidente, sin detectar cambios significativos en el pH (Escalante *et al.*, 1999). Esto sugiere un efecto directo de la glucosa que afecta negativamente la biosíntesis de antibióticos.

### 2.3.1 REPRESIÓN CATABÓLICA POR FUENTE DE CARBONO

La represión catabólica (RC) puede definirse como la inhibición de la expresión genética y/o la actividad enzimática causada por la presencia, en el medio de cultivo, de fuentes de carbono que se metabolizan rápidamente (Wanner *et al.*, 1978; Postma *et al.*, 1993; Saier *et al.*, 1996). Este mecanismo de regulación se encuentra ampliamente distribuido entre los sistemas microbianos, donde se han encontrado complejos y diversos niveles de regulación por carbono.

La represión catabólica está mejor estudiada y entendida en las bacterias entéricas, donde el sistema de transporte de fosfotransferasa dependiente de fosfoenol piruvato (PTS de sus siglas en inglés) realiza un doble papel: 1) regula el transporte de sustratos (o la generación de inductores citoplásmicos) para las vías sensibles a RC; 2) modula la síntesis de AMP cíclico (AMPc) y 3) Inhibe alostéricamente la actividad de enzimas catabólicas (como la glicerol cinasa) (Postma *et al.*, 1993; Saier, 1989; Saier, 1993; Saier *et al.*, 1995). Los niveles intracelulares de AMPc activan la síntesis de muchas enzimas catabólicas sensibles a la represión. El AMPc se une a la proteína receptora de AMPc (CRP) y actúa sobre los promotores de cientos de genes sensibles a RC estimulando su transcripción (Botsford and Harman, 1992; Ishioka *et al.* 1993; Kolb *et al.*, 1993). Una pequeña enzima glucosa-específica IIA (IIA<sup>glc</sup>), constituyente del sistema PTS, parece ser el efector alostérico que controla dicho mecanismo al unirse en su forma desfosforilada a algunas permeasas de carbohidratos (por ejemplo permeasas simportadoras de lactosa-H<sup>+</sup>) o a la glicerol cinasa, enzimas que existen normalmente en su forma activa, para inhibir alostéricamente la actividad de estas proteínas. A su vez, la forma fosforilada de la enzima IIA<sup>glc</sup>

regula positivamente la actividad de la adenilato ciclasa resultando en un aumento de los niveles intracelulares de AMPc (Saier, 1989). Se han encontrado, sin embargo mecanismos adicionales de RC existentes también en bacterias entéricas (Ullmann and Danchin, 1983; Ullmann, 1985; Saier, 1991).

Dentro de las bacterias Gram-positivas, considerando especies de *Bacillus* y *Streptomyces*, se ha observado que el AMPc no interviene en el mecanismo de RC (Bostford and Harman, 1992; Hodgson, 1994; Hueck & Hillen, 1995; Saier *et al.*, 1995). En *Bacillus subtilis* se ha establecido la participación de al menos tres elementos importantes en dicho mecanismo de regulación: 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; Miwa *et al.*, 1997). Además, la producción de intermediarios metabólicos como fructosa 1,6-bisfosfato (FBP) o 6-fosfogluconato, resultado del metabolismo de las fuentes de carbono represoras, parecen inducir la activación de proteína-quinasas que regulan la actividad represora de la HPr, que al ser fosforilada se une y activa a la proteína CcpA formando un complejo represor (Reizer *et al.*, 1984). Este complejo formado por la proteína CcpA activada, podría retardar o bloquear la transcripción de diversos genes al unirse a los CRE presentes en las regiones reguladoras de los operones sensibles a represión y en conjunto con otras moléculas efectoras (Hueck & Hillen, 1995; Saier *et al.*, 1995).

### 2.3.2 REPRESIÓN CATABÓLICA EN *STREPTOMYCES*

En *Streptomyces*, la regulación de la utilización de la fuente de carbono es uno de los aspectos más importantes e interesantes de su biología. Del estudio de mutantes bloqueadas en el proceso de diferenciación, ha quedado claro que hay una conexión directa entre la represión catabólica por fuente de carbono, la activación de la biosíntesis de antibióticos y la diferenciación morfológica (Pope *et al.*, 1996). Diversas fuentes de carbono afectan la expresión de genes involucrados en el transporte (Hodgson, 1982) y en la 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).

Sin embargo, el mecanismo de represión catabólica por fuente de carbono en *Streptomyces* aun no se entiende completamente. Mientras que las proteínas I y HPr del sistema de transporte de fosfotransferasa dependiente de fosfoenol piruvato (PTS), así como el complejo enzimático específico para fructosa (enzima II), se han encontrado en algunos estreptomicetos (Titgemeyer *et al.*, 1995), los intentos para identificar dicho sistema de transporte en muchas otras especies de *Streptomyces* han sido en vano (Sabater *et al.*, 1972; Novotná and Hostálek, 1985). Esto, aunado a la ausencia de fluctuaciones en los niveles de AMPc con el cambio de fuente de carbono en *Streptomyces coelicolor* (Hodgson, 1994) y *Streptomyces venezuelae*, así como la ausencia de una cinasa que se encuentra presente en *B. subtilis*, capaz de fosforilar a la enzima HPr (Gersh *et al.*, 1980; Chatterjee and Vining, 1982), sugiere que el mecanismo de represión catabólica por fuente de carbono es considerablemente diferente al que

existe en *Escherichia coli* y en otras bacterias Gram-positivas de bajo contenido en GC como *B. subtilis* (Postma *et al.*, 1993; Postma *et al.*, 1996).

En *S. coelicolor*, el organismo mejor caracterizado de este género, la inactivación de la enzima glucosa cinasa dependiente de ATP (GlcK), codificada por el gen *glkA*, resulta en la incapacidad para utilizar glucosa y en una pérdida pleiotrópica de la sensibilidad a represión catabólica (Hodgson, 1982; Seno and Chater, 1983; Kwakman and Postma, 1994). Este tipo de mutantes resistentes a RC son capaces de crecer en presencia de lactosa y un análogo no metabolizable de la glucosa, la 2-desoxiglucosa (2-dog), además, son incapaces de utilizar glucosa como única fuente de carbono sin que el transporte de este carbohidrato parezca estar afectado (Hodgson, 1982).

La complementación de este tipo de mutantes con el gen que codifica para esta enzima, *glkA* (Ikeda *et al.*, 1984), restablece la sensibilidad a represión catabólica en las mutantes resistentes a 2-dog. Sin embargo, la complementación de mutantes *glkA* de *S. coelicolor* con un gen análogo de GlcK de *Zymomonas mobilis*, restablece la actividad de esta enzima pero no la sensibilidad a RC por glucosa (Angell *et al.*, 1994). Esto ha sugerido un importante papel de la enzima GlcK en el mecanismo de represión catabólica en el género *Streptomyces*. Por otro lado, la sobre-expresión del gen *glkA* en mutantes afectadas en dicho gen, no restablece la sensibilidad a represión catabólica por glucosa, y en cepas *glkA*<sup>+</sup> causa pérdida de la sensibilidad a este mecanismo de represión, lo cual sugiere que la fosforilación de glucosa por sí misma no es suficiente para que se lleve a cabo la represión catabólica por glucosa y que el gen *glkA* juega un papel regulador específico en este mecanismo de regulación metabólica en *S. coelicolor* (Angell *et al.*, 1994).

El gen *glkA* ha sido secuenciado y se ha demostrado que es transcrito por dos promotores, uno de ellos se encuentra adyacente al 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 20.1 kDa (*orf2*) y 33.1 kDa (*orf3*). 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 *S. coelicolor* resistentes a 2-dog. Además, para alcanzar los niveles de actividad de glucosa cinasa encontrados en la cepa silvestre, es necesaria la transcripción desde ambos promotores. Sin embargo, no se ha encontrado ninguna función o similitud del producto del *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 (Angell *et al.*, 1992).

Angell y colaboradores (1994) aislaron a partir de mutantes de *S. coelicolor* con una delección en el gen *glkA*, cepas capaces de utilizar glucosa y con niveles de Glk similares a los de la cepa original. El análisis de estas nuevas mutantes mostró que la recuperación de la actividad de Glk se debía a una segunda actividad de glucosa cinasa (Glk-II) que restablecía 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). La movilidad electroforética de esta nueva actividad de Glk encontrada, fue diferente a la presentada por la actividad de la cepa original, en un gel de actividad *in situ*.

Se ha pensado que el papel de la Glk en el mecanismo de represión catabólica por fuente de carbono es independiente de su actividad catalítica (capacidad para fosforilar glucosa a glucosa-6-fosfato), y que depende de

una propiedad represora adicional que le permita actuar sobre los operones sensibles a represión, afectando su transcripción. El análisis de la secuencia del producto del gen *glkA-orf3* muestra la existencia de extensas secuencias de aminoácidos similares a las encontradas en una familia de proteínas que incluye diversas glucosa-cinasas y proteínas represoras como la NagC de *E. coli* y la XylR de *B. subtilis* (Titgemeyer *et al.*, 1994). Sin embargo, a diferencia de estas proteínas represoras, la Glk carece de una extensión N-terminal que posee dominios de unión a ADN y que está presente en dichas proteínas represoras (Titgemeyer *et al.*, 1994).

Se han identificado secuencias reguladoras presentes en los operones de los genes *chi63* de *Streptomyces plicatus* (Delic *et al.*, 1992), *aml* de *Streptomyces 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. Dichas secuencias podrían representar secuencias reguladoras que actúen 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.

Otro dato que apoya la participación de la Glk en la RC consiste en que la sensibilidad a la RC ejercida por diversas fuentes de carbono como arabinosa, galactosa, citrato y glutamato, sobre la expresión de la glicerol cinasa y la agarasa se pierde en mutantes de *S. coelicolor* con deleciones en el gen *glkA*, aun cuando estas fuentes no sean metabolizadas vía glucosa cinasa (Kwakman & Postma, 1994). Además no sólo la presencia de deleciones en el gen *glkA*, sino también la sobre-expresión de este gen en *S. coelicolor*, muestran un efecto derregulador sobre el mecanismo de represión ejercido por varias fuentes de carbono (Angell *et al.*, 1994; Kwakman & Postma, 1994).

Como hemos visto hasta aquí, se tienen evidencias que sugieren un papel determinante de la Glk en el mecanismo de represión catabólica, independiente de su actividad catalítica. Sin embargo, 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.

Ingram y colaboradores (1995) aislaron y caracterizaron una mutante de *S. coelicolor*, *ccrA1*, afectada en la expresión de diversos promotores regulados catabólicamente. Estas mutantes se caracterizan por una alteración en la transcripción de los promotores *galP1*, *gyl* y *chi63* sensibles a glucosa. Sin embargo, esta mutación no tiene efecto sobre la expresión del promotor *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. Esta mutación se localiza cercana al locus *argA* y es distinta de otras mutaciones 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). Estos resultados sugieren que la mutación *ccrA1* afecta un gen cuyo producto puede estar involucrado en el mecanismo general de regulación por represión catabólica en *Streptomyces*.

En *Streptomyces lividans* se ha identificado un gen regulador, *reg1*, que codifica para una proteína de 345 aminoácidos (Reg1). Esta proteína contiene motivos de hélice-vuelta-hélice de unión a ADN en la región N-terminal y, al igual que la proteína MalR (el represor de *malE*, un gen involucrado en el transporte y utilización de maltosa) de *S. coelicolor* A3(2), pertenece a la familia de proteína reguladoras LacI/GalR (Nguyen *et al.*, 1997; Wezel *et al.*, 1997). Las mutantes *reg1* de *S. lividans* están afectadas

en la expresión de diversos genes. La producción de  $\alpha$ -amilasas y la producción de quitinasa se encuentran liberadas de la represión catabólica por glucosa, sugiriendo que *reg1* pudiera ser un regulador pleiotrópico en este microorganismo (Nguyen *et al.*, 1997). Por otro lado, las mutantes *malR* de *S. coelicolor* se caracterizan por una transcripción constitutiva e insensible a glucosa del gen *malE* a un nivel considerablemente superior al observado en la cepa silvestre. La proteína MalR parece ser un regulador de la inducción por sustrato y de la represión por glucosa en el metabolismo de maltosa (Wezel *et al.*, 1997).

Aunque el mecanismo por el cual se lleva a cabo la represión catabólica por fuente de carbono en el género *Streptomyces* aun no es claro, se ha propuesto que la enzima Gik pudiera tener una actividad represora independiente de su actividad catalítica, que le permitiera regular la transcripción de los múltiples operones sensibles a represión. Sin embargo, es evidente que existen otros factores, como las proteínas reguladoras Reg1, MalR y CcrA1, que interviene en este mecanismo. Adicionalmente, podrían participar diversos intermediarios producto del metabolismo de las fuentes de carbono represoras, como por ejemplo, los intermediarios de la glucólisis: glucosa, glucosa-6-fosfato, fructosa-1,6-difosfato; o bien, nucleótidos de importancia en el mantenimiento y balance de los niveles de energía celular, como ATP, ADP, etc., ya que uno de los papeles de la represión catabólica es mantener los niveles adecuados de energía en la célula.

## **2.4 TRANSPORTE DE CARBOHIDRATOS**

El sistema de transporte de carbohidratos más importante dentro de las bacterias entéricas y algunas bacterias Gram-positivas, es el sistema de transporte de fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS). Más

de 20 carbohidratos diferentes son transportados vía PTS, sistema que usa fosfoenolpiruvato (PEP) como donador del grupo fosfato en una cadena de transferencia de fosfato que involucra dos proteínas principales, la enzima I y la HPr, así como un complejo proteico asociado a membrana específico para cada carbohidrato, el complejo II. Dentro del complejo II, la permeasa IIC cataliza la traslocación del carbohidrato al citoplasma con una fosforilación concomitante (Saier and Reizer, 1992; Postma *et al.*, 1993).

Se sabe que el PTS, además de participar en el transporte de carbohidratos, interviene en la quimiotaxis y en diversos mecanismos de regulación del metabolismo bacteriano (Reizer *et al.*, 1988; Tigemeyer, 1993). Este sistema de transporte regula la actividad de otros tipos de permeasas para carbohidratos como simportadores de azúcar- $H^+$ , simportadores de azúcar- $Na^+$  y transportadores activos dependientes de ATP. La regulación unidireccional permite a las bacterias utilizar a los carbohidratos substratos del PTS preferentemente sobre los carbohidratos transportados por otros sistemas (Saier *et al.*, 1995).

Varios tipos de regulación como la represión catabólica, la exclusión y la expulsión del inductor se han descrito y caracterizado tanto en bacterias entéricas (Saier, 1989; 1993) como en bacterias Gram-positivas de bajo contenido en GC (Reizer *et al.*, 1993; Ye *et al.*, 1994). En las bacterias entéricas Gram-negativas, la represión catabólica y los niveles citoplásmicos de los carbohidratos inductores están regulados por el estado de fosforilación de la proteína IIA<sup>gic</sup> del PTS (Saier, 1989; Saier and Reizer, 1992). A diferencia de estos microorganismos, en las bacterias Gram-positivas de bajo contenido en GC, una proteína-cinasa dependiente de ATP que fosforila la

enzima HPr del PTS, está involucrada en la regulación por fuente de carbono (Ye *et al.*, 1994).

Los microorganismos del género *Streptomyces* son capaces de utilizar una gran variedad de carbohidratos como fuente de carbono, sin embargo, el conocimiento acerca de las vías de asimilación de carbohidratos y su regulación aun es limitado. Se ha documentado la existencia de sistemas de transporte inducibles o constitutivos de diversos carbohidratos (Sabater *et al.*, 1972; Sabater and Asensio, 1973; Hodgson, 1982; Ramos, 1998). En *S. coelicolor*, *S. lividans* y *Streptomyces griseofuscus* se han identificado dos proteínas del PTS, la enzima I y la HPr, así como un complejo II específico para fructosa (Titgemeyer *et al.*, 1995). A pesar de ello, dicho sistema de transporte de carbohidratos parece no estar presente en muchas otras especies de *Streptomyces* (Sabater *et al.*, 1972; Novotná and Hostálek, 1985). Además, los *Streptomyces* capaces de utilizar glucosa, fructosa y manosa, muestran actividades de glucocinasa, fructocinasa y manocinasa (Ikeda *et al.*, 1984; Angell *et al.*, 1992), sugiriendo que los sistemas de transporte para estos carbohidratos no son del tipo PTS. Por otra parte, la incorporación de celobiosa y xilobiosa en *S. lividans* parece estar mediada por una proteína dependiente de ATP (Hurtubise *et al.*, 1995).

El transporte de carbohidratos, a su vez, parece estar regulado por represión catabólica por fuente de carbono. Hodgson (1982) demostró que en *S. coelicolor* los sistemas de transporte para arabinosa, galactosa y fructosa son reprimidos por glucosa a nivel transcripcional. Adicionalmente, la glucosa es capaz de reprimir la síntesis de las enzimas involucradas en el metabolismo de galactosa y fructosa en este microorganismo (Hodgson, 1982). El efecto represor de la glucosa sobre la incorporación de

carbohidratos, parece no llevarse a cabo en mutantes de *S. coelicolor* resistentes a 2-dog.

Es importante mencionar que a diferencia de *S. colicolor*, donde se ha informado que el sistema de transporte de glucosa es constitutivo, mientras que los sistemas para arabinosa, galactosa y fructosa son inducibles (Hodgson, 1982), en *S. peucetius* var. *caesius* la presencia de glucosa en el medio parece ser también necesaria para la expresión del sistema de transporte de este carbohidrato (Ramos, 1998).

## 2.5 ANTECEDENTES EN *STREPTOMYCES PEUCETIUS* VAR. *CAESIUS*

La producción de doxorrubicina y la asimilación de diversas fuentes de carbono por *S. peucetius* var. *caesius* se encuentran sujetas a represión catabólica (Segura *et al.*, 1996). Se han aislado mutantes de este microorganismo, capaces de crecer en lactosa y en presencia de un análogo de glucosa, la 2-desoxiglucosa (2-dog), que muestran insensibilidad a represión por carbono. La síntesis de  $\beta$ -galactosidasa, D-xilosa isomerasa y la producción de antraciclinas totales resultaron ser insensibles al efecto negativo de la glucosa en estas mutantes. Además, la actividad de la enzima glucosa cinasa (Glc) se encuentra afectada, es de solo entre el 19 y 30% de la actividad encontrada en la cepa original (Segura *et al.*, 1996).

Las mutantes 2-dog<sup>R</sup> también se caracterizan por ser insensibles a la represión catabólica ejercida por otras fuentes de carbono, tales como galactosa, arabinosa y glutamato, fuentes de carbono no metabolizadas vía Glc. Esto ha sugerido, la existencia de algún tipo de relación entre la actividad de Glc y la sensibilidad a la represión por carbono, como en otras

especies de *Streptomyces* (Segura *et al.*, 1996). Sin embargo, a diferencia de los resultados obtenidos por Hodgson (1982), la incorporación de diversos carbohidratos se encuentra afectada negativamente en al menos una de estas mutantes (la 2-dog<sup>R</sup>-21) (Ramos, 1998).

Ya que la sensibilidad a 2-dog se ha visto directamente relacionada con la actividad de Glk (Angell *et al.*, 1994), el aislamiento de cepas, a partir de alguna mutante 2-dog<sup>R</sup>, que recuperen la sensibilidad a este análogo de la glucosa, podría significar la obtención de cepas que hayan restablecido, al menos parcialmente, la actividad de dicha enzima. El análisis del fenotipo de sensibilidad a represión catabólica presentado por estas nuevas mutantes, podría contribuir a determinar si la Glk posee o no un papel determinante en este mecanismo de control en esta especie de *Streptomyces*, y si el restablecimiento de esta actividad permite la recuperación de la capacidad para incorporar glucosa en niveles similares a los observados en la cepa original.

### **3. OBJETIVO**

Contribuir al avance en el estudio de las bases bioquímicas del mecanismo de represión catabólica por fuente de carbono en *Streptomyces peucetius* var. *caesius*

## **4 . ESTRATEGIA**

- A partir de la mutante 2-dog<sup>R</sup>-21 de *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, aislar cepas sensibles a 2-dog y caracterizar su fenotipo.
  - Medir la actividad de glucosa cinasa (Glc) en la cepas aisladas.
  - Determinar la sensibilidad del metabolismo primario (utilización de lactosa) y secundario (síntesis de antraciclinas) a la represión catabólica por glucosa y galactosa.
  - Medir la incorporación de glucosa en las cepas aisladas.
- Determinar el efecto de glucosa sobre el sistema de incorporación de una fuente de carbono alternativa (galactosa).

# **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 MICROORGANISMOS

La cepa original utilizada en este trabajo fue *S. peuceitius* variedad *caesius* ATCC 27952 perteneciente a la colección de cultivos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Para el aislamiento de las cepas sensibles a 2-dog se utilizó una cepa resistente a represión catabólica por glucosa, llamada 2-dog<sup>R</sup>-21, aislada anteriormente en el laboratorio por Daniel Segura de acuerdo con lo informado para *S. coelicolor* (Hodgson, 1982) por su capacidad para crecer en lactosa en presencia de un análogo no metabolizable de glucosa, la 2-desoxiglucosa (2-dog). Las cepas se mantuvieron viables como micelio fragmentado, en una suspensión en glicerol al 40% a -20°C.

### 5.2 ESTRATEGIA PARA LA OBTENCIÓN DE CEPAS 2-DOG<sup>S</sup> A PARTIR DE LA MUTANTE 2-DOG<sup>R</sup>-21.

Para la obtención de las cepas sensibles a 2-desoxiglucosa (2-dog), se utilizó una mutante (2-dog<sup>R</sup>-21) resistente a este análogo de la glucosa e insensible a represión catabólica por fuente de carbono, cuya actividad de glucosa cinasa se encuentra afectada (presenta 15% de la actividad encontrada en la cepa original).

El aislamiento de colonias 2-dog<sup>S</sup> se realizó por un método de enriquecimiento con ampicilina, para lo cual se cultivó a la mutante 2-dog<sup>R</sup>-21 en medio mínimo adicionado con lactosa 20 mM durante 36 h a 29°C y 180 rpm. La composición del medio mínimo (MM) fue la siguiente: NaCl 0.5%,

$K_2HPO_4$  0.03%,  $(NH_4)_2SO_4$  0.133%,  $CaCO_3$  0.3%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  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%, agua destilada, pH ajustado a 7.2. Después de lavar las células 2 veces por centrifugación con solución salina isotónica, se incubaron a 29°C y 180 rpm, 24 h más, en medio mínimo sin fuente de nitrógeno, adicionado con lactosa 20 mM, para agotar sus reservas. Las células así tratadas se lavaron y se cultivaron en medio mínimo completo (con fuente de nitrógeno) en presencia de lactosa 20 mM y 2-dog 10 mM a 29°C y 180 rpm. Después de 8 h de incubación se adicionó una solución de ampicilina (500  $\mu$ g/ml) y se incubó durante 8 h más, de manera que sólo aquellas células incapaces de crecer en presencia del análogo de la glucosa no serían afectadas por el antibiótico. Este procedimiento se repitió dos veces desde el inicio y finalmente las células se lavaron y se cultivaron en placas de agar de medio YMG que contenía extracto de levadura 0.4%, extracto de malta 1.0%, glucosa 0.4%, agar 1.5% y agua destilada, pH ajustado a 7.2. Se confirmó la sensibilidad a 2-dog de las mutantes obtenidas, utilizando placas de agar de medio mínimo adicionado con lactosa 20 mM y 2-dog 10 mM. Mediante este procedimiento se aislaron 8 mutantes espontáneas que recuperaron la sensibilidad al análogo de la glucosa.

Se probó, de manera cualitativa, la sensibilidad de las cepas aisladas a represión catabólica por glucosa sobre la producción de antraciclinas totales. Con este fin se cultivaron las cepas en placas de agar YM (extracto de levadura 0.3%, extracto de malta 0.3%) adicionado con glucosa 100 mM y 300 mM. Las antraciclinas producidas por el microorganismo poseen una coloración anaranjada rojiza, de manera que aquellas colonias insensibles a represión catabólica por glucosa, mostrarían este color al crecer tanto en concentraciones bajas de glucosa (100 mM), como en concentraciones

represoras (330 mM), mientras que aquellas que hubieran perdido su insensibilidad a represión catabólica, solo serían capaces de producir antraciclinas y, por tanto, de desarrollar una coloración roja intensa, en concentraciones no represoras del carbohidrato. Así, de manera preliminar se encontró que 2 de las 8 cepas aisladas conservaron la insensibilidad a represión por glucosa (cepas 2-dog<sup>S</sup>-2 y 2-dog<sup>S</sup>-11), mientras que las 6 restantes recuperaron dicha sensibilidad. Estos resultados fueron comprobados cuantitativamente. Las 2 cepas insensibles y una de las 6 cepas sensibles a represión catabólica, elegida al azar (2-dog<sup>S</sup>-53), se emplearon en las determinaciones siguientes, usando como controles a la cepa original de *S. peuceitius* var. *caesius* y a la cepa padre 2-dog<sup>R</sup>-21.

### 5.3 MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.

**5.3.1 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 o con 0.5 ml de una suspensión de micelio en glicerol al 40%, y se incubaron durante 72 h a 29°C con agitación de 200 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.

**5.3.2 CULTIVOS.** Para determinar la sensibilidad a represión catabólica por glucosa y galactosa de las cepas analizadas, se cultivó cada cepa en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 5 perlas de vidrio de 5 mm y 50 ml de medio YM (extracto de levadura 0.3%, extracto de malta 0.3%) adicionado con lactosa 20 mM y la fuente de carbono represora (glucosa o galactosa) en concentración baja (100 mM) y concentración represora (330 mM). Se tomaron muestras de 4 ml a las 24 y 48 horas después de incubar a 29°C y 200 rpm, para determinar actividad de  $\beta$ -galactosidasa y producción de antraciclinas totales.

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 UM (uptake medium) (Escalante *et al.*, 1999) suplementado con extracto de levadura (0.3%) y la fuente de carbono correspondiente: glucosa 100 mM, galactosa 100 mM o galactosa 100 mM más glucosa 330 mM. La composición del UM 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 200 rpm.

**5.3.3 OBTENCIÓN DE EXTRACTO ENZIMÁTICO LIBRE DE CÉLULAS.** Para la obtención del extracto enzimático de cada una de las cepas analizadas, 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 glucosa 100 mM, 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. Con el micelio contenido en cada 50 ml de los 500 ml totales, se prepararon polvos de acetona filtrando el micelio al vacío y agregando 25 ml de acetona. Los filtros con el micelio desecado con acetona se conservaron a -20°C. Para la obtención del extracto enzimático, los polvos de acetona contenidos en un filtro se trituraron en un mortero con hielo seco para romper las células. Se resuspendió el micelio triturado en 3 ml de amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7, frío. Se colocó en tubos de ultracentrífuga y 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.

## **5.4 MÉTODOS ANALÍTICOS**

**5.4.1 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 200 rpm, durante 48 h.

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 5.1. La reacción se inició con el extracto enzimático y se leyó la absorbencia 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) <sup>1</sup>
1. Blanco *	-	1950	-	-	50
2. Blanco de reactivo*	1.746	200	-	4	50
3. Cepa original	1.746	-	200	4	50
4. Mutante 2-dog <sup>R</sup> -21	1.746	-	200	4	50
5. Mutante 2-dog <sup>S</sup> -2	1.746	-	200	4	50
6. Mutante 2-dog <sup>S</sup> -11	1.746	-	200	4	50
7. Mutante 2-dog <sup>S</sup> -53	1.746	-	200	4	50

Tabla 5.1. 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. <sup>1</sup>Extracto enzimático de la cepa correspondiente.

**5.4.2 ZIMOGRAMA DE LA ACTIVIDAD DE GLUCOSA CINASA.** Los extractos enzimáticos de las cepas analizadas (cepa original, mutantes 2-dog<sup>R</sup>-21, 2-dog<sup>S</sup>-2, 2-dog<sup>S</sup>-11 y 2-dog<sup>S</sup>-53) se sometieron a electroforesis a 4°C en un gel de poliacrilamida al 10% (w/v), usando un buffer Tris-glicina (pH 9.3). Para evitar la inactivación de las enzimas por TEMED o persulfato de amonio, el gel se corrió 1 h antes de que las muestras se cargaran. La glucosa cinasa se localizó en el gel usando un sistema de revelado basado en la formación de formazán por la reducción de metil-tiazolil-tetrazolium (MTT) (Harris and Hopkinson, 1976). El gel se lavó con amortiguador Tris 50 mM pH 7.2 antes de revelar la actividad para evitar inhibir la mezcla de revelado por el buffer alcalino de corrimiento. La mezcla de reacción (10 ml) se aplicó al gel de electroforesis, como un gel de agarosa al 0.8%, que contenía Tris 100 mM pH 7.5, glucosa 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 25 mM, NADP 0.5 mM, ATP 1 mM, MTT 0.17 mg/ml, fenozin meto-sulfato 0.08 mg/ml y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 0.5 U/ml. Las bandas fueron visibles después de 10 a 20 minutos de incubación a 42°C en la oscuridad.

**5.4.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE  $\beta$ -GALACTOSIDASA.** La actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa se determinó espectrofotométricamente usando o-nitrofenil- $\beta$ -galactopiranosido (ONPG) como sustrato (Eckardt *et al.*, 1987), correspondiendo cada unidad de actividad enzimática a 1 nmol de ONPG hidrolizado a 37°C por minuto por mg de proteína del cultivo. Las muestras de 1 ml se centrifugaron a 7,000 rpm durante 10 min para separar el micelio, el cual se lavó con 1 ml de amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M pH 7.5 y se resuspendió en 1 ml de este mismo amortiguador. Se añadieron 20  $\mu$ l de  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  0.1 M en  $\beta$ -mercaptoetanol 4.5 M y 40  $\mu$ l de tolueno. La mezcla se agitó y se preincubó durante 5 minutos a 37°C con agitación periódica. La reacción se inició añadiendo 400  $\mu$ l de ONPG 4 mg/ml y se tomaron muestras de 0.5 ml a distintos tiempos. La reacción se detuvo añadiendo 0.5 ml de  $Na_2CO_3$  1 M al sistema de reacción. El producto generado de la hidrólisis del ONPG se cuantificó a 420 nm, ajustando el aparato con amortiguador de fosfatos.

**5.4.4 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ANTRACICLINAS TOTALES.** Para la cuantificación de la concentración de antraciclina intracelulares se tomaron muestras de 1 ml, se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min. Y se realizaron extracciones añadiendo al micelio 1 ml de una mezcla de acetona:  $H_2SO_4$  0.1 N (4:1), agitando 20 a 30 segundos y centrifugando. Este procedimiento de extracción se repitió hasta que en la acetona acidulada resultante no se detectó color. Las antraciclina extraídas se cuantificaron espectrofotométricamente midiendo la absorbencia a 495 nm y calculando su concentración con la ecuación de Lambert-Beer usando un coeficiente de extinción de 220 (1%, 1 cm) (Dekleva *et al.*, 1985).

**5.4.5 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  $\mu$ l del extracto enzimático, se colocaron en un tubo Eppendorf y se añadieron 100  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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  $\mu$ 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 absorbencia se leyó 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  $\mu$ 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)

**5.4.6 TRANSPORTE DE LAS FUENTES DE CARBONO REPRESORAS.** Se determinó la incorporación de glucosa en la cepa original de *S. peucetius* var. *caesius*, en la mutante 2-dog<sup>R</sup>-21 y en 3 de las 11 cepas 2-dog<sup>S</sup> obtenidas. Para determinar el efecto de la glucosa sobre el sistema de transporte de galactosa, se determinó la incorporación de este último carbohidrato en la cepa original de *S. peucetius* var. *caesius* en diferentes condiciones.

De cada cepa se recolectó la biomasa obtenida en 500 ml de medio UM adicionado con la fuente de carbono en matraces Fernbach, después de haberlo incubado durante 36 h a 29°C con agitación de 200 rpm. El micelio se lavó dos veces con solución salina isotónica (NaCl 0.85 %) y se eliminó el exceso de líquido sobre un papel filtro. Se pesaron y resuspendieron 250 mg (peso húmedo) del micelio de cada cepa y/o condición de crecimiento, 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 <sup>14</sup>C y 475 µl de la fuente de carbono no radioactiva 10 mM como acarreador. Las actividades específicas de las fuentes de carbono marcadas se muestran en la Tabla 5.2. 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 µm 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 frascos 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.

Fuente de carbono	Actividad específica (mCi/mmol)	Actividad ajustada (μCi/mmol)
D-[U- <sup>14</sup> C]glucosa	297	1.049
D-[1- <sup>14</sup> C]galactosa	56.50	521.458

Tabla 5.2 Actividad específica y actividad ajustada de las fuentes de carbono marcadas radioactivamente, empleadas en la determinación del transporte.

Para determinar el efecto de la glucosa sobre el transporte de galactosa, se cultivaron la cepa original y la mutante 2-dog<sup>R</sup>-21 en diferentes condiciones como se muestra en la tabla 5.3, y se cuantificó la incorporación de galactosa en ausencia y presencia de glucosa. Al cultivar el microorganismo en presencia de glucosa 100 mM, se tienen condiciones no represoras, mientras que con una concentración de glucosa 330 mM o mayor, se ha observado represión de la síntesis de diversas enzimas (Segura *et al.*, 1996).

Crecimiento en UM adicionado con:	Fuente de carbono incorporada	Observaciones
Galactosa 100 mM	Galactosa	Control positivo (sistema inducido)
Galactosa 100 mM	Galactosa en presencia de glucosa (1:1)	Efecto inhibitor de glucosa
Glucosa 100 mM	Galactosa	Control negativo (sistema no inducido)
Galactosa 100 mM + glucosa 300 mM	Galactosa	Efecto represor de glucosa

Tabla 5.3 Condiciones para la determinación del efecto de glucosa sobre el sistema de transporte de galactosa en la cepa original y en la mutante 2-dog<sup>R</sup>-21 de *S. peuceitius* var. *caesius*.

**5.4.7 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, hasta obtener peso constante (aproximadamente 14 h).*

## **6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 AISLAMIENTO DE CEPAS 2-DOG<sup>S</sup> A PARTIR DE UNA MUTANTE 2-DOG<sup>R</sup> RESISTENTE A REPRESIÓN CATABÓLICA.

La glucosa cinasa (Glc) se ha señalado como un factor esencial en la utilización de glucosa y en el mecanismo de represión catabólica (RC) por fuente de carbono en el género *Streptomyces* (Hodgson, 1982, Seno & Chater, 1983, Angell *et al.*, 1992, Angell *et al.*, 1994, Kwakman & Postma, 1994, Segura *et al.*, 1996). Más aún, la sensibilidad al análogo no metabolizable de la glucosa, la 2-dog, se ha visto directamente relacionada con la presencia de Glc en este género (Angell *et al.*, 1994). Con el objeto de examinar la posible relación entre la resistencia a 2-dog, la actividad de Glc y la sensibilidad a represión catabólica en *S. peucetius* var. *caesius*, se empleó un método de enriquecimiento con ampicilina para aislar, a partir de una mutante resistente a 2-dog (2-dog<sup>R</sup>) con bajos niveles de Glc e insensible a represión catabólica por carbono, cepas que hubieran recuperado su sensibilidad al análogo de la glucosa. Bajo estas condiciones se aislaron 8 mutantes espontáneas incapaces de crecer en medio mínimo completo suplementado con lactosa 20 mM y en presencia de 2-dog 10 mM.

El efecto de glucosa sobre la síntesis de antraciclinas totales en las cepas aisladas, se determinó de manera cualitativa en placas de agar con medio sólido. De manera preliminar, se encontró que 2 de las 8 cepas conservaban la insensibilidad a RC por glucosa (cepas 2-dog<sup>S</sup>-2 y 2-dog<sup>S</sup>-11), mientras que el resto resultó ser sensible a este mecanismo de regulación. Las dos cepas resistentes y una de las 6 cepas sensibles a RC, elegida al azar (2-dog<sup>S</sup>-53), fueron evaluadas por su actividad y movilidad electroforética de Glc, por su habilidad para transportar glucosa y por su

sensibilidad a represión catabólica. Estos resultados se analizaron comparándolos con los obtenidos para la cepa original (o silvestre) y para la mutante que dio origen a estas nuevas cepas 2-dog<sup>S</sup> (la mutante 2-dog<sup>R</sup>-21). Las características de estas cepas se resumen en la tabla 6.1.

CEPA	DESCRIPCIÓN
Original	Cepa original de <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i> ATCC27952. Sensible a 2-dog, sensible a represión catabólica por fuente de carbono.
2-dog <sup>R</sup> -21	Mutante aislada a partir de la cepa original por su capacidad para crecer en presencia de lactosa y 2-dog. Resistente a 2-dog, resistente a represión catabólica por fuente de carbono y con bajos niveles de actividad de Glk (14% de la actividad encontrada en la cepa original).
2-dog <sup>S</sup>	Cepas aisladas en el presente trabajo a partir de la mutante 2-dog <sup>R</sup> -21, por recuperación de su sensibilidad a 2-dog.

Tabla 6.1 Características de las cepas progenitoras.

## 6.2 SENSIBILIDAD A REPRESIÓN CATABÓLICA POR CARBONO

Con el objeto de examinar la sensibilidad a glucosa en las cepas aisladas, se probó el efecto de este carbohidrato sobre la expresión de la enzima  $\beta$ -galactosidasa y la biosíntesis de antraciclinas totales, tomando como controles a la cepa original (sensible a represión catabólica) y a la cepa 2-dog<sup>R</sup>-21 (insensible a represión catabólica).

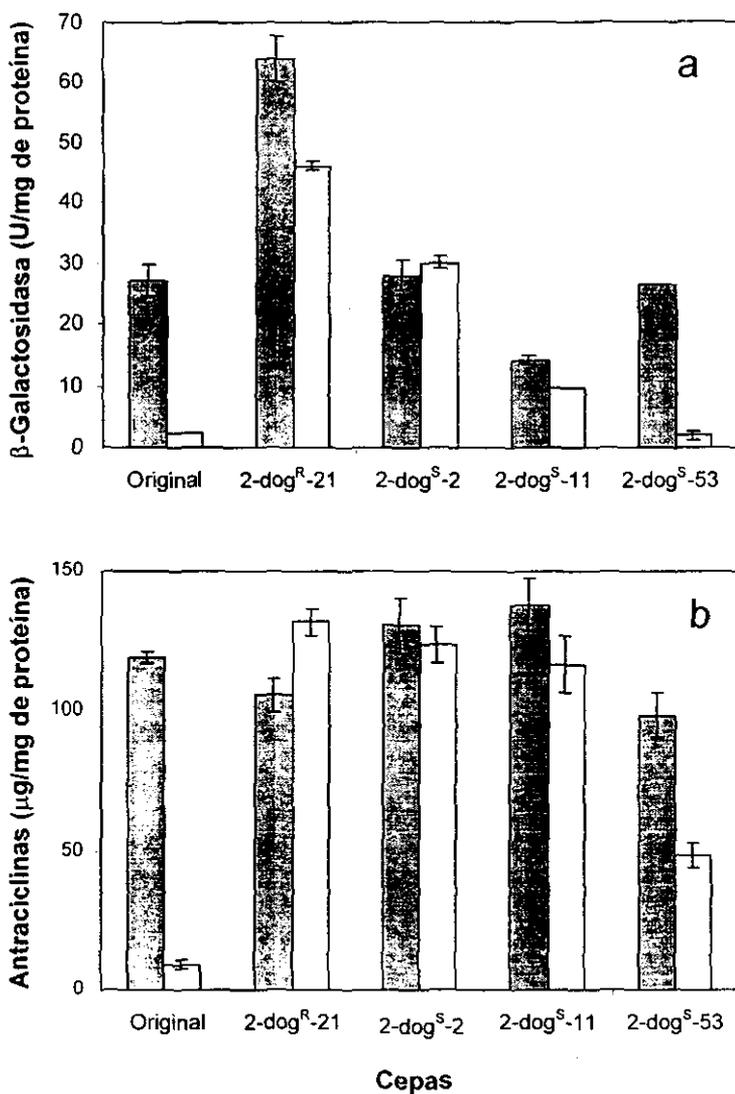


Fig. 6.1 Efecto de glucosa sobre la producción específica de  $\beta$ -galactosidasa (a) y antraciclina total (b), por la cepa original y las mutantes 2-dog<sup>R</sup>-21, 2-dog<sup>S</sup>-2, 2-dog<sup>S</sup>-11 y 2-dog<sup>S</sup>-53 de *S. peuceitius* var. *caesius* a las 48 h de crecimiento. Las cepas se cultivaron en medio YM adicionado con lactosa 20 mM y glucosa 100 (▨) ó 330 (□) mM.

Como se puede observar en las figuras 6.1a y 6.1b, la cepa original de *S. peucetius* var. *caesius* mostró una disminución considerable en la síntesis de  $\beta$ -galactosidasa y de antraciclinas totales en presencia de concentraciones altas de glucosa (330 mM), mientras que la mutante 2-dog<sup>R</sup>-21 fue insensible a esta condición de represión para los dos parámetros determinados. El efecto de altas concentraciones de glucosa varió entre las diferentes cepas sensibles a 2-dog aisladas. Comparadas con la cepa original, donde la glucosa reprimió más del 90% de la producción de la  $\beta$ -galactosidasa y las antraciclinas, las cepas 2-dog<sup>S</sup>-2 y 2-dog<sup>S</sup>-11 mostraron insensibilidad a la represión ejercida por dicho carbohidrato. En contraste con estos resultados, en la cepa 2-dog<sup>S</sup>-53 la síntesis de  $\beta$ -galactosidasa mostró una sensibilidad alta a glucosa (93%), mientras que la producción de antibióticos fue afectada parcialmente (50%) en presencia de concentraciones altas del carbohidrato.

Además de la glucosa, existen otras fuentes de carbono que reprimen tanto el metabolismo primario como el metabolismo secundario en diversas especies de *Streptomyces*. Mutantes afectadas en la actividad de Gik muestran una pérdida de la sensibilidad a la represión catabólica ejercida no sólo por glucosa, sino también por galactosa, arabinosa, citrato y glutamato (Kwakman & Postma, 1994; Segura et al., 1996). Por esta razón se decidió analizar el efecto de galactosa sobre los dos parámetros estudiados (síntesis de  $\beta$ -galactosidasa y producción de antraciclinas totales) en las cepas sensibles a 2-dog aisladas.

Los resultados obtenidos de este experimento se muestran en las figuras 6.2a y 6.2b, donde podemos observar un comportamiento similar al presentado por las mutantes en presencia glucosa, es decir, mientras que la producción de  $\beta$ -galactosidasa y de antraciclinas se ven poco afectadas en las mutantes 2-dog<sup>S</sup>-2 y 2-dog<sup>S</sup>-11, la galactosa, en altas concentraciones,

reprime fuertemente la síntesis de  $\beta$ -galactosidasa y al menos parcialmente la producción de los antibióticos en la cepa 2-dog<sup>S</sup>-53.

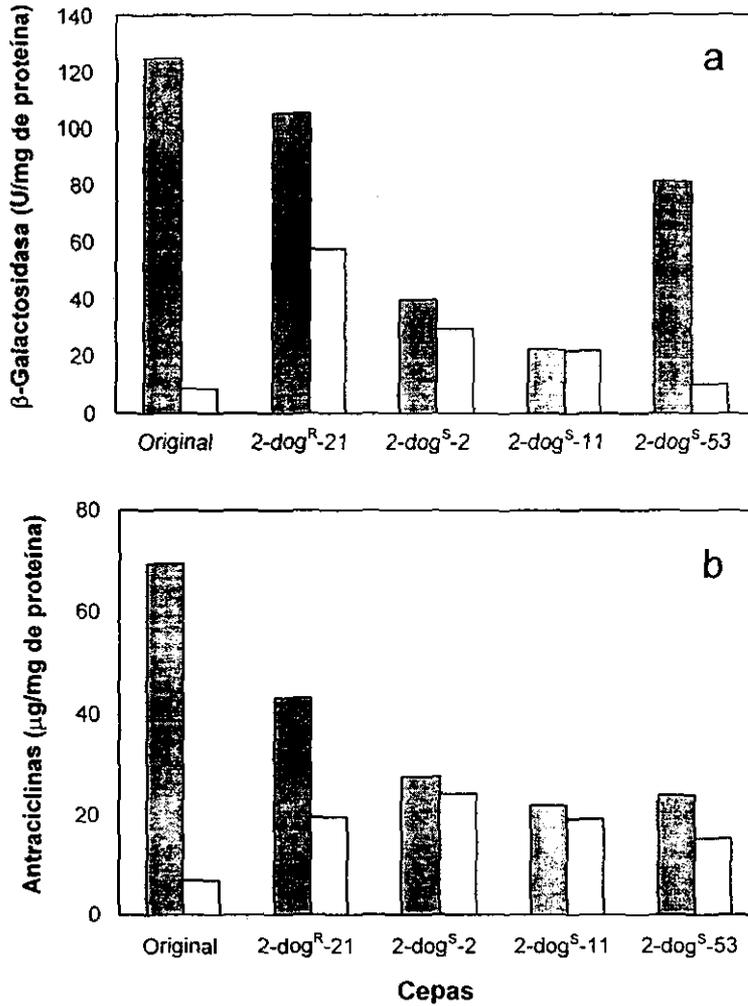


Fig. 6.2 Efecto de galactosa sobre la producción específica de  $\beta$ -galactosidasa (a) y antraciclinas totales (b), por la cepa original y las mutantes 2-dog<sup>R</sup>-21, 2-dog<sup>S</sup>-2, 2-dog<sup>S</sup>-11 y 2-dog<sup>S</sup>-53 de *S. peucetius* var. *caesius* a las 48 h de crecimiento. Las cepas se cultivaron en medio YM adicionado con lactosa 20 mM y galactosa 100 (▨) ó 330 (□) mM. Estas gráficas contienen datos obtenidos de un experimento representativo realizado por duplicado.

### 6.3 ACTIVIDAD DE GLUCOSA CINASA

Con el objeto de explicar las diferencias en sensibilidad a represión catabólica entre las cepas 2-dog<sup>S</sup> aisladas, y basados en la relación directa entre la actividad de glucosa cinasa (Glc) y la sensibilidad a 2-dog que se ha observado en otras especies de *Streptomyces*, se cuantificó la actividad de la enzima Glc buscando una posible correlación entre los niveles de actividad de dicha enzima y el fenotipo de resistencia o sensibilidad a represión catabólica por carbono presentado por cada cepa.

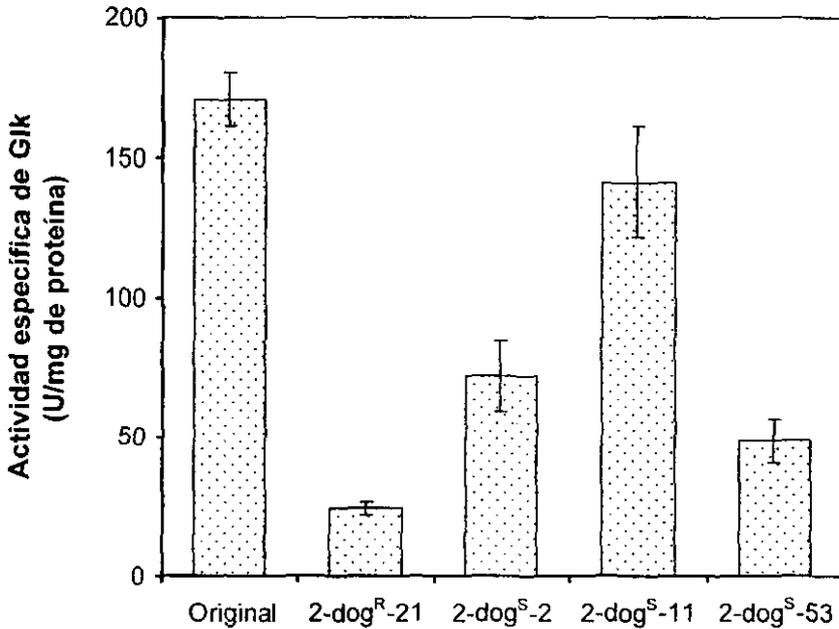


Fig. 6.3 Actividad específica de Glc en la cepa original y en las mutantes 2-dog<sup>R</sup>-21, 2-dog<sup>S</sup>-2, 2-dog<sup>S</sup>-11 y 2-dog<sup>S</sup>-53 de *S. peucetius* var. *caesius* a las 48h de fermentación. Las cepas se cultivaron en medio YM adicionado con glucosa 100 mM.

Considerando como el 100% la actividad presente en la cepa original, la mutante 2-dog<sup>R</sup>-21, a partir de la cual se aislaron el resto de las cepas, mostró sólo el 14% de esta actividad.

Como podemos observar en la figura 6.3, los niveles enzimáticos encontrados en las cepas 2-dog<sup>S</sup> varían entre 48 y 142 unidades específicas. Estos son valores intermedios entre los encontrados en la cepa original y los encontrados en la mutante 2-dog<sup>R</sup>-21 (cepa padre), es decir, las 3 cepas 2-dog<sup>S</sup> analizadas mostraron un restablecimiento parcial de la actividad de Glk al recuperar su sensibilidad a 2-dog. Mientras que la cepa 2-dog<sup>S</sup>-53 duplica los valores de actividad de Glk encontrados en la mutante 2-dog<sup>R</sup>-21, las mutantes 2-dog<sup>S</sup>-2 y 2-dog<sup>S</sup>-11 (cepas que mostraron insensibilidad a represión catabólica por fuente de carbono) presentaron 3 y 6 veces la actividad de la cepa padre, respectivamente, lo que representa hasta el 42% y 84% de la actividad de Glk observada en la cepa original.

Estos resultados confirman la existencia de una relación entre los niveles de actividad de la enzima glucosa cinasa y la sensibilidad a 2-dog en este microorganismo. Al restablecerse parcialmente la actividad de Glk las cepas recuperaron su sensibilidad al análogo no metabolizable de la glucosa. Sin embargo, a diferencia de lo esperado, al aumentar los niveles de actividad de Glk en las cepas 2-dog<sup>S</sup> 2 y 11 aisladas, no se restableció la sensibilidad a represión catabólica por glucosa ni por galactosa, en la misma proporción.

El aumento en la actividad de Glk podría ser resultado de la activación de un gen normalmente silencioso, como se ha reportado en *S. coelicolor* (Angell *et al.*, 1994), o bien, de la modificación de otra hexocinasa existente en el microorganismo. Una actividad diferente a la de Glk, podría restablecer la capacidad para fosforilar glucosa pero no la sensibilidad a represión catabólica en las cepas 2-dog<sup>S</sup> aisladas. Para investigar esta posibilidad, se

realizó un zimograma de la actividad de Glk donde se reveló dicha actividad en un gel de poliacrilamida donde se corrieron los extractos enzimáticos de las cepas analizadas. Para todas las cepas 2-dog<sup>S</sup> analizadas, se observó una sola banda de actividad de igual movilidad a la encontrada en la cepa original y en la cepa padre 2-dog<sup>R</sup>-21 (Fig. 6.4). Estos resultados podrían sugerir que las cepas 2-dog<sup>S</sup> aisladas son revertantes de dicha actividad. Sin embargo, puede tratarse también de mutantes supresoras con una nueva mutación en el gen que codifica para la Glk, que de alguna manera restablezca su actividad de cinasa pero no su papel regulador en el mecanismo de represión catabólica por fuente de carbono.

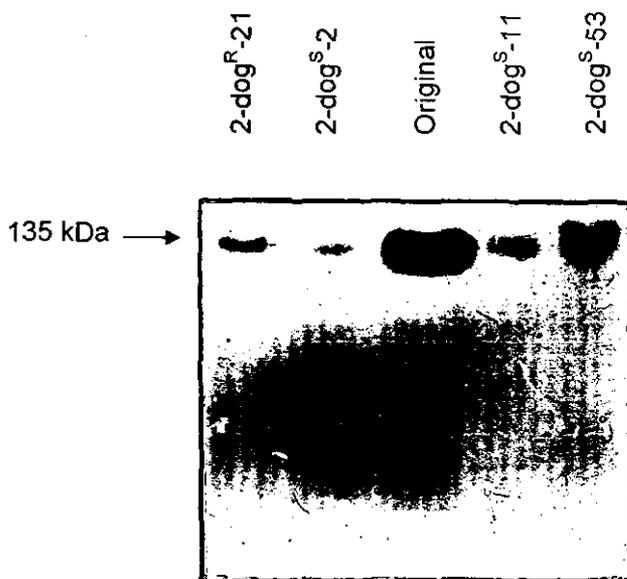


Fig. 6.4 Zimograma de la actividad de glucosa cinasa. Los extractos enzimáticos de 5 cepas de *S. peuceitius* var. *caesius* se sometieron a electroforesis en un gel nativo de poliacrilamida al 10% (w/v), revelado por actividad de Glk. Las siguientes cantidades de proteína se colocaron en cada carril: 2-dog<sup>R</sup>-21, 45  $\mu$ g; 2-dog<sup>S</sup>-2, 18  $\mu$ g; original, 68  $\mu$ g; 2-dog<sup>S</sup>-11, 17  $\mu$ g; 2-dog<sup>S</sup>-53, 33  $\mu$ g.

En todas las mutantes 2-dog se observó una banda de actividad de Glk más tenue que la revelada para la cepa original. Esto probablemente se deba a la disminución de la actividad enzimática específica en dichas mutantes (Fig. 6.3). Sin embargo, la diferencia en la intensidad de las manchas reveladas parece no corresponder a la actividad enzimática específica determinada *in vitro* (Fig. 6.3). Esto podría deberse a la diferencia en la cantidad de proteína cargada en cada carril y a que el zimograma se reveló a 42°C, temperatura que ha sido determinada como óptima para la Glk de la cepa original (Imriskova, I., comunicación personal), mientras que la actividad *in vitro* fue determinada a temperatura ambiente. Sin embargo, al determinar el porcentaje relativo de la intensidad de las bandas de actividad, usando un densitómetro (CAMAG Scanner), se obtiene una relación cercana entre su intensidad (Fig. 6.4) y la actividad específica (Fig. 6.3) en todas las cepas.

Empleando métodos de cromatografía de filtración en gel y electroforesis en gel de poliacrilamida de extractos enzimáticos de la cepa original, se ha determinado el peso molecular de esta enzima obteniendo un valor aproximado de 32 kDa para la subunidad monomérica que se encuentra normalmente formando un homotetrámero de 135 kDa (Imriskova, I., comunicación personal).

#### **6.4 TRANSPORTE DE GLUCOSA**

El metabolismo de glucosa o cualquier fuente de carbono represora se inicia con la incorporación del carbohidrato a la célula. Los niveles intracelulares del carbohidrato represor o cualquiera de los intermediarios del metabolismo de éste, podrían determinar el que se lleve a cabo o no, el

mecanismo de regulación metabólica. Así, el transporte de glucosa parece ser un paso determinante para ejercer su efecto represor. Por esta razón, y en busca de una posible relación entre el transporte de glucosa y el fenotipo mostrado por las mutantes, se cuantificó la incorporación de este carbohidrato en las cepas 2-dog<sup>S</sup> y se comparó con la cepa original y la mutante 2-dog<sup>R</sup>-21. Las cepas se cultivaron en presencia de glucosa para asegurar la inducción del sistema de transporte del carbohidrato y se probó su habilidad para incorporar D-[U-<sup>14</sup>C]glucosa.

En la figura 6.5 se pueden apreciar los resultados de la determinación del transporte de glucosa. En las cepas 2-dog<sup>S</sup>-2 y 2-dog<sup>S</sup>-11 se observó una incorporación de glucosa de sólo 6% y 14%, respectivamente, con respecto a la cepa original. Esto representa una disminución en la incorporación de glucosa con respecto a la cepa padre, ya que dicha mutante (2-dog<sup>R</sup>-21) presentó un transporte equivalente al 52% del observado en la cepa original. En contraste, la cepa 2-dog<sup>S</sup>-53 presentó una incorporación de glucosa ligeramente mayor a la mostrada por la cepa 2-dog<sup>R</sup>-21.

Cabe resaltar que mientras las cepas 2-dog<sup>S</sup>-2 y 2-dog<sup>S</sup>-11, insensibles a represión por glucosa, mostraron baja incorporación de glucosa y que, a pesar de haber recuperado de 3 a 6 veces la actividad de Glk, permanecen insensibles a represión catabólica, la cepa 2-dog<sup>S</sup>-53 con un aumento de aproximadamente 16% en el transporte de glucosa y la duplicación de los valores de actividad de Glk con respecto a la cepa padre (2-dog<sup>R</sup>-21), recuperó su sensibilidad a este mecanismo de regulación metabólica por carbono.

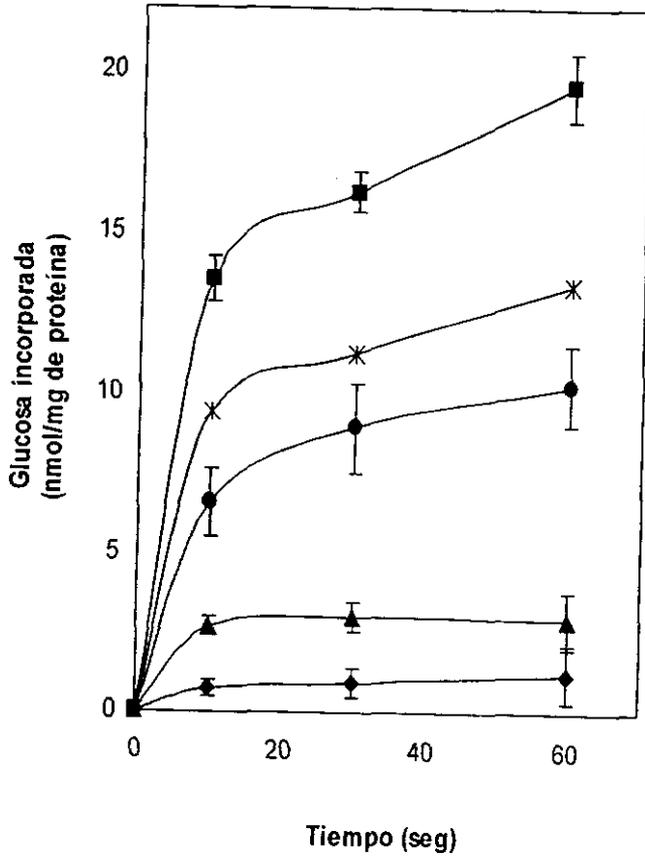


Fig. 6.5 Transporte de glucosa en la cepa original (■), la mutante 2-dog<sup>R</sup>-21 (●) y diferentes cepas 2-dog<sup>S</sup>: 2-dog<sup>S</sup>-2 (◆), 2-dog<sup>S</sup>-11 (▲) y 2-dog<sup>S</sup>-53 (\*). La cepa se cultivó durante 36 h en un medio suplementado con glucosa 100 mM y se determinó la incorporación de D-[U-<sup>14</sup>C]glucosa.

## 6.5 RELACIÓN ENTRE LOS PARÁMETROS CUANTIFICADOS EN LAS 5 CEPAS ANALIZADAS Y DISCUSIÓN.

Hasta ahora sólo se ha resaltado la relación existente entre la sensibilidad a 2-dog y los niveles de Glk. Se sabe que la 2-dog es un análogo no metabolizable de la glucosa que posee un efecto tóxico sobre el crecimiento celular. Además, en estudios previos, realizados en este laboratorio, se ha observado que la totalidad de la 2-dog incorporada por la cepa original se encuentra como 2-dog-6-fosfato en el interior de la célula. Este metabolito fosforilado podría ser el responsable de la toxicidad al interactuar con el ADN y diversas proteínas (Angell *et al.*, 1994). Así, un aumento en la actividad de Glk representa mayor capacidad para fosforilar glucosa y sus análogos y una posible acumulación del metabolito tóxico. Esto explica el aislamiento de cepas con una actividad de Glk parcialmente restablecida al someter a la cepa padre (con baja actividad de Glk) a un proceso de selección por recuperación de la sensibilidad de 2-dog.

Sin embargo, para explicar las diferencias entre el comportamiento de las cepas 2-dog<sup>S</sup> en cuanto al mecanismo de regulación por fuente de carbono, se buscó una posible relación entre la actividad de Glk, el transporte de glucosa y la sensibilidad a represión catabólica en las mutantes aisladas. Como se muestra en la tabla 6.2, todas las mutantes 2-dog<sup>S</sup>, así como la cepa padre, mostraron valores de actividad de Glk y de transporte de glucosa menores a los de la cepa original, pero no se observa una correspondencia evidente entre la susceptibilidad a represión catabólica por carbono y la actividad de Glk. Sin embargo, es claro que las dos cepas 2-dog<sup>S</sup> resistentes a RC, prácticamente no transportaron glucosa.

Cepa	Sensibilidad a 2-dog <sup>a</sup>	Actividad de Glk (%) <sup>b</sup>	Transporte de glucosa (%) <sup>c</sup>	Sensibilidad a RC <sup>d</sup>
Original	S	100	100	S
2-dog <sup>R</sup> -21	R	14	52	R
2-dog <sup>S</sup> -2	S	42	6	R
2-dog <sup>S</sup> -11	S	84	14	R
2-dog <sup>S</sup> -53	S	28	68	S

Tabla 6.2 Fenotipo presentado por las cepas de *S. peuceitius* var. *caesius* analizadas. S: sensible, R: resistente. <sup>a</sup>2-dog: 2-desoxiglucosa usada a concentración de 10 mM. <sup>b</sup>Glk: 100% de actividad representa 170 U/mg de proteína. <sup>c</sup>Transporte de glucosa: 100% representa 19.5 nmol/mg de peso seco. <sup>d</sup>Para determinar la sensibilidad a represión catabólica (RC) las cepas se cultivaron en medio YM adicionado con lactosa 20 mM y glucosa 330 mM y se determinó la producción de  $\beta$ -galactosidasa y antraciclinas totales.

Las cepas 2-dog<sup>S</sup> 2 y 11 que conservaron su insensibilidad a represión por glucosa, presentaron una actividad de Glk de 3 y 6 veces mayor que la de la cepa padre, respectivamente. Asumiendo que la actividad de Glk cuantificada *in vitro* refleja la concentración de esta enzima en la célula, estos resultados no apoyan la idea de la actividad de Glk como un factor regulador esencial en el mecanismo de represión por fuente de carbono, ya que el solo aumento en la capacidad para fosforilar glucosa no es suficiente para reprimir la expresión de los genes de la  $\beta$ -galactosidasa y de las enzimas involucradas en la biosíntesis de antraciclinas. De manera similar a estos resultados, en *Streptomyces rubiginosus* se ha encontrado que la represión catabólica por glucosa de los genes *xyl* no está mediada por glucosa cinasa (Wong *et al.*, 1991). Sin embargo, hay que considerar que la incorporación de glucosa se encuentra significativamente disminuida en las cepas 2-dog<sup>S</sup>-2 y 2-dog<sup>S</sup>-11; mientras que en la mutante 2-dog<sup>S</sup>-53, donde además de haberse recuperado, aunque escasamente, la actividad de Glk, los valores del

transporte de glucosa son algo mayores a los de la cepa padre (2-dog<sup>R</sup>-21) y se recupera la sensibilidad a represión catabólica por carbono.

Al parecer se requiere de niveles de transporte y de actividad de Glk tales que permitan alcanzar concentraciones intracelulares del carbohidrato represor o de cualquiera de los intermediarios producto de su metabolismo, suficientes para llevar a cabo el mecanismo de represión. Así, tanto la incorporación como la capacidad para metabolizar (fosforilar como primer paso) la fuente de carbono represora, son los factores que determinan la formación de estos metabolitos que podrían servir como efectores en el mecanismo de represión por carbono, probablemente uniéndose o interactuando con proteínas o factores adicionales involucrados en dicho mecanismo de regulación.

Así, en las cepas 2-dog<sup>S</sup> obtenidas en este trabajo, la combinación entre los niveles de Glk y la habilidad para transportar glucosa, determinarían el comportamiento de las cepas en condiciones de represión, conservando su resistencia a represión catabólica aquellas donde, ya sea por un transporte de glucosa escaso o por una baja producción de glucosa-6-fosfato (G6P), exista una disminución suficiente en el flujo del metabolismo de la fuente de carbono represora.

En la cepa original, donde la capacidad para fosforilar glucosa y los valores transporte de glucosa se encuentran al 100%, el flujo de este carbohidrato represor a través de las vías metabólicas podría permitir la acumulación suficiente de glucosa-6-fosfato u otros metabolitos efectores, con lo que el mecanismo habitual de regulación catabólica por fuente de carbono se lleva a cabo normalmente. Mientras que en la mutante 2-dog<sup>R</sup>-21

aislada a partir de la cepa original, la considerable baja actividad de Glk (86% menor a la cepa original) aunada a un transporte deficiente de glucosa, podría determinar el fenotipo de resistencia a represión catabólica presentado por esta cepa. Se sabe que en el género *Streptomyces* los niveles de AMPc no están involucrados en el mecanismo de represión catabólica como sucede en las bacterias Gram-negativas (Gersh *et al.*, 1980; Hodgson, 1994; Chatterjee and Vining, 1982), sin embargo, se pensó que algún otro nucleótido como el ATP podría intervenir en dicho mecanismo de regulación. Por tal razón se midieron los niveles intracelulares de ATP en la cepa original y en la mutante 2-dog<sup>R</sup>-21 resistente a represión catabólica, en condiciones de represión (330 mM de glucosa) y de no represión (100 mM de glucosa), sin encontrar diferencias significativas en la concentración de este nucleótido (resultados no mostrados).

Cabe señalar que nuestros resultados difieren con los obtenidos por Angell y colaboradores (1994) quienes aislaron cepas Glk<sup>+</sup> de *S. coelicolor* a partir de una mutante insensible a represión por glucosa con una deleción en el gen *glkA*. Estas cepas se caracterizan por niveles de Glk similares a los encontrados en la cepa silvestre, conservando la resistencia de los genes *dagA* a represión por glucosa. Sin embargo, la actividad de Glk que se recupera en estas cepas Glk<sup>+</sup> (llamada Glk II) parece ser una nueva actividad, ya que en un zimograma o gel de actividad *in situ* revela una banda de movilidad electroforética diferente a la observada en la cepa silvestre (Glk I). Estas cepas Glk<sup>+</sup> son mutantes supresoras más que revertantes de dicha actividad enzimática, lo que apoya la hipótesis de un posible papel regulador de la Glk en la regulación por carbono en *S. coelicolor*, ya que esta nueva actividad restablece la capacidad para fosforilar glucosa pero no la sensibilidad a represión. Sin embargo, en las cepas analizadas en el presente

trabajo no se encontró diferencia entre la movilidad electroforética de la banda de Glk de las mutantes 2-dog<sup>S</sup> aisladas y la movilidad de la banda revelada para las cepas original y 2-dog<sup>R</sup>-21. Estos resultados podrían sugerir que las mutantes 2-dog<sup>S</sup> son cepas revertantes de la actividad de Glk. Sin embargo, puede tratarse también de mutantes supresoras con una nueva mutación en el gen que codifica para la Glk, que de alguna manera restablezca su actividad de cinasa pero no su papel regulador en el mecanismo de represión catabólica por fuente de carbono. Es posible también que haya ocurrido otra mutación en un regulador común de la enzima Glk y del sistema de transporte de glucosa, afectando el flujo metabólico y el efecto represor de esta fuente de carbono. No obstante, los resultados obtenidos sugieren que la enzima Glk, más que un papel regulador independiente de su capacidad catalítica, parece participar en la regulación catabólica en *S. peuceitius* var. *caesius* junto con otros factores como el mecanismo de transporte de la fuente de carbono represora, determinando el flujo metabólico y la acumulación de metabolitos efectores de la represión. La glucosa-6-fosfato, la fructosa-6-fosfato, la fructosa-1,6-bisfosfato o cualquiera de los intermediarios de las vías de asimilación de glucosa, podrían ser los metabolitos efectores del mecanismo de represión catabólica.

## 6.6 EFECTO DE LA GLUCOSA SOBRE EL SISTEMA DE TRANSPORTE DE GALACTOSA.

La regulación del metabolismo primario por fuente de carbono es un proceso complejo que parece actuar a varios niveles, iniciando con la regulación de la incorporación de fuentes de carbono alternativas (Hodgson, 1982). Con el objeto de investigar el efecto de glucosa sobre el sistema de transporte de una fuente de carbono alternativa en *S. peuceitius* var. *caesius*,

se cuantificó la incorporación de galactosa evaluando el efecto represor y/o inhibidor de la glucosa sobre este proceso. Para tal efecto se cultivó la cepa original en presencia de galactosa para asegurar la inducción del sistema de transporte de este carbohidrato, y se cuantificó la incorporación de D-[1-<sup>14</sup>C]galactosa. El efecto inhibidor de glucosa se evaluó determinando la incorporación de galactosa en presencia de una concentración equimolar de glucosa, mientras que la represión por glucosa se probó al cuantificar el transporte de galactosa empleando micelio del microorganismo cultivado en un medio adicionado con galactosa 100 mM y una concentración represora de glucosa (330 mM). Adicionalmente, se midió el transporte de galactosa en micelio cultivado en presencia de glucosa como única fuente de carbono.

En la figura 6.6 se muestran los resultados de esta cuantificación. El sistema de transporte de galactosa parece no ser constitutivo, ya que se requiere la presencia de galactosa en el medio de crecimiento para inducir la incorporación de este carbohidrato. Al cultivar el microorganismo en presencia de glucosa como única fuente de carbono la incorporación de galactosa disminuyó considerablemente. Por otra parte, se observó un claro efecto inhibidor de la glucosa cuando este carbohidrato se añadió en concentración equimolar en el momento de iniciar la determinación del transporte de galactosa. Comparado con un control positivo, donde la incorporación de galactosa fue determinada en micelio cultivado en presencia de galactosa 100 mM, al añadir glucosa 1:1 el transporte de galactosa disminuyó casi 80%. También así, el micelio cultivado en presencia de glucosa 330 mM, presentó una fuerte disminución de la incorporación de galactosa (hasta 98% menor al control positivo a los 60 segundos), lo que sugiere que la glucosa es capaz no solo de inhibir, sino también de reprimir la expresión del sistema de transporte de galactosa en este microorganismo.

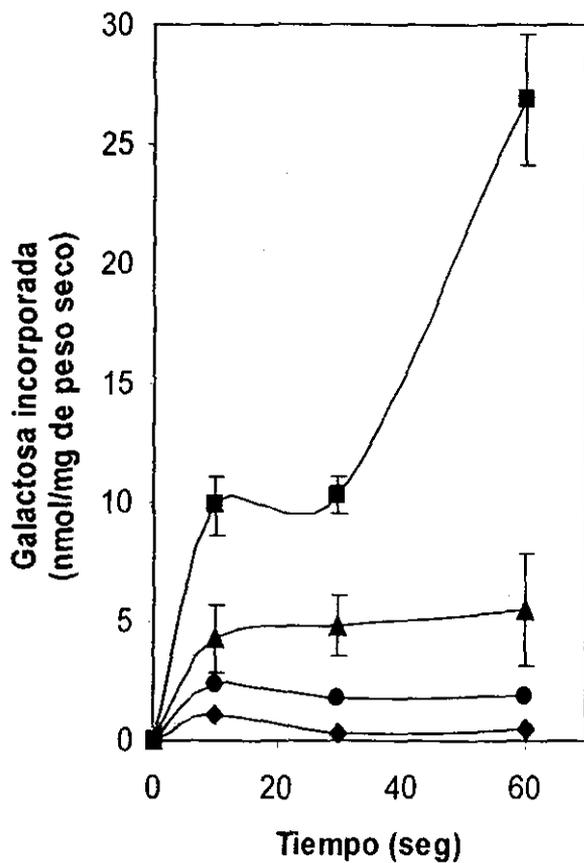


Fig. 6.6 Efecto de la glucosa sobre el sistema de transporte de galactosa en la cepa original de *S. peucetius* var. *caesius*. La cepa se cultivó durante 36 h en un medio suplementado con galactosa 100 mM (■,▲) o glucosa 100 mM (●) o galactosa 100 mM más glucosa 330 mM (◆) y se determinó la incorporación de D-[1-<sup>14</sup>C]galactosa en ausencia (■,●,◆) y en presencia de una concentración equimolar de glucosa (▲).

Se han reportado efectos similares por glucosa sobre los sistemas de incorporación de diversas fuentes de carbono como arabinosa, fructosa, galactosa y glicerol en *S. coelicolor* (Hodgson, 1982), donde además, mutantes resistentes a 2-dog incapaces de utilizar glucosa como única fuente de carbono, presentaron insensibilidad al efecto represor de este carbohidrato sobre los sistemas de transporte de diversas fuentes de carbono alternativas. En estas mutantes de *S. coelicolor* no se observaron diferencias con la cepa silvestre en cuanto a la capacidad para incorporar glucosa. Sin embargo, en *S. peucetius* var. *caesius* a diferencia de lo obtenido por Hodgson (1982), en una mutante resistente a 2-dog con baja actividad de Glk (mutante 2-dog<sup>R</sup>-21) se observó una disminución en la incorporación de glucosa (fig. 6.5). Ya que esta mutante muestra insensibilidad a represión por glucosa y otras fuentes de carbono sobre la síntesis de  $\beta$ -galactosidasa y antraciclinas totales (figs. 6.1 y 6.2), se evaluó el efecto de la glucosa sobre el sistema de transporte de galactosa en esta cepa.

Como se puede observar en la figura 6.7, al igual que en la cepa original, la incorporación de galactosa se inhibió en presencia de glucosa en la mutante 2-dog<sup>R</sup>-21 y además, contrario a lo esperado y a lo reportado para las mutantes 2-dog<sup>R</sup> de *S. coelicolor* (Hodgson, 1982), se observó un efecto represor de la glucosa sobre el sistema de transporte de galactosa en esta cepa (fig. 6.7). Es decir, la glucosa fue capaz de inhibir y reprimir el sistema de incorporación de galactosa tanto en la cepa original como en la mutante 2-dog<sup>R</sup>-21.

Esta diferencia en el comportamiento de la mutante 2-dog<sup>R</sup>-21 en cuanto a sensibilidad a represión catabólica podría deberse a que el mecanismo por el cual se lleva a cabo la regulación por carbono sobre la síntesis de  $\beta$ -galactosidasa y antraciclinas fuera diferente al sistema que regula la incorporación de carbohidratos. Y que en esta mutante la

disminución de la actividad de Gik y del mismo transporte de glucosa afectara únicamente la regulación por carbono de algunos genes sin afectar la regulación de la expresión de sistemas de transporte de carbohidratos como la galactosa.

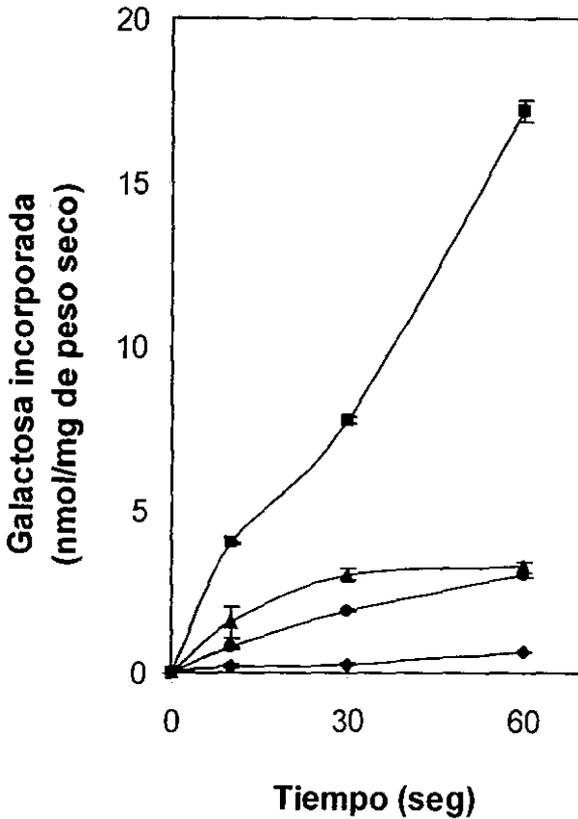


Fig. 6.7 Efecto de la glucosa sobre el sistema de transporte de galactosa en la mutante 2-dog<sup>R</sup>-21 de *S. peucetius* var. *caesius*. La cepa se cultivó durante 36 h en un medio suplementado con galactosa 100 mM (■,▲) o glucosa 100 mM (●) o galactosa 100 mM más glucosa 330 mM (◆) y se determinó la incorporación de D-[1-<sup>14</sup>C]galactosa en ausencia (■,●,◆) y en presencia de una concentración equimolar de glucosa (▲).

Otra explicación a estos resultados podría tenerse si consideramos que el sistema de transporte de galactosa fue específicamente inducido por dicho carbohidrato y que la presencia de glucosa en el medio inhibe la entrada de galactosa. Así, la baja incorporación de galactosa en el micelio cultivado en presencia del inductor y de altas concentraciones de glucosa, podría deberse más a un mecanismo de exclusión del inductor que a una represión por glucosa de la expresión del sistema de transporte de galactosa. Además, ya que el sistema de transporte de fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS) se ha visto involucrado en los sistemas de regulación catabólica por glucosa en diversos microorganismos, y en *Streptomyces* se ha reportado la existencia de las enzimas I, HPr y la enzima II para fructosa en 3 especies diferentes, no se puede descartar la posibilidad de que componentes de este sistema participen en el proceso de represión catabólica por carbono en este género.

Como se ha hecho notar, existen diferencias significativas entre nuestros resultados y los obtenidos por Hodgson (1982) en *S. coelicolor*. En primer lugar, en nuestro sistema, el transporte de glucosa fue inducido específicamente por glucosa (Ramos, 1998); en segundo lugar, las cepas 2-dog<sup>S</sup> y la cepa padre mostraron baja incorporación del carbohidrato; y finalmente, la mutante 2-dog<sup>R</sup>-21, al perder su sensibilidad a represión catabólica por glucosa sobre la síntesis de  $\beta$ -galactosidasa y antraciclinas totales, no se libera del efecto negativo que este carbohidrato ejerce sobre la expresión del sistema de transporte de galactosa. Esto sugiere la posibilidad de que en una sola especie de *Streptomyces* existan múltiples mecanismos por los que se lleve a cabo la regulación por fuente de carbono. Además, entre diferentes especies de un mismo género podría haber diferencias importantes en el(los) sistema(s) y factores que intervienen en la represión catabólica.

## **7. CONCLUSIONES**

En el presente trabajo se logró el aislamiento de 8 cepas sensibles a 2-dog las cuales presentaron diferentes fenotipos de sensibilidad a represión catabólica por fuente de carbono, encontrando una correlación entre los niveles de actividad de la enzima glucosa cinasa (Glc) y la sensibilidad a 2-dog en las cepas de *S. peucetius* var. *caesius* analizadas. Sin embargo, la sensibilidad a represión catabólica por carbono y el transporte de glucosa no se observaron claramente relacionados con la actividad de Glc. No obstante, las cepas 2-dog<sup>s</sup> resistentes a represión catabólica, a pesar del aumento en su actividad de Glc, prácticamente no transportaron glucosa. Además, todas las cepas mostraron una movilidad electroforética similar de la banda de actividad de Glc en un zimograma de la actividad de dicha enzima. Estos resultados nos llevan a concluir que en *S. peucetius* var. *caesius*:

- La Glc, más que un papel regulador independiente de su capacidad catalítica, parece participar en la regulación catabólica en *S. peucetius* var. *caesius* junto con otros factores como el mecanismo de transporte de fuente de carbohidratos, determinando el flujo metabólico y la formación y acumulación de intermediarios del metabolismo de la fuente de carbono represora que pudieran actuar como efectores del mecanismo de represión catabólica.
- La represión catabólica por fuente de carbono es un proceso complejo que actúa a varios niveles, abarcando desde la regulación de la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de metabolitos secundarios, en el transporte y metabolismo de fuentes de carbono represoras y alternativas, hasta la regulación del flujo metabólico al nivel de actividad enzimática.

Por otro lado, del estudio del efecto de glucosa sobre el sistema de transporte de galactosa en la cepa original y una mutante resistente a represión catabólica por fuente de carbono (2-dog<sup>R</sup>-21) se concluye que:

- La glucosa por sí misma causa represión e inhibición del sistema de transporte de galactosa en este microorganismo.
- Varios mecanismos de represión catabólica por fuente de carbono podrían existir en una sola especie de *Streptomyces*, ya que el transporte de galactosa se encuentra aun reprimido por glucosa en la mutante 2-dog<sup>R</sup>-21 (mutante resistente al efecto de glucosa sobre la producción de  $\beta$ -galactosidasa y antraciclinas).

## **8. *PERSPECTIVAS***

## 8. PERSPECTIVAS

Aun existen muchas incógnitas por resolver para entender el mecanismo por el cual se lleva a cabo la represión catabólica (RC) por fuente de carbono en el género *Streptomyces*. Existen varios factores que se han visto involucrados en este mecanismo de regulación metabólica, donde parece ser necesaria la existencia de uno o varios metabolitos que sean detectados por otros factores para monitorear la situación que prevalece en el medio extracelular. Estos metabolitos podrían interaccionar de alguna manera con una o varias proteínas reguladoras, formando un complejo represor capaz de regular la expresión de los genes sensibles a este tipo de control. Por esta razón, es importante identificar al efector metabólico, el cual pudiera ser algún intermediario producto del metabolismo de la fuente de carbono represora.

Ya que se ha propuesto un importante papel de la Glk en este mecanismo de regulación, su caracterización (secuenciación, determinación de sus propiedades cinéticas, establecimiento de su capacidad para restablecer la sensibilidad a represión catabólica en mutantes insensibles como las 2-dog<sup>R</sup>-21, 2-dog<sup>S</sup>-2 y 2-dog<sup>S</sup>-11, y posible unión a secuencias reguladoras de operones sensibles a represión o a otras proteínas) podría ayudar a determinar si esta enzima se encuentra involucrada de manera directa en el proceso de represión catabólica.

Las cepas aisladas en este trabajo podrían servir como herramienta para proseguir con el estudio de la represión catabólica en *S. peucetius* var. *caesius*. Ya que existe la posibilidad de que componentes del sistema PTS, si

están presentes en este microorganismo, puedan también participar en la RC, se podría intentar la búsqueda de este sistema de transporte y su relación con el fenómeno de represión por carbono, por complementación de las cepas que presentaron un transporte de glucosa afectado significativamente. Además, la identificación de la(s) proteína(s) represora(s) o aporrepresora(s) y el estudio de su posible interacción con los supuestos efectores o algún otro factor, podrían ayudar a proponer un mecanismo general de regulación por represión catabólica en *S. peuceetius* var. *caesius*.

## APÉNDICE

### Cepas

CEPAS	DESCRIPCIÓN
Original	Cepa original de <i>Streptomyces peucetius</i> var. <i>caesius</i> ATCC27952. Sensible a 2-dog, sensible a represión catabólica por carbono.
2-dog <sup>R</sup> -21	Mutante aislada a partir de la cepa original. Resistente a 2-dog, resistente a represión por carbono, con bajos niveles de Glk.
2-dog <sup>S</sup> -2	Cepa aislada a partir de la mutante 2-dog <sup>R</sup> -21, sensible a 2-dog y resistente a represión por carbono.
2-dog <sup>S</sup> -11	Cepa aislada a partir de la mutante 2-dog <sup>R</sup> -21, sensible a 2-dog y resistente a represión por carbono.
2-dog <sup>S</sup> -53	Cepa aislada a partir de la mutante 2-dog <sup>R</sup> -21, sensible a 2-dog y sensible a represión por carbono.

## REFERENCIAS

- Angell, S., E. Schwartz and 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 and 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 and C. Spalla. (1969). Adriamycin, 14-Hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *Streptomyces peuceitius* var. *caesius*. *Biotechnol. Bioeng.* **11**, 1101-1110.
- Arcamone, F. (ed). (1981). Doxorubicin: Anticancer Antibiotics. *Academic Press. New York*. pp. 2-47.
- Arcamone, F., F. Animati, G. Capranico, P. Lombardi, G. Pratesi, S. Manzini, R. Supino and F. Zunino. (1998). New developments in antitumor anthracyclines. *Pharmacol. Ther.* **76**, 117-124.
- Baumberg, S., H. Krügel and D. Noack (eds). (1991). Genetics and product formation in *Streptomyces*. *Plenum Press. New York and London*. pp. 35-45, 245-252.
- Botsford, J. L. and J. G. Harman. (1992). Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiol.* **56**, 100-122.
- Braña, A., N. Paiva and A. L. Demain. (1986). Pathways and regulation of ammonium assimilation in *Streptomyces clavuligerus*. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 1305-1317.
- Chatterjee, S. and L. C. Vining. (1982). Catabolite repression in *Streptomyces venezuelae*. Induction of  $\beta$ -galactosidase, chloramphenicol production, and intracellular cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate concentrations. *Can. J. Microbiol.* **28**, 311-317.
- Chen, C.W. (1996). Complications and implications of linear bacterial chromosomes. *Trends Genet.* **12**, 192-196.
- Crandall, L. W. and 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*. pp. 355-402.
- Dekleva, M. L., J. A. Titus and W. R. Strohl. (1985). Nutrient effects on anthracycline production by *Streptomyces peuceitius* in a defined medium. *Can. J. Microbiol.* **31**, 287-294.
- Dekleva, M. and W. Strhol. (1987). Glucose-stimulated acidogenesis by *Streptomyces peuceitius*. *Can. J. Microbiol.* **33**, 1129-1132.

**Delic, I., P. Robbins and 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. pp. 127-134.

**Di Marco, A., F. Arcamone and F. Zunino. (1975).** Daunomycin (daunorubicin) and adriamycin and structural analogs: biochemical activity and mechanism of action. J. W. Corcoran, F. E. Hahn (eds.), *Antibiotic*, Vol. 3. Springer Verlag, New York. pp.101-128.

**Eckardt, T., J. Strickley, L. Gorniak, W. Burnett and L. R. Fare. (1987).** Characterization of the promoter signal sequence and amino terminus of a secreted  $\beta$ -galactosidase from *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* **169**, 4249-4256.

**Escalante, L., I. Ramos, I. Imriskova, E. Langley and S. Sánchez. (1999).** Glucose repression of anthracyclines formation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Applied Microbiol. Biotechnol.* Aceptado con correcciones.

**Frost, G.M. and 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 and 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.

**Grein, A. (1987).** Antitumor anthracyclines produced by *Streptomyces peucetius*. *Adv. Appl. Microbiol.* **32**, 203-215.

**Harris, H. and D.A. Hopkinson (eds). (1976).** Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics. New York: American Elsevier Publishing Co., Inc.

**Hershberger, C., S. Queener and G. Hegeman. (1989).** Genetics and molecular biology of industrial microorganism. *American Society for Microbiology*. Washington, D. C. pp. 68-84.

**Hirsch, C. F. and P. A. McCann-McCormick. (1985).** Biology of *Streptomyces*. In: Biology of Industrial Microorganisms. Demain, A., Solomon, N. (eds). 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.

**Hodgson, D. A. (1994).** General Physiology ---1. Carbon Metabolism. In *Streptomyces: Handbook of Biotechnology*. Wellington, E. M. H., and Hodgson, D.A. (eds) London: Plenum Press.

**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. and W. Hillen. (1995).** Catabolite repression in *Bacillus subtilis*: a global regulatory mechanism for the Gram-positive bacteria?. *Mol. Microbiol.* **15**, 395-401.

**Hurtubise, Y., F. Shareck, D. Kluepfel and R. Morosoli. (1995).** A cellulase/xylanase-negative mutant of *Streptomyces lividans* 1326 defective in cellobiose and xylobiose uptake is mutated in a gene encoding a protein homologous to ATP-binding proteins. *Mol. Microbiol.* **17**, 367-377.

**Ikeda, H., E. T. Seno, C. J. Bruton and 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 and J. Westpheling. (1995).** *ccrA1*: mutation in *Streptomyces coelicolor* that affects the control of catabolite repression. *J. Bacteriol.* **177**, 3579-3586.

**Ishiuka, H., A. Hanamura, T. Kunimura and H. Aiba. (1993).** A lowered concentration of cAMP receptor protein caused by glucose is an important determinant for catabolite repression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **10**, 341-350.

**Kolb, A., S. Busby, H. Buc, S. Garges and S. Adhya. (1993).** Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 749-795.

**Kolsto, A.-B. (1997).** Dynamic bacterial genome organization. *Mol. Microbiol.* **24**, 241-248.

**Kolter, R. and D. Siegel. (1992).** Life after log. *J. Bacteriol.* **174(2)**, 345-348.

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

**Leblond, P. and B. Decaris. (1994).** New insights into the genetic instability of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol. Lett.* **123**, 225-232.

**Leblond, P., G. Fisher, F.-X. Franou, F. Berger, M. Guerineau and B. Decaris (1996).** The unstable region of *Streptomyces ambofaciens* includes 210 kb terminal inverted repeats flanking the extremities of the linear chromosomal DNA. *Mol. Microbiol.* **119**, 2611-27.

# ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

Lezhava, A., T. Mizukami, T. Kajitani, D. Kameoka, M. Redenbach, H. Shinkawa, O. Nimi and H. Kinashi. (1995). Physical map of the linear chromosome of *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **177**, 6492-6498.

Lin, Y.S., D. A. Hopwood and C. Chen. (1993). The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. *Mol Microbiol.* **1**, 923-933.

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

Madden, T., J. M. Ward and A. P. Ison. (1996). Organic acid excretion by *Streptomyces lividans* TK24 during growth on defined carbon and nitrogen sources. *Microbiol.* **142**, 3181-3185.

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

Magasanik, B. (1961). Catabolite repression. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **26**, 249-256.

Mattern, S. G., M.E. Brawner and 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., K. Nagura, S. Eguchi, H. Fukuda, J. Deutscher and Y. Fujita. (1997). Catabolite repression of the *Bacillus subtilis* *gnt* operon exerted by two catabolite-responsive elements. *Mol. Microbiol.* **23**, 1203-1213.

Myers, C. E., E. G. Mimnaugh, G. C. Yeh and B. K. Sinha. (1988). Biochemical mechanisms of tumor cell kill by anthracyclines. In: Anthracycline and anthracenedione-based anticancer agents. Lown, J. W. (ed). Elsevier, Amsterdam. *The Netherlands*. pp. 527-569.

Nguyen, J., F. Francois, M. J. Virolle and M. Guérineau. (1997). Amylase and chitinase genes in *Streptomyces lividans* are regulated by *reg1*, a pleiotropic regulatory gene. *J. Bacteriol.* **179**, 6383-6390.

Novotná, J. and Z. Hostálek. (1985). Phosphorylation of hexoses in *Streptomyces aureofaciens*: evidence that the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system is not operative. *FEMS Microbiol. Lett.* **28**, 347-350.

Pandza, K., G. Pfalzer, J. Cullum and D. Hranueli. (1997). Physical mapping shows that the unstable oxytetracycline gene cluster of *Streptomyces rimosus* lies close to one end of the linear chromosome. *Microbiology.* **43**, 11493-1501.

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

**Pope, M. K., B. D. Green and J. Westpheling. (1996).** The *bld* mutants of *Streptomyces coelicolor* are defective in the regulation of carbon utilization, morphogenesis and cell-cell signalling. *Mol. Microbiol.* **19**, 747-756.

**Postma, P. W., J. W. Lengeler and G.R. Jacobson. (1993).** Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**, 543-594.

**Postma, P. W., J. W. Lengeler and G.R. Jacobson. (1996).** Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter and H. E. Umbarger (eds). 2<sup>nd</sup> ed., vol. 1. *ASM Press, Washington, D. C.* pp. 1149-1174.

**Ramos, A. I. (1998).** Estudio sobre el transporte y fosforilación de diferentes fuentes de carbono represoras en *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. Tesis para obtener el título de Química Farmacéutica Bióloga. México, D. F. Facultad de Química, UNAM.

**Reizer, J., M. J. Novotny, W. Hengstenberg and M. H., Jr, Saier. (1984).** Properties of ATP-dependent protein kinase from *Streptococcus pyogenes* that phosphorylates a seryl residue in HPr, a phosphocarrier protein of the phosphotransferase system. *J. Bacteriol.* **16**, 333-340.

**Reizer, J., M. H., Jr, Saier, J. Deutscher, F. Grenier, J. Thompson, and W. Hengstenberg. (1988).** The phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system in Gram-positive bacteria: properties, mechanism, and regulation. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **15**, 297-338.

**Reizer, J., H. A. Romano and J. Deutscher (1993).** The role of phosphorylation of HPr, a phosphocarrier protein of the phosphotransferase system, in the regulation of carbon metabolism in Gram-positive bacteria. *J. Cell. Biochem.* **51**, 19-24.

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

**Sabater, B., J. Sebastian and C. Asensio. (1972).** Identification and properties of an inducible and highly specific fructokinase from *Streptomyces violaceoruber*. *Biochim. Biophys. Acta.* **284**, 414-420.

**Sabater, B. and C. Asensio. (1973).** Transport of hexoses in *Streptomyces violaceoruber*. *Eur. J. Biochem.* **39**, 201-205.

**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., Jr. (1991).** A multiplicity of potential carbon catabolite repression mechanisms in prokaryotic and eukaryotic microorganisms. *New Biologist.* **3**, 1197-1147.

Saier, M. H., Jr. (1993). Regulatory interactions involving the proteins of the phosphotransferase system in enteric bacteria. *J. Cell. Biochem.* **51**, 62-68.

Saier, M. H., Jr. and J. Reizer. (1992). Proposed uniform nomenclature for the proteins and protein domains of the bacterial phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *J. Bacteriol.* **174**, 1433-1438.

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

Saier, M. H., Jr., T. M. Ramseier and J. Reizer. (1996). Regulation of carbon utilization, *In: Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter and H. E. Umbarger (eds). 2<sup>nd</sup> ed., vol. 1. ASM Press, Washington, D. C. pp. 1325-1343.

Segura, D., R. González, R. Rodríguez, T. Sandoval, L. Escalante and 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. and 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 and M. Bibb. (1994). Transcriptional regulation of the four promoters of the agarase gene (*dagA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiol.* **140**, 2555-2565.

Shapiro, S. (1989). Regulation of Secondary Metabolism in *Actinomycetes*. CRC Press, Inc. Florida. pp. 127-132.

Simpkins, H., L. F. Pearlman and L. M. Thompson. (1984). Effects of adriamycin on supercoiled DNA and calf thymus nucleosomes studied with fluorescent probes. *Cancer Res.* **44**, 614-618.

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

Snell, R. (1997). Efecto del amonio sobre la biosíntesis de antraciclina en *Streptomyces peuceiius* var. *caesius*. Tesis para obtener el título de Biólogo. México, D. F. ENEP Iztacala, UNAM.

Tanaka, Y., R. Masuma and S. Omura (1984). Control of ammonium ion level for efficient nanaomycin production. *J. Antibiot.* **38**, 1370-1375.

Titgemeyer, F. (1993). Signal transduction in chemotaxis mediated by the bacterial phosphotransferase system. *J. Cell. Biochem.* **51**, 69-74.

Titgemeyer, F., J. Reizer, A. Reizer and 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. and Saier Jr. (1995). Identification and characterization of phosphoenol-pyruvate:fructose phosphotransferase systems in three *Streptomyces* species. *Microbiol.* **141**, 51-58.

Tritton, T. R. and A. Yee. (1982). The anticancer agent adriamycin can be actively cytotoxic without entering cell. *Science.* **217**, 248-250.

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

Ullmann, A., and A. Danchin. (1983). Role of cyclic AMP in bacteria. *Adv. Cyclic Nucl. Res.* **15**, 1-53.

Ullmann, A. (1985). Catabolite repression 1985. *Biochimie.* **67**, 29-34.

Vandamme, E. J. (ed). (1984). Biotechnology of industrial antibiotics. Vol. 22. *Marcel Dekker Inc. New York.* pp. 569-594.

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

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

Wanner, B., R. Kodaira and F. C. Neidhardt. (1978). Regulation of *lac* operon expression: reappraisal of the theory of catabolite repression. *J. Bacteriol.* **136**, 947-954.

Wezel, G. P., J. White, P. Young, P. W. Postma and M. J. Bibb. (1997). Substrate induction and glucose repression of maltose utilization by *Streptomyces coelicolor* A3(2) is controlled by *malR*, a member of the *lacI-galR* family of regulatory genes. *Mol. Microbiol.* **23**, 537-549.

White, R. J. and R. M. Stroshane. (1984). Daunorubicin and adriamycin: properties, biosynthesis and fermentation. E. J. Vandamme (ed.), *Biotechnology of Industrial Antibiotics*, vol. 22. *Marcel Dekker, Inc., New York.* pp. 569-594.

Wong, H., Y. Ting, H-C. Lin, F. Reichert, K. Myambo, K. W. K. Watt, P. L. Toy and R. J. Drummond. (1991). Genetic organization and regulation of the xylose degradation genes in *Streptomyces rubiginosus*. *J. Bacteriol.* **173**, 6849-6858.

Ye, J. J., J. W. Neal, X. Cui, J. Reizer and M. H., Jr, Saier. (1994). Regulation of the glucose:H<sup>+</sup> symporter by metabolite-activated ATP-dependent phosphorylation of HPr in *Lactobacillus brevis*. *J. Bacteriol.* **176**, 3336-3344.