

32
ZEJ

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS



"ESTABLECIMIENTO DE LAS BASES METODOLÓGICAS PARA
LA OBTENCIÓN DE MUTANTES NO PRODUCTORAS DE
B-GALACTOSIDASA EN *Streptomyces peucetius* var. *caesius*"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A :
CLAUDIA CORONEL OLIVARES



México, D.F.

1999

TESIS CON
FALLE DE ORIGEN





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
 INSTITUTO NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
 Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
 Facultad de Ciencias
 Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
 "Establecimiento de las Bases Metodológicas para la selección de mutantes
 no productoras de beta-galactosidasa en *Streptomyces peucetius* var. *caesius*".

realizado por Claudia Coronel Olivares

con número de cuenta 9450312-8, pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de tesis
 Propietario

Dr. Sergio Sánchez Esquivel.

Propietario

Dra. Amelia Farrés González-Saravia.

Propietario

Ing. Bioq. Iveta Imriskova Vrablova de Sosa.

Suplente

M. en C. Gabriela González Cerón.

Suplente

Biol. Ana María Velasco Velasco.

Consejo Departamental de Biología

Dra. Edna María Suárez Díaz

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología Industrial, Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Sergio Sánchez Esquivel.

Este trabajo se llevó a cabo con apoyo financiero del proyecto DGAPA IN201697.

A mis padres Teresa y Rubén quienes me han brindado su apoyo incondicional durante toda mi vida

A mi hermano por todos esos momentos de ayuda y paciencia

A Ulises por todos estos años

A mi familia por todo su apoyo y confianza

A mis amigos de toda la vida

A la Universidad Nacional Autónoma de México

Agradecimientos

Al Dr. Sergio Sánchez Esquivel por brindarme sus conocimientos, apoyo y por la confianza depositada en mí.

A los integrantes del jurado: Dra. Amelia Farrés González-Saravia; Ing. Bioq. Iveta Imriskova Vrablova de Sosa; M. en C. Gabriela González Cerón y Biol. Ana María Velasco Velasco por las sugerencias y valiosos comentarios para el enriquecimiento de esta tesis.

A mi amiga Liliana Mascarúa por todo el apoyo y buenos momentos.

A Laura Escalante y Beatriz Ruíz por su amistad, valiosa asesoría e inmensa paciencia.

A Vero por su amistad e invaluable ayuda.

A mis compañeros de laboratorio: Iveta por todo su apoyo, Itzel por su asesoría, Angeles por su apoyo en el mundo de las computadoras, Ruth Martín por esas charlas, Ale por su amabilidad, Elizabeth Langley por las traducciones, Luis por su amistad, Silvia, Erika, Naima y Joaquín por hacerme reír, Magdis por su sonrisa y a todos aquellos que me animaron en los momentos más difíciles.

Al Programa de Becas para Tesis de Licenciatura en Proyectos de Investigación (PROBETEL) por la beca otorgada durante un año

A todos mis profesores que de alguna manera fueron las bases sólidas de mi formación académica

~

INDICE

RESUMEN 1

1. INTRODUCCIÓN 2
 2. MARCO TEÓRICO
 - 2.1 Características del género *Streptomyces* 3
 - 2.2 *Streptomyces peucetius* var. *caesius* 10
 - 2.3 El fenómeno de represión catabólica ejercida por la fuente de carbono 13
 - 2.3.1 Represión catabólica en bacterias Gram negativas 14
 - 2.3.2 Represión catabólica en bacterias Gram positivas 14
 - 2.4 El Operón de Lactosa (operón *lac*) 23
 3. ANTECEDENTES 28
 4. JUSTIFICACIÓN 31
 5. OBJETIVO GENERAL 31
 6. ESTRATEGIA GENERAL 32
 7. MATERIAL Y MÉTODOS
 - 7.1 Modelo de investigación 33
 - 7.2 Preservación de la cepa 33
 - 7.3 Obtención de esporas 34
 - 7.4 Producción de micelio "fragmentado" 35
 - 7.5 Mutagénesis 36
 - 7.6 Determinación de frecuencia de aparición de mutantes 36
 - 7.7 Enriquecimiento 37
 - 7.8 Aislamiento y selección de mutantes 39
 - 7.9 Métodos analíticos
 - 7.9.1 Crecimiento 40
 - 7.9.2 Determinación de pH 40
 - 7.9.3 Actividad de β -galactosidasa 40
 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN
 - 8.1 Obtención de esporas y tratamiento mutagénico 42
 - 8.2 Obtención de micelio fragmentado 45
 - 8.3 Tratamiento mutagénico del micelio y selección 46
 - 8.4 Enriquecimiento y selección de mutantes no productoras de β -galactosidasa 50
 9. CONCLUSIONES 61
 10. PERSPECTIVAS 63
 11. APÉNDICE 1 64
 - APÉNDICE 2 68
 12. REFERENCIAS 69
-

ABREVIATURAS, FÓRMULAS Y SÍMBOLOS DE NOMENCLATURA INTERNACIONAL

ADP	Adenosín difosfato
AMP	Adenosín monofosfato
ASB	Albúmina sérica bovina
AT	Adenina: Timina
ATP	Adenosín trifosfato
β -gal	β -galactosidasa
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Cloruro de cobalto sextahidratado
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cloruro de calcio dihidratado
CaCO_3	Carbonato de calcio
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
CcpA	Proteína A de control de catabolito
CRE	Elementos de represión catabólica
CRP	Proteína represora del catabolito
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D.O.	Densidad óptica
DOXIL	Doxorrubicina liposomal
FBP	Fructosa 1,6-bifosfato
FDA	Food and Drug Administration, USA
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de hierro heptahidratado
g	gramos
GC	Guanina:Citosina
Glc	Glucosa cinasa
h	horas
K_2SO_4	Sulfato de potasio
K_2HPO_4	Fosfato de potasio dibásico
KH_2PO_4	Fosfato de potasio monobásico
Kb	kilobases
kDa	kilodaltones
KOH	Hidróxido de potasio
<i>lacA</i>	Gen estructural de la transacetilasa del operón de lactosa
<i>lacI</i>	Gen del represor del operón de lactosa
<i>lacO</i>	Región del operador del operón de lactosa
<i>lacP</i>	Región del promotor del operón de lactosa
<i>lacY</i>	Gen estructural de la permeasa del operón de lactosa
<i>lacZ</i>	Gen estructural de la β -galactosidasa del operón de lactosa

log	Logaritmo base diez
M	Concentración molar por litro
μg	Microgramos
mg	Miligramos
μl	Microlitros
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Concentración milimolar
μm	Micrómetros
MM	Medio mínimo químicamente definido
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de magnesio heptahidratado
$\text{MnCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Cloruro de magnesio tetrahidratado
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Cloruro de manganeso heptahidratado
min	Minutos
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
N	Concentración normal por litro
NaCl	Cloruro de Sodio 0.85%
Na_2CO_3	Bicarbonato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Sulfato de amonio
nm	nanómetros
nmol	nanomoles
NTG	N-metil-N' -nitro-N-nitrosoguanidina
$^{\circ}\text{C}$	Temperatura medida en grados Celsius
ONPG	o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido
ORF	Marco de lectura abierto
PEP	Fosfoenol piruvato
PTS	Sistema fosfotransferasa
RNApol	Polimerasa del ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SSI	Solución salina isotónica (0.085%)
TCA	Ácido tricloroacético
TM	Amortiguador Tris-Maleatos
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indonil- β -galactopiranosido
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de zinc heptahidratado
2-DOG	Dos desoxíglucosa

FIGURAS

Figura 1.- Ciclo de vida de *Streptomyces coelicolor* (Hopwood, 1988). Dib. Enrique Vázquez.

Figura 2.- A. Hifa aérea enrollada de *Streptomyces*. B. Cadenas de esporas de *Streptomyces*. Micrografías electrónicas (11000x) (Grubbs, 1998).

Figura 3.- Estructura de la pared celular en bacterias Gram positivas (Madigan *et al.*, 1998).

Figura 4.- *Streptomyces peucetius* var. *caesius* ATCC 27952. Tomada por José

Figura 5.- Estructura química de la doxorrubicina y daunorrubicina.

Figura 6.- Mecanismo propuesto para la regulación del metabolismo de carbono de *E. coli*.

Figura 7.- Modelo del mecanismo de represión catabólica propuesta para *B. subtilis*.

Figura 8.- Mecanismo hipotético del fenómeno de represión catabólica ejercida por la fuente de carbono.

Figura 9.- Modo de acción de la β -galactosidasa.

Figura 10.- Esquema representativo del fenómeno de represión catabólica sobre el operón de lactosa en *Streptomyces peucetius* var. *caesius*.

Figura 11.- Curva de sobrevivientes respecto al tiempo de tratamiento mutagénico y frecuencia de aparición de mutantes

Figura 12.- Actividad específica de β -galactosidasa intracelular en mutantes sospechosas β -gal⁻.

Figura 13.- Actividad específica de β -galactosidasa intracelular en mutantes probables de ser β -gal⁻.

Figura 14.- Actividad volumétrica de β -galactosidasa intracelular en *Streptomyces peucetius* var. *caesius*.

Figura 15.- Actividad específica de mutantes parciales de β -galactosidasa.

Figura 16.- Actividad cualitativa de β -galactosidasa en mutantes sospechosas (14, 37 y 151); mutante 168 y C cepa original (controles positivos) de *S. peucetius* var. *caesius*, en medio YMG con lactosa 20 mM y X-gal (40 μ g/ml)

Figura 17.- Crecimiento y variación de pH en mutantes parciales en MM con lactosa 27 mM.

TABLAS

Tabla 1.- Obtención de esporas de acuerdo a los diferentes medios de esporulación probados.

Tabla 2.- Colonias presentes en placas a diferentes tiempos de exposición al mutágeno.

Tabla 3.- Frecuencia de aparición de mutantes de las pruebas en MM con lactosa y 2-DOG.

RESUMEN

Con la finalidad de construir un modelo genético que nos permita probar, a nivel molecular, la unión de posibles señales metabólicas y/o macromoléculas a un promotor sensible a represión por glucosa, se planteó la necesidad de obtener mutantes de *Streptomyces peuceitius* var. *caesius* que no fueran productoras de β -galactosidasa para que en un futuro, se clone el operón *lac* por complementación de la función en este microorganismo.

Inicialmente, se requería de un medio de cultivo en el que la esporulación se presentara en proporción elevada. Cinco diferentes medios de cultivo fueron empleados; de entre ellos, la mayor abundancia de esporas se obtuvo en el medio YMG², mientras que en el medio R2YE, la esporulación fue nula. En todos los casos en que hubo esporulación, ésta resultó favorecida al mantener a los microorganismos en total ausencia de luz durante la incubación en comparación con los crecidos en presencia de luz. Se realizaron tratamientos mutagénicos a las esporas cultivadas en YMG² utilizando 3 y 1 mg/ml de N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG), en amortiguador Tris-maleatos (TM) 0.5 M, a pH 8.5 y 7.8, respectivamente. Dado que las esporas de estos microorganismos no se lograron restablecer bajo las condiciones empleadas, se tomó la decisión de trabajar con micelio. Para ello, muestras de microorganismos en esta fase del ciclo de vida fueron cultivados en medio YMB líquido suplementado con glicina para obtener una pared debilitada y posteriormente, sometido a dos ciclos de homogeneización hasta obtener un micelio finamente fragmentado. El micelio fue mutagenizado con NTG (1 mg/ml) y sembrado por plaqueo en YMG. Se cuantificaron las colonias para determinar la curva de sobrevivencia, así como la frecuencia de aparición de mutantes (número de mutantes/número de células viables). Los resultados mostraron que a los 15 min de exposición al mutágeno se presentó la mayor incidencia de mutantes, con un porcentaje de sobrevivencia del 0.075%. Posteriormente, la muestra de 15 min fue sometida a un método de enriquecimiento con ampicilina. Se obtuvieron 18 mutantes que fueron seleccionadas por su incapacidad para crecer en un medio mínimo (MM) suplementado con lactosa como única fuente de carbono. Y una mutante más, que en medio sólido YMG con lactosa 20 mM, presenta reacción al X-gal. La cepa original fue utilizada como control. Al determinar la actividad de β -galactosidasa en tres de las mutantes, éstas presentaron valores inferiores al control, es decir, las cepas obtenidas en el presente trabajo resultaron ser mutantes parciales de β -galactosidasa, con un valor promedio de actividad del 52.82% con respecto a la cepa original. Estos resultados pueden explicarse por la presencia de isoenzimas con actividad de β -galactosidasa, o bien, por una mutación que afecte parcialmente la actividad o quizás, por una mutación regulatoria. También es posible que se haya afectado el sistema de transporte de lactosa. Serán necesarios más estudios para caracterizar la β -galactosidasa de las mutantes obtenidas y de la cepa original, antes de diseñar un nuevo protocolo de mutagénesis para la búsqueda de cepas sin la enzima β -galactosidasa.

1. INTRODUCCIÓN

Los estreptomicetos al igual que todos los microorganismos requieren de nutrientes para sobrevivir. Diferentes azúcares como lactosa, glucosa, maltosa, ramnosa, rafinosa, melobiosa, galactosa, xilosa, etc. pueden ser utilizados como fuentes de carbono. Por tanto, se necesitan varias enzimas para emplear dichas fuentes de carbono y producir energía que aprovechará la célula (Madigan *et al.*, 1998). Resultaría un enorme gasto energético si la célula sintetizara simultáneamente todas las enzimas que requiere. Así, han surgido diferentes mecanismos que reprimen todos los genes que codifican a las enzimas que no son necesarias y que activan oportunamente a otros genes cuando sus productos sean requeridos. La presencia de fuentes de carbono rápidamente metabolizables como la glucosa impide tanto la transcripción como la actividad de ciertas enzimas involucradas en el metabolismo de fuentes de carbono alternativas, además de afectar también la síntesis de varios metabolitos secundarios como los antibióticos. (Demain, 1989; Segura *et al.*, 1996). De tal forma, los metabolismos primario y secundario están regulados por la disponibilidad de nutrimentos mediante un mecanismo denominado represión catabólica ejercida por la fuente de carbono. (Hueck and Hillen, 1995; Paulsen, 1996; Sauer *et al.*, 1995; Segura *et al.*, 1996; Trumbly, 1992).

Streptomyces peucetius var. *caesius* se caracteriza por presentar un ciclo de vida con una diferenciación morfo-fisiológica única dentro de las bacterias. Es un microorganismo de gran importancia para la biotecnología, ya que el producto de su metabolismo secundario, la doxorrubicina, posee propiedades farmacológicas con un espectro más amplio de actividad antineoplásica y con menos cardiotoxicidad que otros, por lo cuál es usado extensamente en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer (Arcamone *et al.*, 1969; Hershberg, 1989; Vandamme, 1984). La producción de este antibiótico y el metabolismo de fuentes de carbono alternativas se ven afectadas negativamente en presencia de altas concentraciones de glucosa (Segura, 1995; Segura *et al.*, 1996). El mecanismo por el cual se lleva a cabo la represión catabólica en el género *Streptomyces* aún no se ha comprendido del todo, aunque es diferente al que se presenta en *Escherichia coli* y bacterias Gram positivas de bajo contenido en GC como en el género *Bacillus* (Kwakman and Postma, 1994; Postma *et al.*, 1993; Postma *et al.*, 1996). Por lo anterior, se ha decidido la tarea de profundizar en el conocimiento de dicho fenómeno. Diversos autores (Angell *et al.*, 1994; Hodgson, 1982; Ingram *et al.*, 1995; Kwakwan and Postma, 1994) han sugerido la participación directa de la enzima glucosa cinasa (Glk) como una proteína clave en la expresión de dicho fenómeno regulatorio. Por el contrario, utilizando *S. peucetius* var. *caesius*, nuestro grupo de trabajo ha obtenido evidencia experimental que sugiere que es el flujo en el catabolismo de glucosa más que la Glk *per se* el responsable de la represión por glucosa (Escalante *et al.*, 1999; Ramos, 1998). Con la finalidad de construir un modelo genético que nos permita probar a nivel molecular, la unión de posibles señales metabólicas y macromoléculas a un promotor sensible a represión por glucosa, se planteó como objetivo para este trabajo, el seleccionar una mutante no productora de β -galactosidasa que en un futuro permita por complementación de la función, clonar el operón *lac* en este microorganismo.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Características del género *Streptomyces*

Anteriormente reconocidos como hongos debido a su morfología y similar papel ecológico, los actinomicetos constituyen un grupo de bacterias filamentosas en su mayoría, aunque también presentan formas unicelulares típicas. (Goodfellow *et al.*, 1983). Actualmente se han reubicado dentro del grupo de las bacterias y se les denomina *Actinobacteria* (Margulis and Schwartz, 1998). Dentro de este grupo se encuentran los estreptomicetos, cuya clasificación taxonómica según el Taxonomy Browser es la siguiente:

- Bacteria
 - Firmicutes
 - Actinobacteria
 - Actinobacteridae
 - Actinomycetales
 - Streptomycineae
 - Streptomycetaceae
 - *Streptomyces*
 - *Streptomyces peucetius* var. *caesi*us

Representantes del género *Streptomyces* se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. El nicho principal es el suelo (10^4 a 10^7 unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco) donde está generalmente en forma de esporas más que como micelio vegetativo. Su presencia esta relacionada positivamente con la materia orgánica y el agua contenida en el suelo, pero

también se encuentran en ambientes dulceacuícolas, ambientes marinos, en manglares, en el forraje y materiales relacionados, así como en el aire (Cross, 1981; Hirsch and Mc Cann-Mc Cormik 1985; Lloyd, 1969).

Los estreptomicetos son aerobios estrictos, prefieren suelos de contenido moderado de humedad y la mayoría crece óptimamente en rangos de temperaturas mesófilas 10 - 37°C (Hirsch and Mc Cann-Mc Cormik, 1985).

Los estreptomicetos pueden agruparse en 2 categorías basadas en el requerimiento de pH para su crecimiento. Los acidófilicos crecen en rangos de pH de 3.5 - 6.5 siendo el óptimo cercano a 5, mientras los neutrofílicos crecen de 5 - 9 cuyo óptimo es alrededor de 7, aunque algunos se han aislado de suelos con pH de más de 9 (Hirsch and Mc Cann-Mc Cormik, 1985).

Las características más interesantes de la biología del género *Streptomyces* corresponden al ciclo de vida (Figura 1), ya que presentan un crecimiento tipo miceliar con una diferenciación morfo-fisiológica única dentro de las bacterias; ya que la mayoría de éstas son unicelulares y se multiplican por fisión binaria (Hirsch and Mc Cann-Mc Cormik, 1985; Madigan *et al.*, 1998). Estas actinobacterias presentan un tipo de crecimiento vegetativo micelial, en el que las hifas cenocíticas crecen por extensión apical para formar un micelio ramificado (Chater, 1998). Este micelio se nutre de compuestos insolubles presentes en el suelo, mediante la secreción de una gama variada de enzimas. Una vez que los nutrientes se han agotado, comienza un complejo proceso de diferenciación morfo-fisiológica (Hirsch and Mc Cann-Mc Cormik, 1985; Madigan *et al.*, 1998). Dicho proceso comienza con el surgimiento de hifas aéreas que crecen nutriéndose de la lisis del micelio vegetativo. Posteriormente, las hifas aéreas comienzan a enroscarse (Figura 2A) y a septarse para dar lugar a la formación de cadenas de esporas (Figura 2B), que en la mayoría de los casos, al madurar

adquieren pigmentación lo que coincide con la producción de metabolitos secundarios Cabe señalar que las esporas constituyen la única etapa unicelular, ya que al germinar éstas vuelven a generar un micelio vegetativo (Hirsch and McCann-Mc Cormik, 1985; Hopwood, 1988; Servín, 1994).

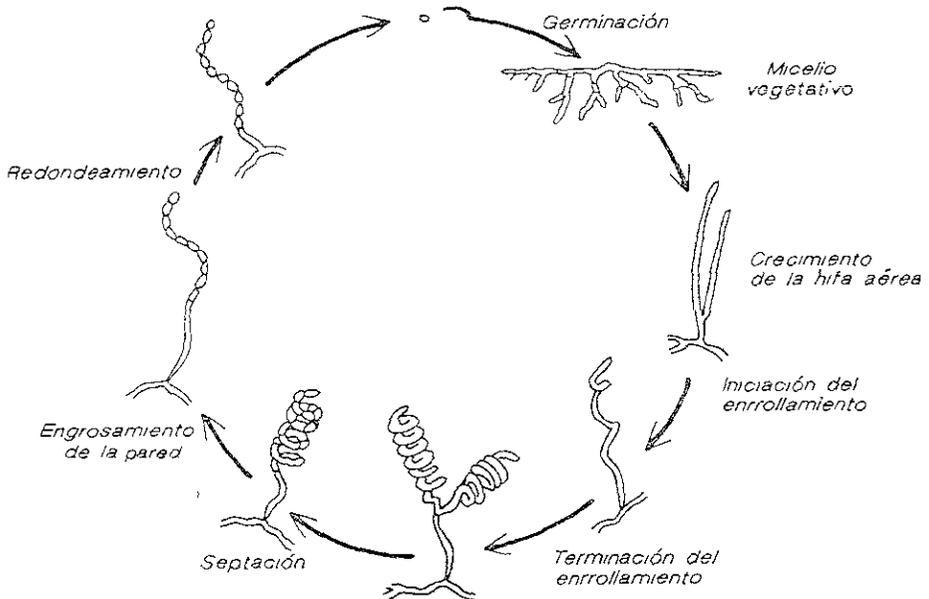


Figura 1.- Ciclo de vida de *Streptomyces coelicolor* (Hopwood, 1988) Dib. Enrique Vázquez.

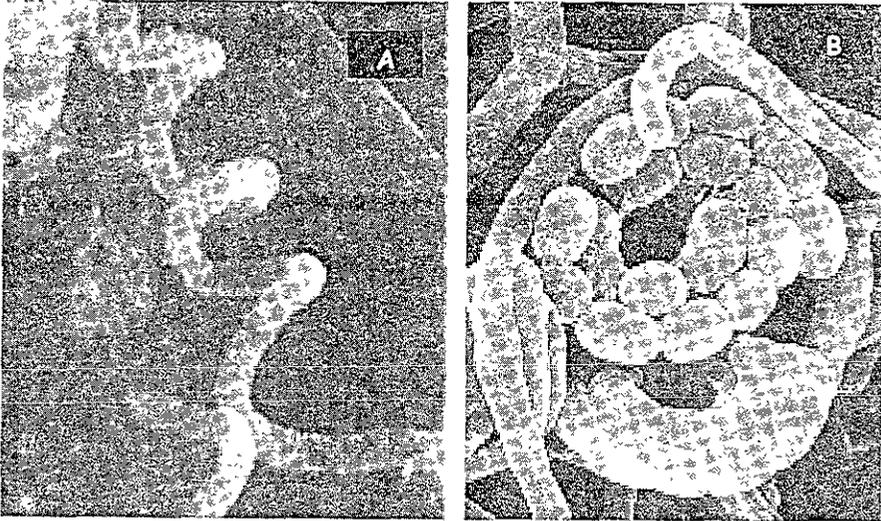


Figura 2. - A Hifa aérea enroscada de *Streptomyces* B Cadenas de esporas de *Streptomyces* , micrografías electrónicas (11000x) (Grubbs, 1998).

Los estreptomicetos poseen una estructura celular típica de bacterias, la pared celular consiste de una capa rígida de peptidoglicano compuesta por dos azúcares derivados: N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico, así como un pequeño grupo de aminoácidos; L-alanina, D-alanina, ácido D-glutámico y ya sea lisina o ácido L-diaminopimélico (L-DAP). Estos constituyentes se conectan para formar una estructura repetida, en la cual las cadenas de glicano formadas por azúcares se conectan por medio de uniones cruzadas, y que están formadas por aminoácidos. Los enlaces glucosídicos que conectan a los azúcares de las cadenas de glicano son muy fuertes. Sin embargo, estas cadenas por sí solas no pueden proveer rigidez en todas direcciones. En las bacterias Gram positivas las uniones cruzadas se llevan a cabo por interpuentes peptídicos (Figura 3). Los tipos de aminoácidos así como el número de que se componen varían entre especies (Madigan *et al.*,1998). *Streptomyces* presenta una pared celular quimiotipo I, esto

es que los mayores constituyentes son L-DAP y glicina. Además, el de peptidoglicano es tipo A3 γ en donde A implica un entrecruzamiento entre la posición 3 y 4 de dos subunidades peptídicas; 3 indica que el puente peptídico es de glicina o algún L-aminoácido monocarboxílico y γ indica que el aminoácido en la posición 3 es ácido meso-diaminopimélico (DeJong and McCoy, 1966; Goodfellow and Cross, 1983).

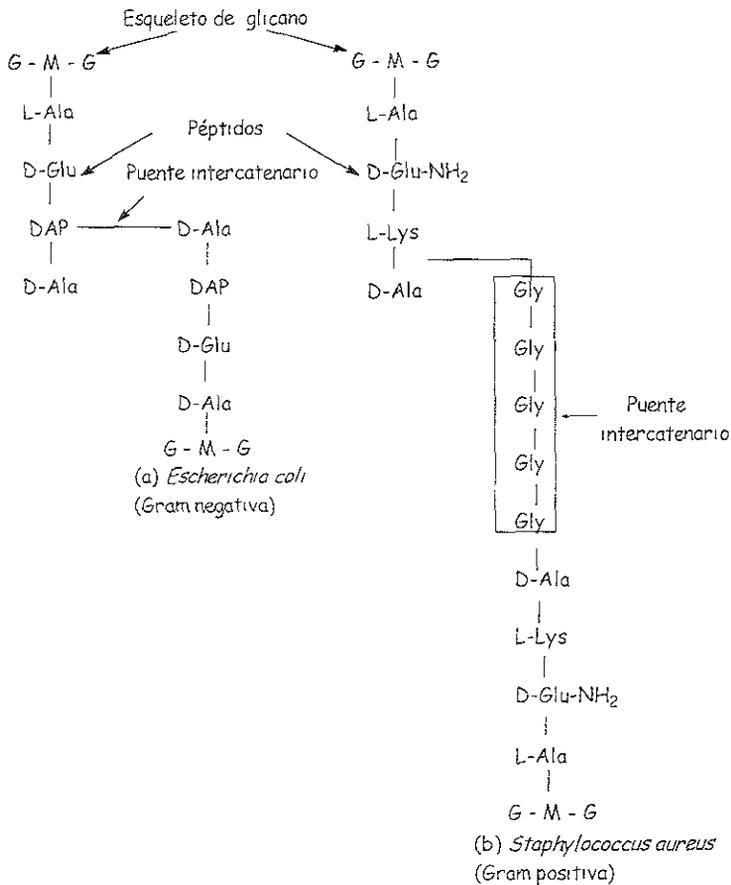


Figura 3.- Estructura de la pared celular en bacterias Gram negativas y Gram positivas. G: N-acetilglucosamina; M: ácido-N-acetilmurámico (Madigan et al., 1998).

Streptomyces pertenecen al grupo de las bacterias Gram positivas con alto contenido de guanina-citosina (GC) (72% en promedio) (Madigan et al., 1998). El material genético se encuentra distribuido en paquetes discretos a lo largo de toda la hifa, la cuál contiene numerosas copias del cromosoma. En contraste, las esporas contienen un solo cromosoma es decir son "uninucleadas" (Chen, 1996). El DNA de estos microorganismos es uno de los pocos ejemplos de cromosoma lineal en bacterias (Chen, 1996; Kolsto, 1997) y mide aproximadamente 8 Mb de longitud (Lin et al., 1993, Chen, 1995). Este posee gran inestabilidad ya que los extremos terminales del cromosoma experimentan deleciones espontáneas, con una frecuencia mayor al 0.1% en relación con las esporas cultivadas (Leblond and Decaris, 1994). Además de que estos extremos contienen secuencias repetidas invertidas y proteínas covalentemente unidas al extremo 5' (Lin et al., 1993; Lezhava et al., 1995; Leblond and Decaris, 1994; Pandza et al., 1997).

Aunada a la diferenciación morfológica existe una diferenciación fisiológica que tiene características importantes para la biotecnología, ya que es la etapa en la que se producen metabolitos secundarios y proteínas extracelulares (Demain, 1989; Segura et al., 1996). El metabolito secundario de estas actinobacterias que nos es más familiar, es un compuesto muy volátil llamado geosmina (trans-1,10-dimetil-trans-9-decalol) además de metil-lisoborneol, los cuales imparten a los suelos su olor característico a "tierra mojada" (Locci, 1989). Una proporción grande de los metabolitos secundarios poseen actividad antibiótica (de los 6000 antimicrobianos conocidos el 60.3% son producidos por estreptomicetos) aunque también se les ha empleado como antineoplásicos, pigmentos, herbicidas y surfactantes (Santana et al., 1994). La producción de enzimas extracelulares por representantes de este género, esenciales en la degradación de biomasa y la asimilación de diversas fuentes de nutrientes comprende gran variedad de

enzimas hidrolíticas extracelulares como quitinasas, celulasas, amilasas, xilanasas y proteasas. Entre los polímeros que pueden degradar se incluyen el almidón, pectina y ciertas hemicelulosas; además, aparentemente se encuentran involucrados en la biodegradación de lignina en la naturaleza. (Crandall and Hamill, 1986, Frost and Moss, 1987; Hirsch and Mc Cann-Mc Cormik , 1985; Rose, 1979; Sánchez *et al.*, 1997).

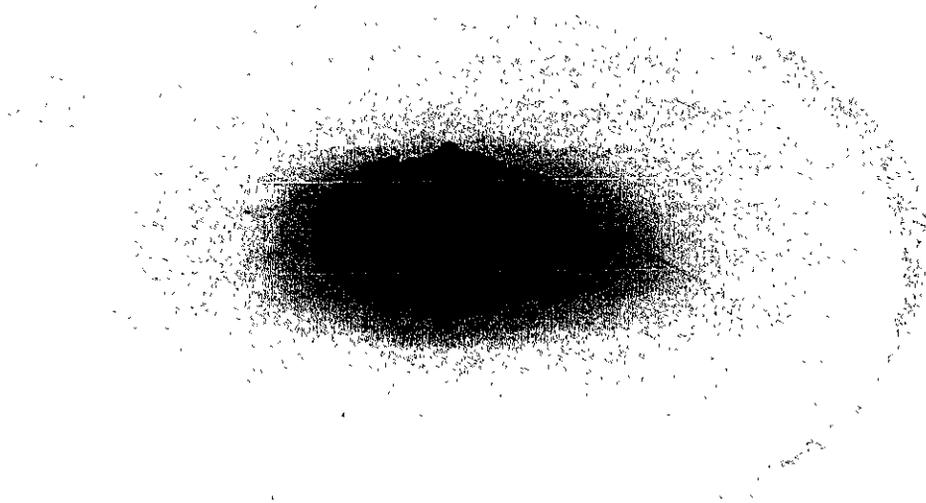


Figura 4.- Micelio aéreo de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* ATCC 27952. Tomada por José Avilés.

2.2 *Streptomyces peucetius* var. *caesius*

La variedad *caesius* de *S. peucetius* (Figura 4) fue obtenida por tratamiento mutagénico a partir de *S. peucetius* (Arcamone *et al.*, 1969) a su vez aislado de una muestra de suelo de Peucetia, una de las dos antiguas regiones de la actual Apulia al centro de Italia en 1957 y posteriormente fue descrito por Grein *et al.* (1963). Esta variedad produce un antibiótico policétido que pertenece al grupo de las antraciclina (doxorrubicina), cuya fórmula es $C_{27}H_{29}NO_{11}$ y su peso molecular corresponde a 543.54 g/mol (Figura 5) (Arcamone *et al.*, 1969; Blum *et al.*, 1974). Dicho bactericida actúa sobre Gram positivas y sólo en algunos casos sobre Gram negativas (Vánek *et al.*, 1977).

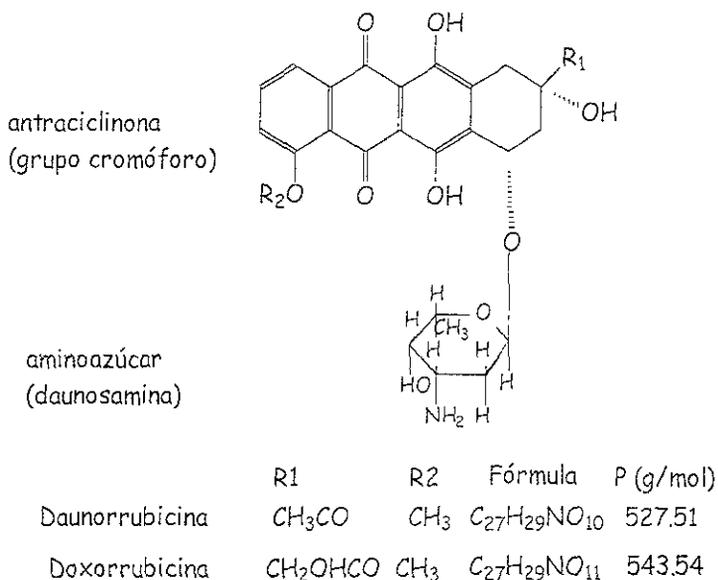


Figura 5. - Estructura química de la doxorrubicina y daunorrubicina.

No obstante, la mayor importancia de este antibiótico radica en que posee mejores propiedades farmacológicas (más amplio espectro de actividad antineoplásica y menos cardiotoxicidad) que la daunorrubicina (Figura 5), producto de su cepa padre (Arcamone *et al.*, 1998; Grein, 1987; Hershberger, 1989; Lomovskaya *et al.*, 1998; Vandamme, 1984). Se ha demostrado en células cancerosas que ambos antibióticos llevan a cabo interacciones electrostáticas con el DNA de doble cadena. Esta acción, como agentes "intercalantes", es responsable de la inhibición de la síntesis de DNA y RNA (Di Marco *et al.*, 1975). A nivel celular esto se traduce en la inhibición de la mitosis. También se ha reportado la inducción de rompimientos en el DNA (Simpkins *et al.*, 1984; White and Strohane, 1984) y es posible la existencia de un mecanismo adicional, ya que este compuesto es citotóxico para las células de leucemia sin necesidad de entrar a éstas (Tritton and Yee, 1982).

En la actualidad la doxorrubicina se comercializa como doxorrubicina liposomal (DOXIL®) ya que el clorhidrato de doxorrubicina es encapsulado en liposomas (STEALTH®) para su administración intravenosa, el cual muestra ser efectivo en una variedad de tumores. De hecho este antibiótico ha sido aprobado por la FDA (Food and Drug Administration, de los Estados Unidos) para tratamiento del sarcoma de Kaposi (Mallery, *et al.*, 1999; Nasti *et al.*, 1999; Newell, *et al.*, 1998).

Se sabe que en *S. peucetius* var. *caesius* la producción de antraciclina se lleva a cabo en presencia de diversas fuentes de carbono como glucosa, manosa, celobiosa, lactosa, fructosa, maltosa y almidón, siendo la primera, la fuente más empleada en la producción de antibióticos (Dekleva *et al.*, 1985). La producción de metabolitos primarios y secundarios, se encuentra regulada tanto por fuentes de carbono (Demain, 1989; Hodgson, 1982; Segura *et al.*, 1996), como por nitrógeno y

2.3 El fenómeno de represión catabólica ejercida por la fuente de carbono

En bacterias y microorganismos eucariontes, los genes que codifican vías metabólicas para fuentes de carbono alternas como lactosa, glicerol o maltosa, están inducidos específicamente por sus respectivos sustratos (Hindle and Smith, 1994). Sin embargo, si una fuente de carbono rápidamente metabolizable como la glucosa, está presente en el medio, la síntesis de enzimas catabólicas alternativas se reprime. Este mecanismo conocido ya desde hace más de 90 años citado por Ronne (1995) (Epps and Gale, 1942; Monod, 1947) es llamado represión catabólica ejercida por la fuente de carbono, lo que evita la producción innecesaria de metabolitos intermediarios comunes (Magasanik, 1961). De tal modo que se asegura la utilización organizada y secuencial de las diversas fuentes de carbono presentes en el medio. Utiliza primero la glucosa, con lo cual coordina el metabolismo de las fuentes de carbono y energía alternas, maximizando así su eficiencia. (Postma *et al.*, 1993; Saier *et al.*, 1996; Wanner *et al.*, 1978).

2.3.1 Represión catabólica en bacterias Gram negativas.

El fenómeno de represión catabólica es un mecanismo de regulación que se encuentra ampliamente distribuido entre los seres vivos. Sin embargo, el organismo donde mejor se ha caracterizado es en *E. coli* (Figura 6) En esta bacteria el metabolismo de carbono está regulado por el sistema de transporte de fosfotransferasa (PTS) dependiente de fosfoenol piruvato (PEP) (Saier, 1989; Saier *et al.*, 1995). El PTS es un sistema de transporte de más de 20 diferentes carbohidratos, en donde se usa el PEP como el donador de fosforilo en una reacción dependiente de ATP que involucra al menos dos proteínas, la enzima EI

(I) y la proteína de histidina (HPr) (Postma *et al.*, 1993; Saier *et al.*, 1989). En este sistema la proteína específica para glucosa (IIA^{glc}), funciona como un efector alostérico que controla dicho mecanismo uniéndose en su forma no fosforilada a permeasas de carbohidratos (p. ej. permeasas transportadoras de lactosa-H⁺). La enzima IIA^{glc} se fosforila reversiblemente en un residuo de histidina por la enzima I y la HPr del PTS, regulando positivamente la actividad de la adenilato ciclasa lo cuál produce un aumento de niveles intracelulares en el AMP cíclico (cAMP) (Saier, 1989). Se ha visto que estos niveles de cAMP inducen la síntesis de muchas enzimas catabólicas sensibles a represión. Dicha molécula se une a una proteína represora de catabolito (CPR) y actúa sobre los promotores de muchos genes promoviendo así su transcripción. (Botsford *et al.*, 1992; Ishiuka *et al.*, 1993; Kolb *et al.*, 1993). Por tanto, el PTS es un sistema que domina y regula la actividad de otros transportadores de carbohidratos presentes en la célula (Saier, 1989; Saier *et al.*, 1995).

2.3.2 Represión catabólica en bacterias Gram positivas.

Las bacterias Gram positivas se dividen en dos grandes grupos: las de bajo y las de alto contenido de GC. Dentro del primer grupo, *Bacillus subtilis* ha servido como organismo modelo en el estudio de la regulación del metabolismo de carbono (Figura 7). En este grupo se ha observado la presencia de tres elementos importantes: en primer lugar un factor de transcripción llamado proteína A de control del catabolito (CcpA) homólogo a varias proteínas represoras; en segundo, secuencias consenso presentes en el DNA, llamadas elementos de represión catabólica (CRE) y por último la proteína HPr del sistema fosfoenolpiruvato fosfotransferasa para el transporte de azúcares (Hueck and Hillen, 1995; Saier

et al., 1995). El modelo del mecanismo de represión catabólica en *B. subtilis*, propone que la producción de intermediarios metabólicos como fructosa 1,6-bisfosfato (FBP) o 6-fosfogluconato y 2-fosfoglicerato, resultado del metabolismo de las fuentes de carbono represoras, inducen la activación de una cinasa que fosforila a la HPr en su serina 46. La HPr fosforilada se une y activa a la proteína CcpA produciendo un aumento en su afinidad por los CRE presentes en las regiones reguladoras de los operones sensibles a represión. Este complejo formado entre la CcpA activada y el DNA, podría retardar o bloquear la transcripción de diversos genes uniéndose a los CRE presentes en la regiones reguladoras de los operones sensibles a represión y en conjunto con otras moléculas efectoras (Hueck and Hillen, 1995; Miwa *et al.*, 1997; Saier *et al.*, 1995).

Aunque las especies de *Streptomyces* son capaces de utilizar un gran número de carbohidratos para su crecimiento, el conocimiento de rutas metabólicas de carbohidratos así como su regulación son aún limitados (Romano, 1986; Saier, 1996). En *Streptomyces*, diversas fuentes de carbono afectan la expresión de genes involucrados en utilización de fuentes de carbono alternativas (Hodgson, 1982; Mattern *et al.*, 1993; Smith and Chater, 1988), en la síntesis de enzimas y metabolitos secundarios, así como en el transporte de carbohidratos (Hodgson, 1982; Delic *et al.*, 1992; Segura *et al.*, 1996; Servín *et al.*, 1994).

Se ha detectado en algunos estreptomicetos (*Streptomyces coelicolor*, *S. griseofuscus* y *S. lividans*) el sistema fosfotransferasa (PTS) dependiente de fosfoenol piruvato (PEP) solamente para fructosa (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). Se sabe que el mecanismo de represión catabólica por fuente de carbono

es considerablemente diferente al que existe en *E. coli* y en bacterias Gram positivas de bajo contenido en GC como *B. subtilis* (Postma *et al.*, 1993; Postma *et al.*, 1996), debido a la ausencia de fluctuaciones en los niveles de cAMP con el cambio de fuente de carbono en *Streptomyces coelicolor* (Hodgson, 1994) y *Streptomyces venezuelae* (Gersh *et al.*, 1980; Chatterjee and Vining, 1982).

Para el estudio de este mecanismo de regulación Hodgson (1982) aisló mutantes de *S. coelicolor* por su habilidad para crecer en lactosa y en presencia de un análogo de la glucosa, la 2-desoxiglucosa (2-DOG) las cuales fueron resistentes al fenómeno de represión catabólica. Estas mutantes mostraron bajos niveles de actividad de la enzima glucosa cinasa dependiente de ATP (Glk), que es la responsable de la fosforilación de la glucosa, además de que fueron incapaces de utilizar glucosa, no obstante, el transporte de este carbohidrato no se encontró afectado (Hodgson, 1982; Segura *et al.*, 1996).

Angell y colaboradores (1992), en experimentos de restitución de la función de mutantes deficientes de Glk (glk⁻), encontraron un fragmento de 2.9 Kb que contiene un marco de lectura abierto parcial (ORF1) y dos marcos de lectura abiertos completos (ORF2) y (ORF3) que codifican para proteínas de 20.1 y 33.1 kilodaltones (kDa) respectivamente. Esta última, codifica para la glucosa cinasa (Glk) de *S. coelicolor*. Se ha observado que el *glkA*-ORF3 por sí solo, restablece la actividad de Glk, la utilización de glucosa, al igual que la sensibilidad a 2-DOG y la represión catabólica de diversos genes como el *dagA*, que codifica para una agarasa extracelular, en las mutantes de *S. coelicolor* resistentes a 2-DOG (Angell *et al.*, 1992). Sin embargo, para alcanzar los niveles de la actividad de Glk encontrados en la cepa silvestre, es necesaria la expresión tanto del *glkA*-ORF3 como del *glkA*-ORF2. Además, la secuencia del ORF2 es transcrita junto con el resto de *glkA*, por lo que se ha pensado que posee algún papel en el metabolismo

de glucosa y sugiere que esta funcionalmente relacionado y de cierta manera sujeto a expresión coordinada. Además se ha observado que el ORF2 codifica una proteína involucrada tanto en el transporte de glucosa como en su metabolismo. Por último, el producto del fragmento *glkA*-ORF3 muestra varias secciones de las secuencias de aminoácidos que son similares a las encontradas en una familia de proteínas como la proteína represora de la síntesis de N-acetilglucosamina (NagC) de *E. coli* y la represora de la síntesis de xilosa (XylR) de *B. subtilis*. Sin embargo, la Glk de *S. coelicolor* carece de un extremo N-terminal con dominios de unión a DNA, que están presentes en dichas proteínas represoras (Titgemeyer *et al.*, 1994).

Posteriormente, Angell y colaboradores (1994) aislaron a partir de mutantes de *S. coelicolor* (que presentan una delección en el fragmento *glkA*-ORF3) cepas capaces de utilizar glucosa y presentar niveles de Glk similares a los de la cepa original (denominadas mutantes supresoras). Observaron que estas nuevas mutantes presentan una segunda actividad de glucosa cinasa (Glk-II), ya que en un zimograma mostró un corrimiento electroforético diferente al presentado por la actividad de la cepa original. Con esta segunda actividad se restablece la sensibilidad a 2-DOG, la utilización de glucosa, pero no la sensibilidad del gen *dagA* a la represión catabólica. Además, mediante experimentos de transformación con la Glk de *Zymomonas mobilis*, se recupera la utilización de glucosa, la actividad de Glk, pero no la represión catabólica por glucosa del gen de agarasa (Angell *et al.*, 1994). Además la sobre-expresión de este gen en mutantes de *S. coelicolor* con una delección en *glkA*, no restablece la represión por glucosa sobre el gen *dagA*, este resultado sugiere que la fosforilación de glucosa por sí sola no es suficiente para la represión catabólica y por tanto *glkA*-ORF3 juega un

papel importante en la represión por glucosa en este organismo (Angell *et al.*, 1994; Kwakman and Postma, 1994).

Aunque el papel de la Glk en el fenómeno de represión por fuente de carbono no se ha esclarecido, existen evidencias que indican que posiblemente éste sea independiente de la actividad catalítica (fosforilar glucosa a glucosa 6-fosfato) que realiza y que posea también una propiedad represora adicional que le permita actuar sobre los operones sensibles a regulación por carbono, impidiendo su transcripción. O bien, que sea la Glk capaz de unirse a algún otro factor proteico de unión a DNA, formando un complejo represor que actúe al nivel de transcripción de los genes sensibles a la represión catabólica (Kwakman and Postma, 1994).

Podrían participar conjuntamente con la Glk diversos intermediarios productos del metabolismo de las fuentes de carbono, (la glucosa-6-fosfato, la fructosa-1,6-bifosfato, o bien nucleótidos de importancia en el mantenimiento y balance de los niveles de energía celular, es decir ATP, ADP, etc) como inductores considerando que una de las funciones del fenómeno de represión catabólica es mantener los niveles de energía idóneos en la célula (Figura 8) (Escalante *et al.*, 1999).

Se ha visto que la utilización de diversas fuentes de carbono es comúnmente ejercida por diferentes mecanismos regulatorios. Por ejemplo el operón de lactosa está controlado por glucosa a dos niveles: por exclusión del inductor y por represión catabólica. El transporte de lactosa por la permeasa *lac* es inhibido por glucosa, un fenómeno conocido como exclusión del inductor. El segundo mecanismo mediante el cual la glucosa afecta el operón es a través de la represión catabólica (Wong *et al.*, 1997).

Por último, se está estudiando la utilización de diversas fuentes de carbono en *S. coelicolor* como modelo para investigar mecanismos de la regulación de las mismas. Así, la ruta del catabolismo de glicerol está determinada por el operón *gy/ABX*, el cual contiene dos promotores que son inducibles por glicerol y son reprimidos por glucosa. Además se ha visto que la unidad de transcripción *gy/R* contiene un marco de lectura abierto que codifica para una proteína de peso molecular de 27600 Da. Esta proteína posee una región que es similar a los dominios hélice-vuelta-hélice de ciertas proteínas de unión a DNA. La transcripción de *gy/R* es también inducible por glicerol pero es poco reprimible por glucosa (Hindle and Smith, 1994; Smith and Chater, 1988).

Por tanto, el interés en estudiar los mecanismos que controlan la expresión de diversos operones en el género *Streptomyces*, ayudarán a dilucidar este fenómeno y diferenciarlo de otras bacterias como *E. coli* y *B. subtilis*.

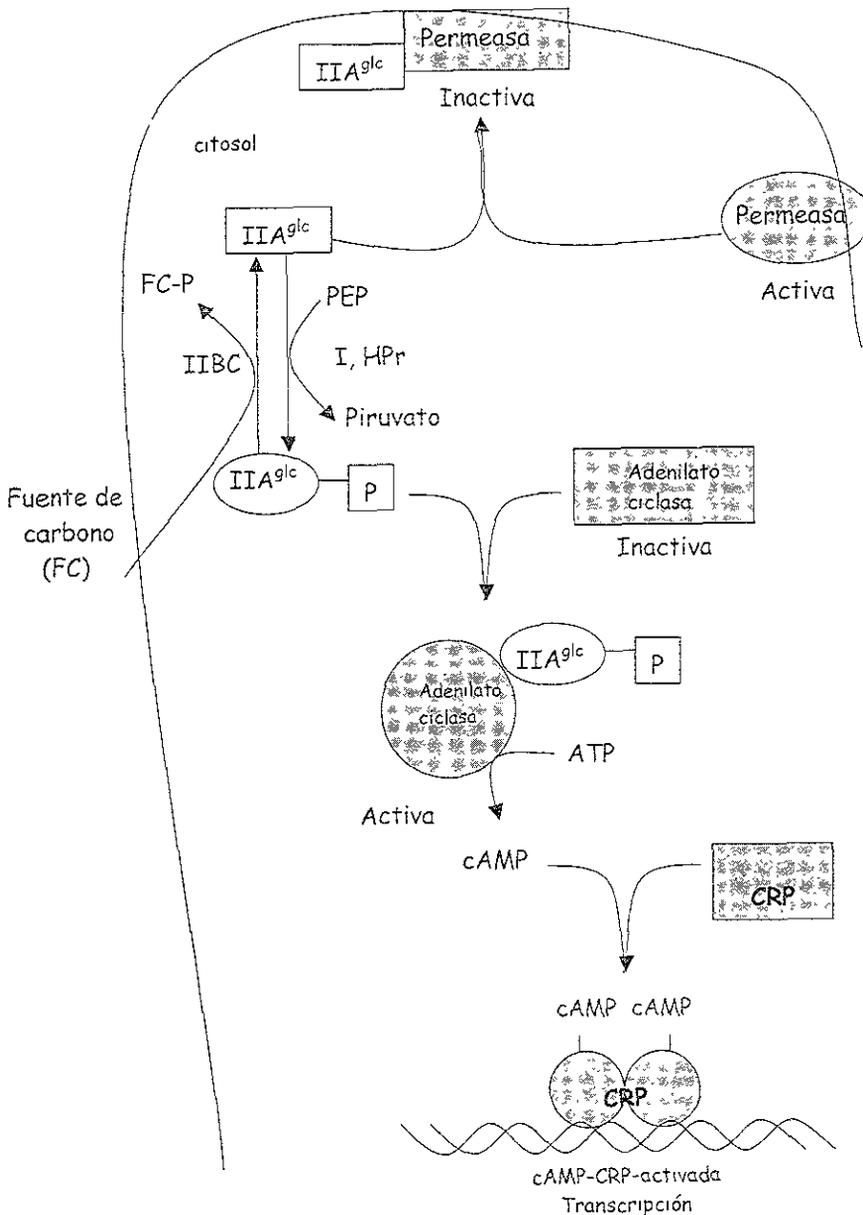


Figura.- 6 Mecanismo propuesto para la regulación del metabolismo de carbono en *E. coli*. PEP: fosfoenol piruvato. I y HPr: enzimas acopladas a energía del sistema de transporte de azúcares dependiente de PEP. IIA^{glc}: efector alostérico (enzima glucosa específica). IIBC: enzima membranal de transporte específica para el carbohidrato. P. grupo fosfato. CRP: proteína receptora de cAMP (Modificado de Ramos, 1998).

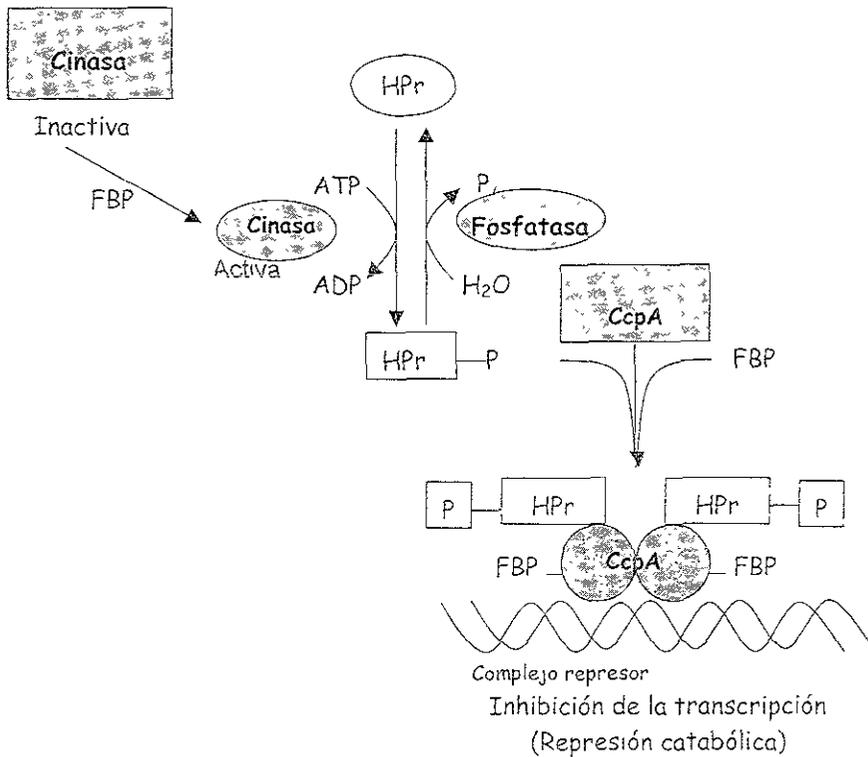


Figura 7.- Modelo del mecanismo de represión catabólica propuesto para *B. subtilis*. HPr: proteína constituyente del sistema de transporte (PTS) de azúcares dependiente de fosfoenol piruvato (PEP). FBP. fructosa 1,6-bisfosfato. CcpA factor de transcripción homólogo a proteínas represoras. (Tomado de Ramos, 1998)

POSIBLES SEÑALES A
LA REPRESIÓN
CATABÓLICA:

- Glucosa-6-P
- Fructosa-6-P
- Galactosa-6-P
- Arabinosa-5-P
- Fructosa-1,6-diP
- ATP
- ADP
- etc.

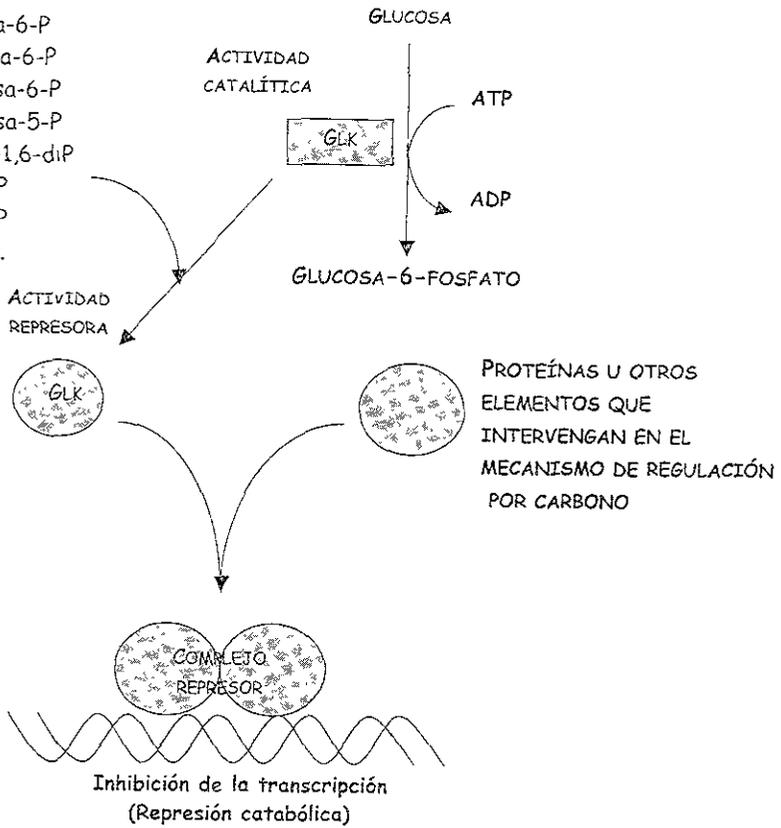


Figura 8.- Modelo hipotético del fenómeno de represión catabólica ejercida por la fuente de carbono en *Streptomyces peucetius* var. *caesius* (Tomado de Ramos,1998)

2.4 El operón de lactosa (operón *lac*)

La expresión génica en procariontes puede ser controlada a dos niveles: en la transcripción del DNA a RNA, en donde muchos genes son regulados y controlados y en la traducción del RNA a proteínas (Lewin, 1997).

En dichos organismos es común que el conjunto de genes distintos se encuentran estructurados en un operón. Se sitúan en serie y son controlados por una región reguladora común (Palmer, 1985). El mensaje producido por un operón es policistrónico es decir, la expresión de todos los genes reside en una sola molécula de mRNA (Madigan et al, 1998).

El lugar más factible para regular la transcripción se encuentra en o alrededor de la región promotora del operón. Controlando la habilidad de la **RNA polimerasa** (RNAPol) para unirse al promotor. Una vez unido, para transcribir genes estructurales, la célula es capaz de modular la cantidad de mensaje que puede ser producido y por lo tanto la cantidad de productos de genes eventualmente sintetizados (Moat and Foster, 1988). Las secuencias adyacentes a la región codificante están involucradas en su control y son llamadas regiones reguladoras. Estas regiones están constituidas de un **promotor**, donde inicia la transcripción y la región del **operador** que es el sitio donde se une una proteína reguladora. Estas proteínas cuando previenen la transcripción (control negativo), son denominadas represoras; o bien, en el caso contrario, cuando incrementan la transcripción (control positivo) se les conoce como activadoras. Ambos tipos de proteínas requieren de efectores unidos a moléculas tales como azúcares o aminoácidos para su actividad (Madigan *et al.*, 1998). Dado que un operón esta bajo control negativo o positivo, puede ser referido como reprimible o inducible (Lewin, 1997).

El primero de estos sistemas de control conocido y que se ha revisado en este trabajo, es decir, el operón *lac* fue investigado detalladamente en *E. coli*, por Jacob y Monod en 1965 y gracias a su hallazgo, ganaron el premio Nobel (Palmer, 1985).

El operón *lac* es el responsable de la utilización de lactosa como fuente de carbono. La lactosa es un disacárido compuesto de glucosa y galactosa. En *E. coli* el producto del gen *lacZ* es la β -galactosidasa, la cual rompe el enlace β -1,4 de la lactosa liberando a los monosacáridos (Figura 9). La enzima es un tetrámero de 4 subunidades idénticas con un peso molecular de 116,400 Daltones (Da) cada una. La entrada de lactosa a la célula requiere de la permeasa *lac* (46,500 Da) la cuál es el producto del gen *lacY*. La permeasa es hidrofóbica y probablemente funciona como dímero. Mutaciones en cualquiera de los genes *lacZ* o *lacY* en *E. coli* son fenotípicamente Lac⁻, así las mutantes no pueden crecer en lactosa cuando se dispone como única fuente de carbono. El gen *lacA* codifica para tiogalactósido transacetilasa que es una proteína dimérica (30,000 Da por subunidad) a la cual no se le ha asignado un papel importante (Lewin, 1997). El promotor se conoce como *lacP*, en tanto que el operador como *lacO*. El gen *lacI* codifica para una proteína tetramérica represora de 38,000 Da por subunidad. El operador contiene alrededor de 28 pb y esta adyacente al gen *lacZ* (Dawes and Sutherland, 1993).

La inducción del operón *lac* ocurre cuando las células se cultivan en presencia de lactosa. El bajo nivel de la β -galactosidasa presente en las células convierte a la lactosa en alolactosa, esto es, que el residuo galactosilo está presente en la posición seis en lugar de la cuarta posición de la glucosa. Alolactosa es justamente el inductor del operón. El represor (*lacI*) es una molécula alostérica con distintos sitios de unión al DNA y al inductor. La unión del inductor al represor puede

ocurrir si el represor está libre en el citoplasma o unido al DNA (Dawes and Sutherland, 1993).

La unión del inductor al represor modifica alostéricamente al represor, disminuyendo así su afinidad por el DNA de *lacO*. Una vez que el represor es removido de *lacO*, procede la transcripción de *lacZYA*. Por tanto, el operón *lac* es un sistema inducible controlado negativamente (Wong *et al.*, 1997).

Se sabe que el operón de la lactosa está controlado por glucosa a dos niveles: i) el transporte de lactosa se inhibe por la presencia de la glucosa, exclusión del inductor, ii) por otro lado, se lleva a cabo la represión catabólica.

En presencia de glucosa y lactosa, la unión de la proteína represora no se lleva a cabo ni tampoco la activación del promotor. En ausencia de ambas el promotor se activa pero el operador se reprime. En ausencia de lactosa y presencia de glucosa ambas influencias negativas ocurren. La transcripción del operón *lac* ocurre solo cuando la célula realmente lo requiere es decir, cuando la lactosa esta presente y no hay de ningún modo glucosa disponible (Palmer, 1985).

Existen diversas mutaciones reguladoras que han sido identificadas en el operón *lac* y que sirven para ilustrar los conceptos generales de la expresión de genes. Mutaciones en el locus *lacI* pueden dar tres fenotipos: i) que no haya represor o que éste no sea funcional, lo cual llevará a un constante mensaje de síntesis de *lacZYA* en donde el inductor puede estar presente o no (expresión constitutiva); ii) la producción de un super represor, incrementa unión al operador y/o propiedades de unión al inductor disminuidas, estas mutaciones resultan en un operón *lac* no inducible y iii) que *lacI* contenga su propio promotor distinto del *lacP* (Dawes and Sutherland, 1993).

Recientemente, se estudian estos mecanismos de regulación en el género *Streptomyces* (Smith and Chater, 1988). Se sabe que *S. coelicolor* no utiliza

lactosa muy eficientemente y que su β -galactosidasa es una enzima extracelular muy grande (Burnett *et al.*, 1985). Esto aunado a que aparentemente es incapaz de consumir X-gal y que la enzima de *E. coli* posee pobre estabilidad estructural, así como deficiente expresión del gen *lacZ* en *Streptomyces spp.*, ha interferido con el uso de *lacZ* como gen reportero para *Streptomyces spp.* Sin embargo, diversos estudios de la expresión de *lacZ* en *S. lividans* y *S. coelicolor* fueron facilitados por el uso de mutantes y/o condiciones de crecimiento en donde la actividad de β -galactosidasa endógena está baja o ausente (King and Chater, 1986).

Además, se ha clonado, identificado y parcialmente secuenciado el gen que codifica para una β -galactosidasa extracelular de 130 kDa en *S. lividans*. Observaron también que la producción de β -galactosidasa depende de la presencia de secuencia señal y que es ésta la proteína principal en los sobrenadantes de los cultivos y extractos de cepas que expresan el gen clonado de β -galactosidasa (Eckhardt *et al.*, 1987).

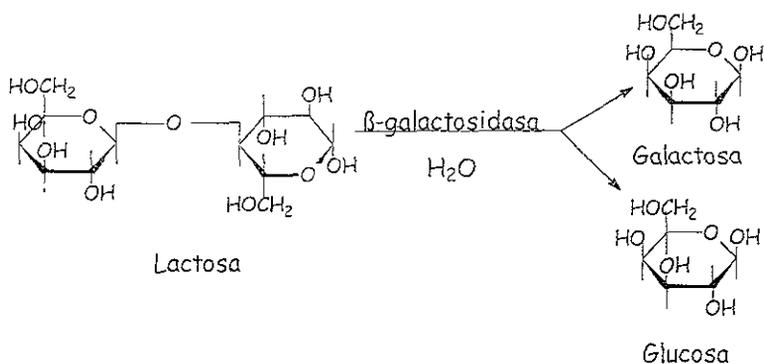


Figura 8.- Modo de acción de la enzima β -galactosidasa.

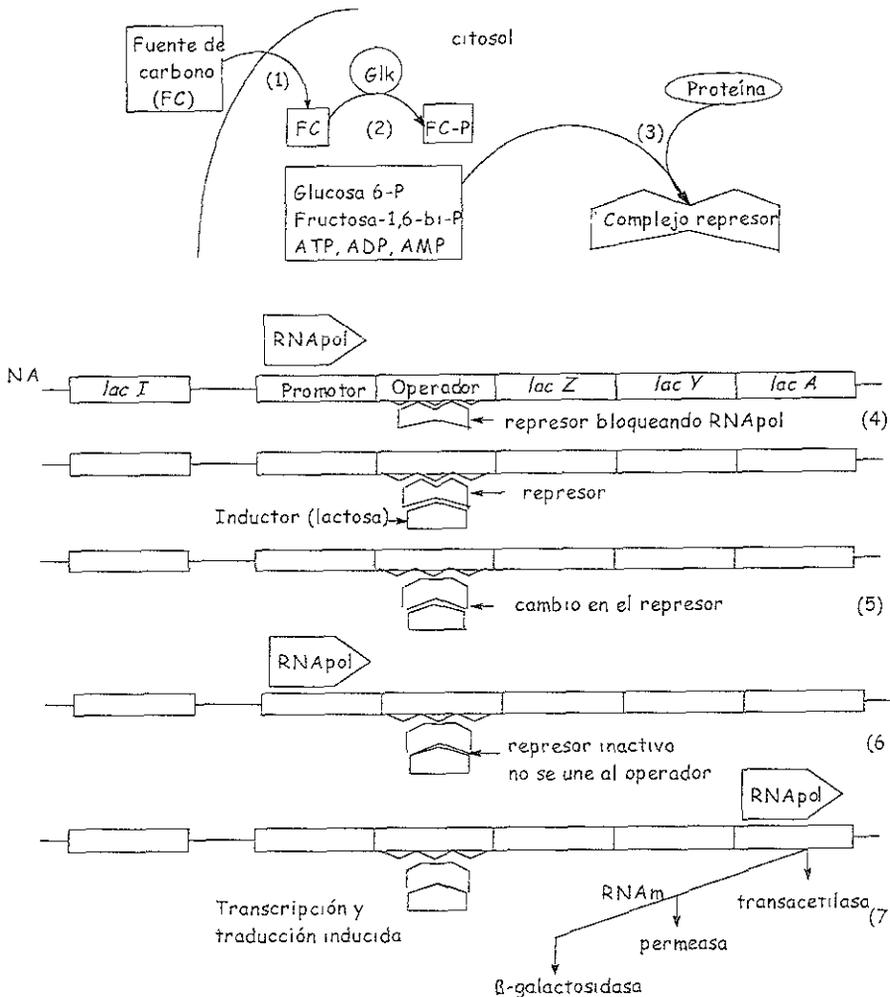


Figura 9.- Esquema hipotético del fenómeno de represión catabólica sobre el operón de lactosa en *Streptomyces peucetius* var. *caesiuis*. Una vez que la fuente de carbono es introducida a la célula (1) se fosforila por medio de la enzima glucosa cinasa (Glk)(2). La combinación de alguno de los intermediarios metabólicos unidos a una proteína, forman un complejo represor (3) que se une a la región del operador, bloqueando a la RNA polimerasa (RNApol) (4). Cuando el inductor (lactosa) está presente, se une al represor y cambia su forma (5), así el represor no puede unirse a la región del promotor (6) y la RNApol transcribe los genes estructurales produciendo las 3 enzimas (7).

3. ANTECEDENTES

Se sabe que diversas fuentes de carbono (almidón, glucosa, sacarosa, melazas, etc) son comúnmente usados para la producción de metabolitos primarios (ej. enzimas) y metabolitos secundarios (ej. antibióticos) (Frost and Moss, 1987; Rose, 1979). Sin embargo, con frecuencia su producción se ve limitada debido al fenómeno de represión catabólica ejercida por la fuente de carbono, en donde los mecanismos responsables son diferentes entre los diversos microorganismos (Paulsen, 1996; Saier *et al.*, 1995).

En *S. peucetius* var. *caesius* la utilización de diversas fuentes de carbono, así como la síntesis de metabolitos secundarios es reprimida por glucosa (Demain, 1989; Hodgson, 1982; Segura *et al.*, 1996). Mutantes de esta variedad de microorganismo (2-dog^R), aisladas por su habilidad de crecer en lactosa en presencia de un análogo de glucosa, 2-desoxiglucosa (2-DOG), resultaron ser insensibles (resistentes) al fenómeno de represión y presentaron bajos niveles de Glk, entre 12.5% y 33% con relación a la actividad encontrada en la cepa original. En dichas mutantes la síntesis de β -galactosidasa, D-xilosa isomerasa y la producción de antraciclinas totales resultaron también ser insensibles a la represión por glucosa (Segura *et al.*, 1996).

Otras fuentes de carbono diferentes a la glucosa como la arabinosa, galactosa y glutamato, que no son metabolizables vía Glk, también ejercen el fenómeno de represión en estas mutantes resistentes a 2-DOG (2-dog^R), sugiriendo algún tipo de relación entre la actividad de la Glk y la sensibilidad a la represión por carbono como se ha visto en otras especies de *Streptomyces* (Segura *et al.*, 1996; Kwakman and Postma, 1994).

Con el fin de determinar si el transporte de diferentes fuentes de carbono represoras se encontraba afectado en mutantes 2-dog^R, se cuantificó la incorporación de glucosa, galactosa, arabinosa y glutamato marcados con ¹⁴C tanto en la mutante 2-dog^R-21 como en la cepa silvestre. La mutante 2-dog^R-21 transportó sólo un 52% de la glucosa incorporada por la cepa original en el sistema inducido (en donde el microorganismo fue crecido en presencia de la fuente de carbono de la que se determinaría el transporte) además, el transporte de galactosa y arabinosa por la mutante fue de 38 y 18.6% respectivamente, comparada con el transporte de dichos carbohidratos en la cepa original. De tal modo que el transporte de estos tres azúcares (glucosa, galactosa y arabinosa) mostró ser estimulado específicamente por la fuente de carbono, tanto en la cepa original como en la mutante 2-dog^R-21, en cambio el transporte de glutamato no se vio afectado con la disminución de la actividad de Glk en la mutante 2-dog^R-21 (Segura *et al.*, 1995; Ramos, 1998).

Al crecer las cepas en ausencia de la fuente de carbono inductora, sistema no inducido (crecer en una fuente de carbono diferente a la que se le determinaría el transporte) la incorporación de las fuentes de carbono se vio abatida, lo cual a diferencia de lo reportado por Hodgson (1982) para *S. coelicolor* nos indica que los sistemas de transporte para dichas fuentes de carbono fueron estimulados específicamente. Así, se concluyó que la enzima Glk no fue responsable de la incorporación de los carbohidratos en estas cepas (Ramos, 1998).

Los trabajos que actualmente se realizan en nuestro laboratorio en cuanto a la purificación y caracterización de la enzima Glk son de gran ayuda para establecer su papel en el fenómeno de represión catabólica por la fuente de carbono en el género *Streptomyces*.

Para determinar el papel de la Glk en dicho fenómeno se aislaron nuevas cepas a partir de la mutante 2-dog^R-21 que hubieran recuperado su sensibilidad a 2-DOG.

Así, dos de las cepas aisladas fueron resistentes a represión por fuente de carbono (glucosa, galactosa y arabinosa) sobre la producción de antraciclinas totales denominadas 2-dog^R-2 y 2-dog^R-11 (Ramos, 1998).

En estas mutantes se detectó que la actividad de la Glk fue incrementada en 15% en comparación a la mutante 2-dog^R-21. La mutante 2-dog^R-2 presenta una actividad de 35% mientras que la cepa 2-dog^S-11 muestra 84% y ambas resultan ser resistentes a represión catabólica por carbono. Por el contrario, la cepa 2-dog^S-53 presenta una actividad de Glk de 28% y es sensible a represión catabólica. Por lo que no existe una relación aparente entre la actividad de la Glk, los niveles de transporte de azúcares y la sensibilidad a represión catabólica por la fuente de carbono en las cepas estudiadas (Ramos, 1998) (Apéndice 2).

Sin duda alguna, todos estos trabajos contribuyen a la obtención de mayor información acerca del fenómeno de represión catabólica por fuente de carbono, en esta variedad de microorganismo.

4. JUSTIFICACIÓN

El presente trabajo tiene como finalidad obtener una cepa no productora de β -galactosidasa de *S. peucetius* var. *caesius*. Considerando que ésta enzima es codificada por una región de DNA que forma parte del operón de lactosa, el cual es sensible a represión catabólica, su estudio aportará bases para una mejor comprensión de este mecanismo de regulación.

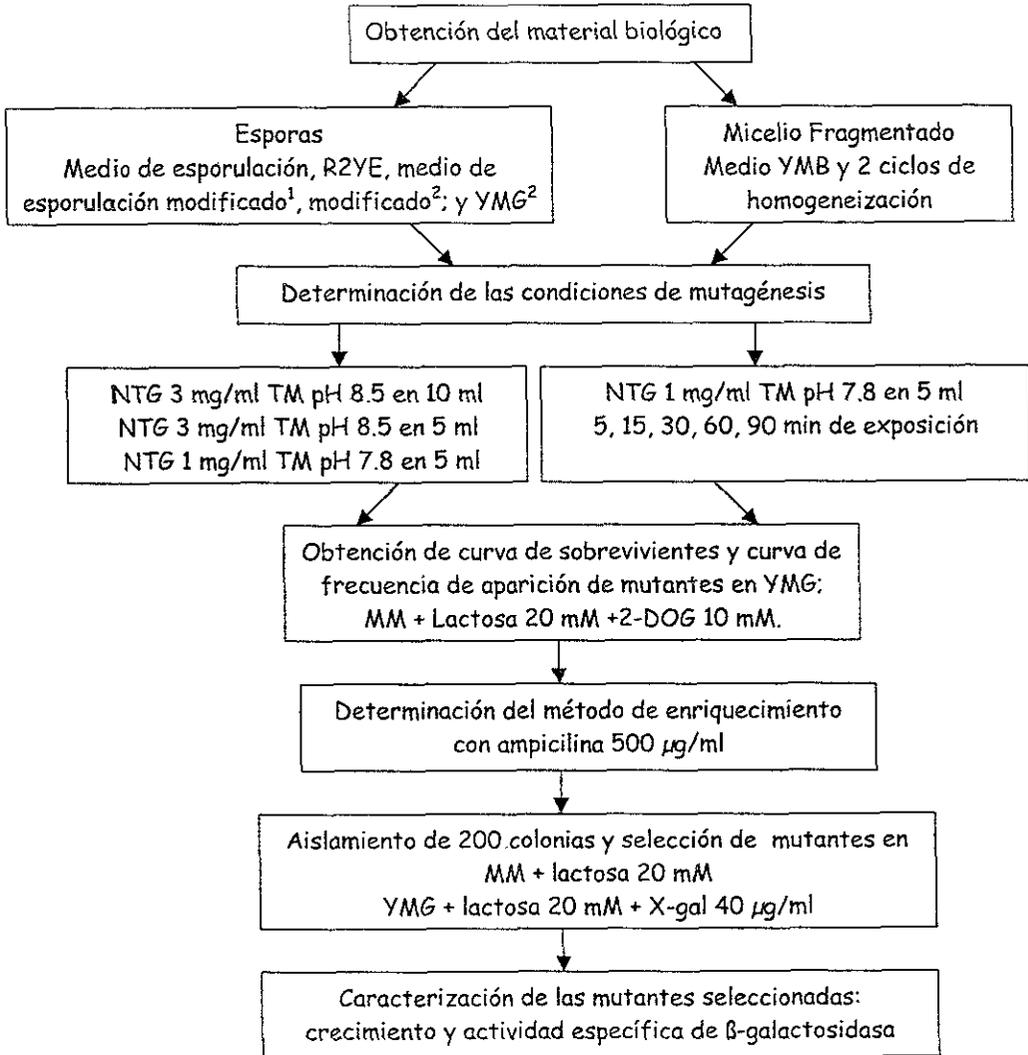
En nuestro grupo de trabajo, de manera paralela, se están realizando estudios de purificación y caracterización de la enzima Glk; además, se busca identificar las señales catabólicas que pudieran participar en regiones reguladoras del DNA. Todo ello con el propósito de disponer de un sistema que permita hacer ensayos en dicha región (operador) y probar si la Glk combinada con alguna señal metabólica sea la responsable de unirse a DNA.

De la misma manera que los anteriores, el presente trabajo profundizará tanto en el conocimiento de fenómeno de represión catabólica ejercida por la fuente de carbono en *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, como en el estudio de las bases bioquímicas y moleculares de dicho proceso regulatorio. Por consiguiente, para iniciar este trabajo se propone el siguiente objetivo:

5. OBJETIVO GENERAL

Establecer la metodología necesaria para obtener cepas mutantes que no produzcan la enzima β -galactosidasa a partir de la cepa original de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* ATCC-27952.

6. ESTRATEGIA GENERAL



7. MATERIAL y MÉTODOS

7.1 Modelo de investigación

El modelo biológico empleado en el presente trabajo corresponde al grupo de las actinobacterias, el denominado *S. peucetius* var. *caesius* ATCC 27952, cepa productora de doxorubicina, es depositado y mantenido en la colección de cultivos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

7.2 Preservación de la cepa

Se utilizaron placas de medio sólido conteniendo YMG (Apéndice 1). Las placas fueron sembradas por extensión e incubadas a una temperatura de 29°C durante 72 h. El inóculo se preparó raspando el micelio con un asa bacteriológica, añadiéndolo a matraces Erlenmeyer con capacidad de 250 ml con deflectores inferiores y 5 perlas de vidrio de 5 mm de diámetro que contenían 50 ml de medio YMG, éstos fueron incubados a una temperatura de 29°C por 48 h con agitación rotatoria de 180 revoluciones por minuto (rpm).

Una vez transcurrido el tiempo de crecimiento, el micelio obtenido se pasó a un tubo para lavar las células tres veces con solución salina isotónica (SSI) (Apéndice 1) y se centrifugó a 7,500 rpm durante 10 min. Posteriormente se resuspendió en 2ml de medio YMG y glicerol al 70%, almacenándose a una temperatura de -20°C.

Cabe señalar que tanto los deflectores como las perlas prevén una buena oxigenación y disgregación del micelio.

7.2 Obtención de esporas

Para la generación de esporas, una muestra de 100 μ l del microorganismo fue sembrada por extensión en placa sobre los siguientes medios sólidos: medio de esporulación, R2YE, medio de esporulación modificado¹, medio de esporulación modificado² y por último YMG², tapándose con papel de aluminio y como control cajas sin tapar (Apéndice 1). Después de incubar entre 72 y 96 h a 29°C, las esporas fueron obtenidas raspando con un asa bacteriológica el micelio aéreo desarrollado sobre la superficie del medio, posteriormente se resuspendieron en SSI. La solución fue filtrada de acuerdo a lo reportado por Hopwood *et al.* (1985) empleando un dispositivo de fibra de vidrio, aunque también se probó con algodón obteniendo mejores resultados. Finalmente, las esporas fueron concentradas en un botón por centrifugación a 13,000 rpm y almacenadas en glicerol al 100% a -20°C. Finalmente, se probó otro medio para obtener esporas, se inoculó un matraz Erlenmeyer de 125 ml con 25 ml de medio YMG con 0.5 ml de micelio mantenido en glicerol al 70% congelado y se incubó a una temperatura de 29 °C durante 24 h en agitación rotatoria de 180 rpm. El micelio resultante se lavó tres veces con SSI 0.85% y se inoculó 1 ml del mismo en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio YMG, con deflectores inferiores y 5 perlas de vidrio de 5 mm de diámetro. Los matraces fueron incubados a una temperatura de 29°C durante 48 h con agitación rotatoria de 180 rpm. Una vez crecido el microorganismo, el micelio resultante se lavó tres veces como ya se indicó anteriormente y se sembraron 100 μ l en cajas de YMG² sólido. Las cajas se incubaron 96 h tapadas con papel de aluminio. La recolección de esporas se efectuó de la misma manera descrita anteriormente.

Cabe señalar que las esporas deben ser colectadas entre las 72 y 96 h aún con un 50% de la producción total en caja visto cualitativamente, ya que después no es posible visualizarlas o se incrustan mucho al micelio y no es posible recuperarlas.

7.3 Producción de micelio "fragmentado".

Para el precrecimiento a partir de una suspensión de micelio en glicerol al 100%, se sembró 1 ml en dos matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio YMB (Apéndice 1) con sacarosa al 34%. Los matraces fueron incubados a una temperatura de 29°C durante 96 h a 180 rpm.

El micelio obtenido se lavó con amortiguador Tris-maleatos (TM) 0.05 equimolar a pH 8.5 (Apéndice 1) y se procedió a disgregar en un homogenizador de tejidos con pistilo de teflón durante 90 s a 1,500 rpm en condiciones estériles.

Del homogenado se tomaron muestras de 1 ml y se adicionó 1 ml de glicerol al 20% en SSI, guardándose a -20°C.

Para el crecimiento se inoculó 1 ml del homogenado en un matraz Erlenmeyer de 250 ml con deflectores y 5 perlas de vidrio de 5 mm de diámetro con 50 ml de medio YMB en presencia de glicina (5g/l) y se incubó en las mismas condiciones durante 36 h.

El micelio se lavó con el mismo amortiguador y se homogeneizó 90 s a 200 rpm, obteniendo un volumen final de 5 ml.

7.4 Mutagénesis

Se procedió a realizar el tratamiento mutagénico sobre micelio homogenado, como se menciona a continuación: dicho tratamiento se llevó a cabo con NTG (N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina) (Apéndice 1) a una concentración de 1 mg/ml en amortiguador TM 0.05 equimolar pH 7.8 a 29°C (Apéndice 1). Los tiempos de exposición al mutágeno fueron: 5, 15, 30, 60 y 90 min. Transcurridos cada uno de los tiempos se lavó el micelio tres veces con SSI, se procedió a hacer diluciones con glicerol al 20% en SSI, almacenándose una porción en glicerol al 100% para su posterior análisis. Las diluciones se sembraron en placas con YMG y las unidades formadoras de colonia se cuantificaron con el objeto de obtener la curva de sobrevivientes.

7.5 Determinación de frecuencia de aparición de mutantes.

Con el objeto de obtener el tiempo óptimo de mutagénesis en el cual se encuentra el mayor número de sobrevivientes, se realizaron dos pruebas para obtener mutantes capaces de crecer en Medio Mínimo (MM) adicionado con lactosa 20 mM y 2-desoxiglucosa 10 mM, con lo cual se obtuvo la curva de número de mutantes por número de células viables respecto al tiempo del tratamiento mutagénico.

7.6 Enriquecimiento

Se trabajó con el micelio homogenado mutagenizado del tiempo de exposición correspondiente a 15 min. El protocolo fue el siguiente:

1.- Se inoculó 0.2 ml del micelio homogenado mutagenizado en matraces Erlenmeyer de 50 ml con 10 ml de MM adicionado con glucosa 20 mM y se incubó a una temperatura de 29°C durante 36 h a 180 rpm.

2.- Se inoculó en MM en las mismas condiciones durante 24 h, en este matraz no se adiciona la fuente de carbono.

3.- Se inoculó en MM adicionado con lactosa 20 mM en las mismas condiciones durante 8 h, transcurrido ese tiempo se adicionó ampicilina a una concentración final de 500 $\mu\text{g/ml}$ incubando durante 8 h más. Dicho antibiótico tiene carácter bactericida ya que inhibe el último paso en la síntesis de glicanos, la reacción de transpeptidación que entrecruza la cadena lateral de péptidos del esqueleto del polisacárido del peptidoglicano (Salyers, 1994).

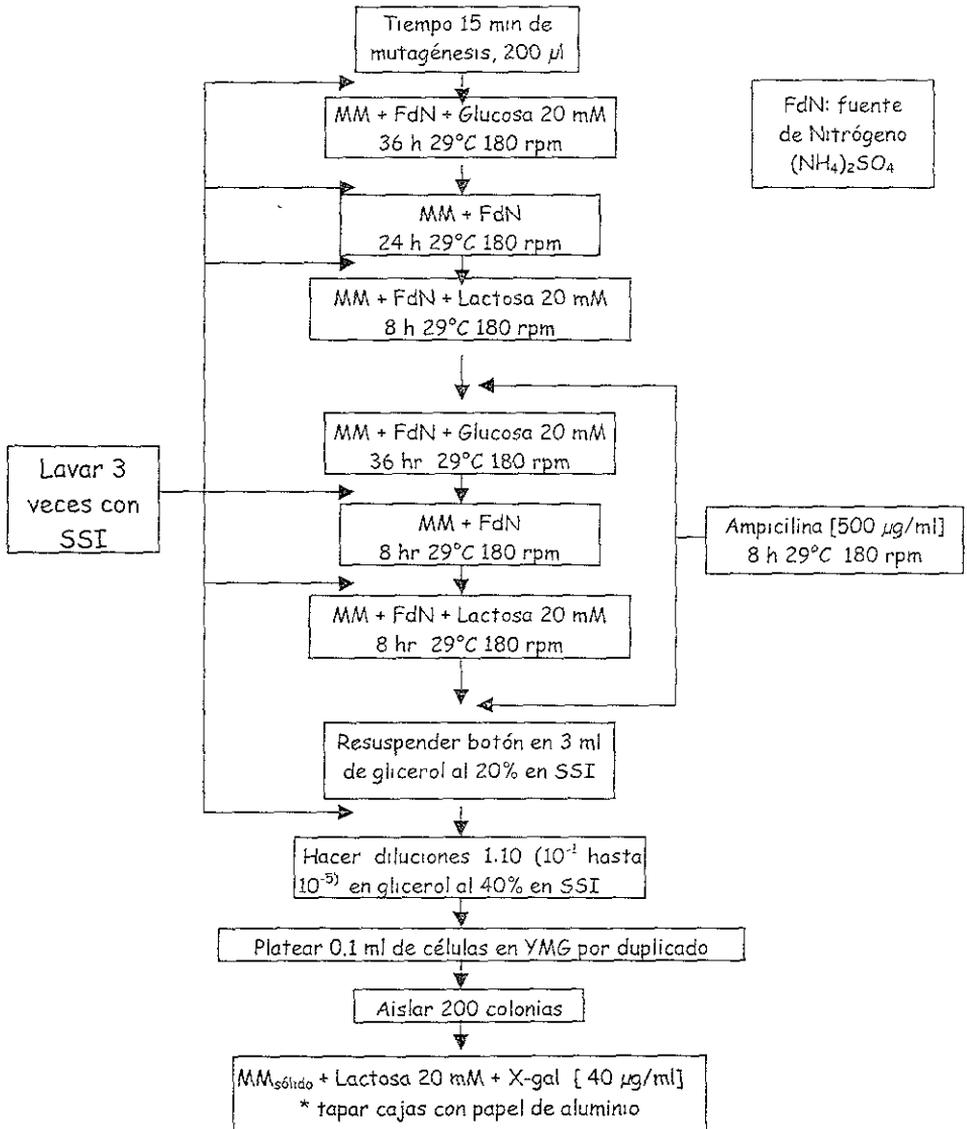
4.- Se realizaron nuevamente los 3 pasos anteriores, bajo las mismas condiciones y se procedió a realizar diluciones decimales hasta 10^{-5} en glicerol al 20% en SSI sembrando en placas de YMG sólido.

Nota

Para todos los casos se emplearon matraces Erlenmeyer de 50 ml con 10 ml de medio, incubando en las mismas condiciones que el punto 1. Este experimento se realizó por duplicado.

Después de cada paso se lavó tres veces el micelio con SSI y se resuspendió en el menor volumen posible para inocular el matraz subsecuente.

Diagrama del método de enriquecimiento:



7.7 Aislamiento y selección de mutantes

Del enriquecimiento se aislaron 200 colonias, cada una de las cuales fueron sembradas por picadura en dos medios: MM adicionado con lactosa 20 mM y en YMG adicionado con lactosa 20 mM y X-gal (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Apéndice 1), cubriendo estas últimas con papel aluminio, debido a que dicho sustrato indigogénico para β -galactosidasa es fotosensible. Ambas placas se incubaron a 29°C durante 48 h. El experimento anterior se realizó por duplicado.

Posteriormente, las mutantes seleccionadas por su incapacidad para crecer en lactosa se sembraron por estría en placas con medio YMG sólido para su propagación.

7.8 Métodos Analíticos

Se realizaron cultivos en medio líquido precreciendo en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 25 ml de medio YMG y 5 perlas de vidrio de 5 mm de diámetro. Se lavó tres veces el micelio total con SSI, resuspendiéndose en el menor volumen posible. Se inoculó 1 ml en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de MM, adicionando lactosa 20 mM o YMG adicionado con lactosa 27 mM según el experimento.

Se tomaron alícuotas de 5 ml a los tiempos 0, 24, 48, 72, 96 y 120 h según el experimento, mismas que fueron analizadas en cuanto a crecimiento, variación de pH y ensayos de β -galactosidasa.

7.8.1 Crecimiento

Las muestras fueron centrifugadas durante 10 min a 5000 rpm separando el sobrenadante del micelio, este último fue resuspendido en ácido tricloroacético (TCA) al 10% y congelado durante 12 h. Transcurrido ese tiempo se centrifugó en las mismas condiciones y al precipitado se le adicionó 1 ml de NaOH 0.4 N dejándolo 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se tomaron alícuotas de 100 μ l a las cuales se les determinó la cantidad de proteína por el método de Lowry *et al.* (1951) utilizando como referencia una curva patrón de albúmina sérica bovina (ASB) de 5, 10, 25, 50, 75 y 100 μ g/ml. Las muestras fueron leídas espectrofotométricamente a 595 nm. Estos experimentos se realizaron por triplicados.

7.9.2 Determinación de pH

La variación de pH durante cada cultivo efectuado se realizó con los sobrenadantes, determinándose los valores con un potenciómetro digital, para cada muestra.

7.9.3 Actividad de β -galactosidasa

La actividad se determinó por el método de Miller (1977) usando *o*-nitrofenol- β -D-galactopiranosido (ONPG) 4 mg/ml como sustrato. La actividad se determinó intracelularmente ya que en experimentos previos en la cepa original (no mostrados) la actividad extracelular presentó valores inferiores (<50%) a los de la actividad intracelular. Por tanto, se emplearon 2 ml de muestra, los cuales se

centrifugaron para eliminar el sobrenadante, el micelio fue lavado con amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M pH 7.5, posteriormente se resuspendió en 2 ml con el mismo amortiguador. Se añadieron 20 μ l de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.1M en β -mercaptoetanol 4.5 M (precipita y estabiliza proteínas), enseguida se agregaron 40 μ l de tolueno (disuelve la membrana), agitando y preincubando la suspensión a 37 °C durante 5 min. Transcurrido ese tiempo se adicionaron 400 μ l de ONPG (que en presencia de β -galactosidasa es convertido en galactosa y *o*-nitrofenol que es amarillo y puede leerse por absorbancia). Se tomaron muestras de 500 μ l a diferentes tiempos de incubación 0, 8 y 16 min a 37°C. La reacción fue detenida con 500 μ l de Na_2CO_3 1 M (cambia el pH a 11, en el cuál la enzima es inactiva). Los sobrenadantes fueron leídos espectrofotométricamente por densidad óptica D.O. a 420 nm. La actividad enzimática se expresó en unidades, una unidad se define como la cantidad de β -galactosidasa que produce 1 nmol de *o*-nitrofenil/minuto/ml de medio a pH 7.5 y 37°C.

8.RESULTADOS y DISCUSIÓN

8.1 Obtención de esporas y tratamiento mutagénico

Se sabe que muchos estreptomicetos producen esporas haploides unicelulares. Sin embargo, las condiciones de cultivo, el cultivo mismo y muchos genes están involucrados en la formación de éstas.

Eventualmente el crecimiento de la hifa aérea se detiene y en contraste al crecimiento vegetativo, se forman sincrónicamente paredes cruzadas regularmente espaciadas que subdividen las puntas de las hifas en muchos compartimentos unigenómicos, cada uno de ellos destinados a convertirse en espora. Los septos de esporulación están morfológicamente diferenciados de las paredes cruzadas de las hifas vegetativas. Típicamente consisten de dos capas membranales separadas por una doble capa de material de pared celular, sin duda alguna esto representa un arreglo que permite la separación eventual de las esporas adyacentes. Por otro lado, las cadenas de esporas pueden consistir de varias decenas de éstas y una sola colonia creciendo de 4 a 6 días en MM sólido puede producir 10^7 esporas (Chater, 1993).

Así, el hecho de obtener esporas garantiza que las generaciones subsecuentes a las esporas que hayan sufrido una mutación, conservarán dicha información mutada.

Para la obtención de esporas se probaron 5 diferentes medios de cultivo (Apéndice 1) de ello observamos que la esporulación dependió del medio en el que se cultivó la muestra de estos microorganismos (Tabla 1).

Tabla 1.- Obtención de esporas de acuerdo a los diferentes medios de esporulación probados.

Medio utilizado	Esporulación visible			
	Nula	Escasa	Moderada	Abundante
De esporulación		*		
Medio R2YE	*			
De esporulación modificado ¹		*		
De esporulación modificado ²			*	
YMG ²				*

En estos medios, la esporulación se observó en diferentes grados de manera cualitativa al microscopio estereoscópico. Observando la superficie blancuzca sobre las colonias, que en este estreptomiceto corresponde a las cadenas de esporas. Así, el medio óptimo para la obtención de esporas se seleccionó de acuerdo a la mayor cantidad de zona blancuzca. Por tanto, el mejor medio para este propósito fue el YMG incubado durante 96 h a 29°C, previo tratamiento (sección 7.2). En todos los casos, las cajas sin tapar usadas como control, mostraron menor esporulación en comparación con aquellas cajas tapadas con papel de aluminio. Así, la obscuridad parece haber favorecido la esporulación, quizás debido a que su hábitat natural es el suelo, la ausencia de luz asemeja más sus condiciones naturales.

El mutágeno empleado en este trabajo fué NTG, el cual es uno de los mutágenos químicos más efectivos, ya que se obtiene una gran proporción de mutantes con un rango bajo de muertes. Como agente alquilante que es, causa mutaciones múltiples como transversiones, transiciones, deleciones y corrimientos en el marco de lectura que impiden la replicación adecuada del DNA (Crueger and Crueger, 1982). Se ha observado en *S. coelicolor* que entre el 8 y

10% de las colonias sobrevivientes al tratamiento con NTG son auxótrofas para una variedad de compuestos y en *E. coli*, arriba del 50% de la población sobreviviente consiste en mutantes. Además, el 90% de las mutaciones inducidas por NTG son transiciones $GC \rightarrow AT$ y considerando que los miembros del género *Streptomyces* poseen un gran contenido de GC en su genoma, la elección del mutágeno fue la correcta. Además, este químico se descompone fácilmente en solución ácida y se forma ácido nitroso. Aunque este último compuesto es también un mutágeno, no es muy efectivo en el rango de pH donde la NTG es activa (pH 6-9) (Crueger and Crueger, 1982).

Según lo reportado por otros autores, la concentración óptima de NTG para la mutagénesis de la mayoría de las cepas de *Streptomyces* varía de 1 a 3 mg/ml en amortiguador TM 0.05 equimolar a pH 8, ya que a pH 9 se provoca una rápida descomposición del reactivo a diazometano (gas tóxico mutagénico) y por tanto una intensa mutagénesis (Baltz, 1986; Delic *et al.*, 1970). Así, para un intenso tratamiento se recomienda usar 3 mg/ml del compuesto a pH 9 durante 2 h. Aunque el compuesto NTG usualmente se emplea a 1 mg/ml, pH 8 durante 1 h (Hopwood *et al.*, 1985). Con base en lo anterior se decidió probar dos concentraciones de NTG y variar el pH del amortiguador TM con el objeto de establecer las condiciones más favorables.

Una vez obtenida una esporulación moderada, se procedió a realizar el tratamiento mutagénico con 3 mg/ml de NTG en 10 ml de amortiguador TM a pH 8.5. De este tratamiento no se observó ninguna colonia sobreviviente, aún en el tiempo cero de exposición al mutágeno. El segundo tratamiento mutagénico se realizó en volúmenes más pequeños (1 ml) utilizando una concentración del mutágeno NTG de 3 mg/ml en 5 ml de amortiguador TM a pH 8.5. En este

tratamiento tampoco se observó ninguna colonia sobreviviente, aún en el tiempo cero que tuvo contacto con el mutágeno.

El tercer tratamiento mutagénico fue realizado con una menor concentración de NTG (1 mg/ml) en 5 ml de amortiguador TM con un pH menor (7.8) pero tampoco se observó ninguna unidad formadora de colonia aún en células que no tuvieron exposición al mutágeno y que las esporas fueron recolectadas 2 h previas al tratamiento. Por lo que las esporas resultaron ser lábiles desde su recolección.

A pesar de que las esporas por lo general son más resistentes que el micelio, ya que son consideradas como estructuras de resistencia, podemos concluir que los resultados obtenidos con los 5 medios de esporulación no fueron satisfactorios ya que las esporas obtenidas no lograron restablecerse al tratamiento con el mutágeno, de tal forma que no se observa ninguna unidad formadora de colonia en ninguna de las diluciones aun después de 15 días de incubación.

Con los resultados anteriores, se procedió a realizar el tratamiento mutagénico con otro tipo de forma diferenciada que exhiben estas actinobacterias, es decir micelio fragmentado.

8.2 Obtención de micelio fragmentado

El material "nuclear" de los esteptomicetos está situado en el centro de la célula y distribuido en paquetes discretos a lo largo de toda la hifa y considerando que estos microorganismos son filamentosos, es difícil preparar suspensiones fisiológicas homogéneas de las hifas (Baltz, 1986). Por ello, se procedió a obtener micelio fragmentado para ser utilizado en el tratamiento mutagénico. Así se creció al microorganismo en el medio YMB y se utilizó el tratamiento descrito en material y métodos. Como se mencionó anteriormente el

medio contenía sacarosa (340 g/l). Esta concentración impide la formación de botón, asegurando así que el micelio disperso obtenido en el cultivo se homogeneizara mediante dicho tratamiento. Además, el medio de cultivo estaba suplementado con glicina (5 g/l). Este aminoácido se utiliza para la sensibilización de la pared celular. La glicina inhibe el crecimiento hasta del 80% si se aplican concentraciones desde 0.05 M hasta 1.33 M. Se sabe que en la estructura de los precursores del peptidoglicano y por tanto en el peptidoglicano correspondiente, la glicina puede reemplazar a la L-alanina en la posición 1 y residuos de D-alanina en las posiciones 4 y 5 de la subunidad del péptido (Hammes *et al.*,1973). Stominger y Birge (1995) determinaron que el reemplazamiento de residuos de D-alanina es más común, sin embargo observaron que la L-alanina es reemplazada por efecto de la glicina en *Staphylococcus aureus* por la acumulación del ácido uridin difosfato N-acetil murámico y otros precursores de la pared celular (Hammes *et al.*, 1973). De tal modo que el micelio con el que se trabajó, resultó tener una pared débil por lo tanto frágil, así, al ser homogeneizada garantizó una fragmentación del micelio mas fina.

8.3 Tratamiento mutagénico del micelio y selección

Para la obtención de las mutantes se trabajó con una concentración constante del mutágeno NTG (1 mg/ml) en TM a pH 7.8 y diferentes tiempos de exposición (5, 15, 30, 60 y 90 min). El tiempo cero no se expuso al mutágeno.

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos en la mutagénesis. Como era de esperarse, la curva de sobrevivientes presentó un comportamiento decreciente, ya que al tiempo inicial (0 min) el número de colonias por ml fue de 65 000 000 y al tiempo más prolongado de exposición (90 min) se cuantificaron

642 colonias correspondiendo al 100% y 0.0016%, respectivamente. Como puede observarse el tratamiento resultó tener una proporción muy elevada de muertes desde los 5 min de exposición (2.32%). Así, tratamientos de 15 min y mayores resultaron tener un frecuencia de muertes por arriba del 99%, con un máximo a los 90 min de exposición (99.99%).

Para determinar el tiempo más adecuado de exposición al mutágeno en la obtención de mutantes no productoras de β -galactosidasa, se realizó una prueba de resistencia inducida a 2-DOG. Esta prueba consistió en calcular el número de mutantes capaces de utilizar lactosa 20 mM en presencia de 2-DOG 10 mM en un medio mínimo sólido, encontrando así el mayor número de sobrevivientes que resistieron a dichas pruebas y a lo que en este trabajo se denomina frecuencia de aparición de las mutantes.

Con el objeto de corroborar el resultado y asegurar que las mutantes no utilizaran reservas del medio rico es decir YMG, esta prueba se realizó dos veces (Tabla 3). Como puede observarse, la mayor frecuencia de mutación se encontró a los 15 min de tratamiento con NTG. Para ello se calculó la frecuencia de aparición de mutantes, esto es, el número de mutantes por número de colonias viables. Los valores obtenidos correspondieron a 6.676×10^{-2} para la primer prueba (P1) y de 1.4×10^{-3} para la segunda prueba (P2) (Figura 10).

De esta parte se concluye que, a pesar de que en la segunda prueba se obtiene menor cantidad de colonias, para ambos casos, 15 min de exposición correspondió al tiempo óptimo para la selección de mutantes incapaces de crecer en lactosa, mismo que posteriormente fue utilizado en el método de enriquecimiento.

Tabla 2.- Colonias presentes en placas con medio YMG en 600 μ l a diferentes tiempos de exposición con NTG 1 mg/ml

Tiempo de exposición a NTG (min)	No. de colonias sobrevivientes en 600 μ l	Sobrevivientes (%)	Sobrevivientes (log)
0	39 000 000	100	7.591
5	906 000	2.323	4.957
15	29 580	0.075	4.470
30	2 400	0.006	3.380
60	1 140	0.002	3.056
90	642	0.001	2.807

Tabla 3.- Frecuencia de aparición de mutantes (número de mutantes/número de colonias viables) de la primer prueba (P1) y de la segunda prueba (P2) en MM con lactosa 20 mM y 2-DOG 10 mM

Tiempo de Exposición a NTG (min)	Células viables en 1 ml (P1)	Frecuencia de aparición (P1)	Células viables en 1 ml (P2)	Frecuencia de aparición (P2)
0	Incontables	0.0005	29.5	7.564×10^{-7}
5	1320	1.456×10^{-3}	15.5	1.710×10^{-5}
15	1975	6.676×10^{-2}	41.5	1.402×10^{-3}
30	5	2.083×10^{-3}	0.5	2.083×10^{-4}
60	0	0	0	0
90	0	0	0	0

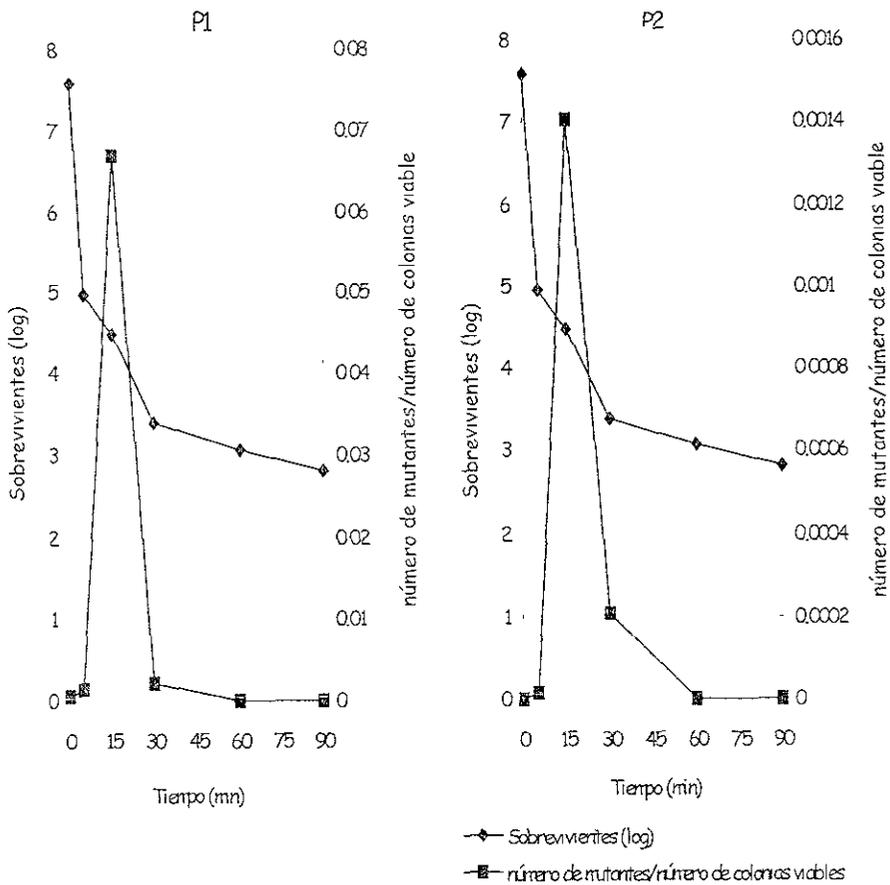


Figura 11.- Curva de sobrevivientes de *S. peucetius* var. *caesius* respecto al tiempo de tratamiento mutagénico con NTG (1 mg/ml) y frecuencia de aparición de mutantes (número de mutantes/numero de colonias viables) correspondiente a las pruebas (P1) y (P2) de resistencia en MM con lactosa 20 mM y 2-DOG 10 mM en 600 μ l.

8.4 Enriquecimiento y selección de mutantes no productoras de β -galactosidasa

Como sabemos los medios de enriquecimiento son aquéllos que favorecen la multiplicación y aumento celular de un grupo de microorganismos con características específicas. Por tanto, para favorecer el desarrollo de las mutantes de interés se combinó el uso de un medio selectivo (MM) y la variación de factores tales como las fuentes de carbono (glucosa y lactosa ambas en una concentración de 20 mM), así como la ausencia de éstas. Esta combinación permitió que las mutantes crecieran, se multiplicaran y convirtieran en predominantes, excepto las mutantes de interés. Es decir, que las mutantes incapaces de utilizar lactosa y sospechosas de ser β -galactosidasa negativas (β -gal⁻) no crecerían bajo estas condiciones. El resto de las mutantes y células originales fueron entonces eliminadas al adicionar ampicilina en una concentración final de 500 μ g/ml. Se sabe que este antibiótico es de tipo bactericida y por tanto eliminó a todas aquellas mutantes que fueron capaces de crecer en presencia de los 2 carbohidratos anteriores (glucosa y lactosa). Finalmente el resultado obtenido consistió en mutantes no productoras de β -galactosidasa.

El tiempo 15 min de la mutagénesis se sometió a dicho tratamiento. Una vez concluido éste, se sembraron en YMG sólido todas las diluciones decimales hasta 10^{-5} del producto de los dos matraces empleados, por triplicado, aislándose 200 colonias enriquecidas. Posteriormente, las colonias se sembraron en dos medios diferentes como se especificó.

Al revisar las cajas se encontraron muy buenos resultados, trece colonias que no crecieron en MM con lactosa 20 mM y que a su vez eran colonias blancas, es

decir, que no viraron a color azul en cajas con YMG con lactosa 20 mM y X-gal (indicador de β -galactosidasa) y una colonia más (168 numerada en función del orden de aislamiento) que resultó muy interesante ya que presentó un color azul intenso y además no produjo el color característico resultado de la producción de las antraciclinas. Las colonias fueron denominadas: 5, 13, 20, 22, 23, 30, 34, 37, 43, 57, 80, 98, 151 y 168, en función del orden de aislamiento. Estas colonias fueron sembradas de nuevo en YMG para su propagación.

Se realizó una selección secundaria y los resultados no fueron similares ya que aunque no crecieron en MM con lactosa 20 mM, sí lo hicieron en placas que contenían YMG con lactosa 20 mM y X-gal, las 13 colonias presentaron zonas de color azul indicando que había β -galactosidasa presente en dichas mutantes, es decir recuperaron la actividad de dicha enzima. De cualquier forma se procedió a caracterizar estas mutantes usando como control la cepa original de *S. peuceitius* var. *caesius*. Se determinó la actividad de β -galactosidasa intracelular a diferentes tiempos de cultivo en MM con lactosa 20 mM (Figura 12).

El hecho de que no utilizaran lactosa como única fuente de carbono nos llevó a pensar en que eran mutantes sospechosas de ser β -gal⁻. Sin embargo, su comportamiento en medio YMG denotó que eran mutantes parciales, de aquí que se decidió no repetir el experimento por duplicado.

De estos resultados se puede concluir que la β -galactosidasa de las 13 mutantes sospechosas de ser β -gal⁻, presentaron niveles de actividad específica menores en relación con el control (cepa original). En cuanto a la cinética de crecimiento de estas mutantes, se observaron patrones muy diferentes a la original, así como variaciones en el pH (resultados no mostrados).

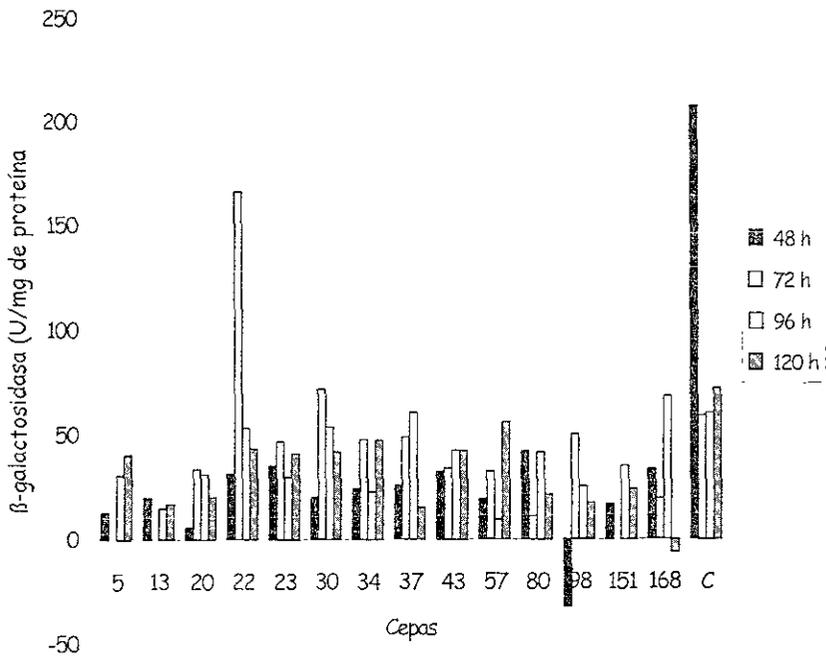


Figura 12. - Actividad específica de β -galactosidasa intracelular en mutantes de *S. peuceitius* var. *caesiis* sospechosas de ser β -gal⁻, a 16 min de reacción de muestras obtenidas a diferentes tiempos de cultivo en MM con lactosa 20 mM. C es el control (cepa original).

Según lo reportado, *S. peuceitius* var. *caesiis* es capaz de crecer y producir β -galactosidasa en MM suplementado con lactosa 55 mM como única fuente de carbono. Esta actividad corresponde a valores de 100 U/mg de proteína alrededor de las 20 h de fermentación y de 150 U/mg de proteína alrededor de las 40 h. Sin embargo, la producción decrece en un 75% cuando el medio con

lactosa es suplementado con glucosa 330 mM, sugiriendo una posible acción represora de la glucosa sobre la síntesis de este compuesto (Segura *et al.*, 1996).

Considerando esta información y los datos de las mutantes obtenidas (figura 12) los resultados no eran del todo satisfactorios, por lo que se decidió buscar nuevas mutantes sospechosas. Así, las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} del enriquecimiento fueron utilizadas de nuevo, sembrándolas en MM con glucosa 20 mM, de donde se obtuvieron doscientas nueve colonias. Al probar las colonias en MM con lactosa 20 mM, éstas presentaron crecimiento, a excepción de las colonias 10, 11, 14, 37 y 151. En seguida se llevó a cabo una selección secundaria en el mismo medio y sólo las 3 últimas no presentaron crecimiento, por lo que se procedió a realizar una cinética de producción en YMG con lactosa 27 mM precreciendo a las mutantes en YMG. Adicionalmente se observó que en placas que contenían YMG con lactosa 20mM y X-gal 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ las mutantes 14, 37 y 151 presentaron muy pocas zonas de color azul, indicando que había poca actividad de la enzima β -galactosidasa. El objetivo de esto fue asegurar que las mutantes sospechosas crecieran en un medio completo, empleando fuente de carbono, que en este caso fue glucosa (5 mM), pero que a su vez tuvieran lactosa en menor concentración a lo reportado (55 mM) para inducir la producción de la enzima, si es que fuera capaz de producirla (Segura *et al.*, 1996) (Figura 13).

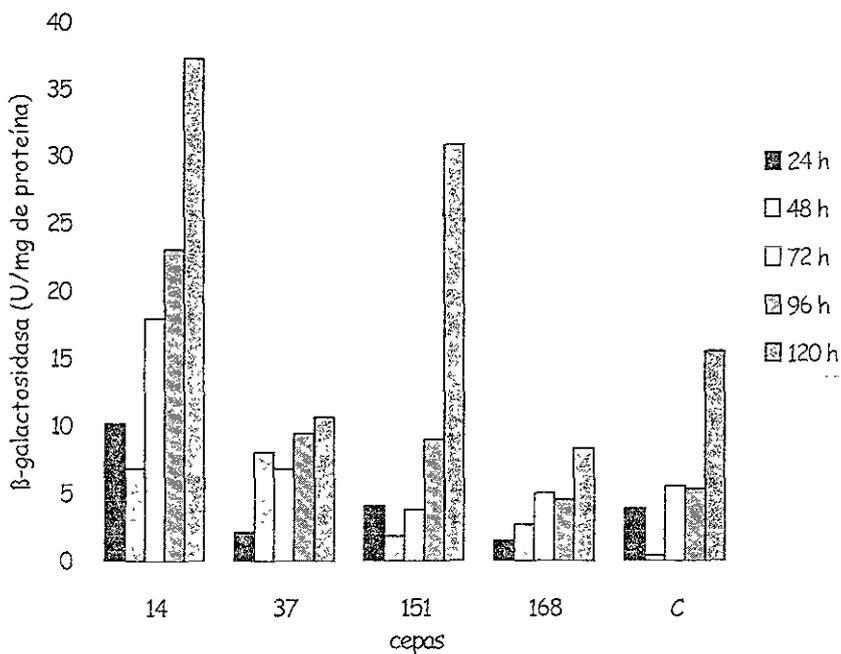


Figura 13.- Actividad específica de β -galactosidasa intracelular a 16 min del inicio de la reacción en las mutantes sospechosas de ser β -gal⁻ (14, 37 y 151), mutante 168 y C (cepa original) controles positivos de *S. peuceitius* var. *caesius* a diferentes tiempos de cultivo líquido en medio YMG suplementado con lactosa 27 mM.

Como se puede observar en esta figura, la producción específica de β -galactosidasa presenta niveles muy inferiores (alrededor del 30%) a los obtenidos en experimentos previos realizados en MM. Además, en la cepa original se observan valores más bajos de actividad en comparación con los obtenidos previamente y los reportados. Por otro lado, la mutante 168 (que estaba

considerada como un control positivo) presenta valores inferiores a los esperados. Asimismo, el resultado que se obtuvo no correspondió con lo visto en medio sólido, en donde las colonias son completamente azules.

Sabiendo que la lactosa es escindida por la intervención de la enzima β -galactosidasa en glucosa y galactosa, se procedió a sembrar las mutantes en MM con lactosa 20 y 27 mM, en MM con glucosa 50 mM y en MM con galactosa 50 mM. Se observó que todas las mutantes crecieron en glucosa y galactosa lo que indica que son capaces de utilizar ambas fuentes de carbono. Sin embargo, también crecieron en lactosa, aunque muy poco, lo que implica que estas mutantes eran capaces de utilizar parcialmente la lactosa como fuente de carbono. King y Chater (1986), aislaron dos mutantes de *S. coelicolor* que no hidrolizan X-gal en un medio mínimo suplementado con glucosa, ninguna mutante fue deficiente en la actividad de hidrólisis de ONPG en los ensayos realizados. Esto sugiere que las cepas pueden presentar un nivel basal de la enzima. Por otro lado, cuando la glucosa se encuentra como única fuente de carbono, las mutantes tienen cien veces más baja la actividad de la enzima.

Del experimento anterior, se observó que los valores de actividad de β -galactosidasa para la cepa control presentó un valor muy bajo en comparación con el que normalmente se encontraba, por lo que se decidió evaluar una muestra diferente (C1) cepas de la cepa utilizada de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* con el objeto de escoger aquella que presentara valores de actividad similares a los reportados. Se midió la cantidad de enzima producida en dos muestras por duplicado a las 48 y 72 h de cultivo en medio YMG suplementado con lactosa 27 mM. El promedio de los resultados presentados corresponden a la actividad volumétrica, en donde se observa que la diferencia entre las cepas es grande y por lo tanto se continuó trabajando con la que presenta mayor actividad que es

similar a la reportada (Segura *et al.*, 1996) (Figura 14). Además, con esto se comprueba que la variabilidad de la cepa es muy grande, cosa común en los estreptomicetos debido a las mutaciones que sufre constantemente, cabe señalar que la cepa con la que se trabaja es una mutante y la inestabilidad es mayor.

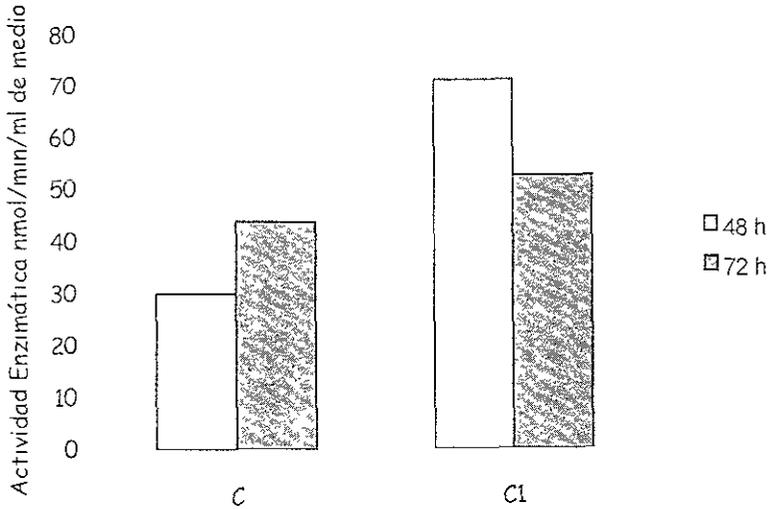


Figura 14. - Actividad volumétrica de β -galactosidasa intracelular en *S. peucetius* var. *caesius* medida a 16 min de reacción, en dos diferentes tiempos de cultivo líquido en YMG con lactosa 27 mM. C, cepa de análisis previo y C1 muestra de la misma cepa. La actividad se reporta en nmol/min/ml de medio.

Finalmente, las mutantes 14, 37, 151, 168 y (C1) fueron analizadas en un cultivo en medio YMG con lactosa 27 mM precreciendo a las mismas en medio YMG con objeto de determinar la actividad de β -galactosidasa (Fig 15), el crecimiento y la variación del pH (Figura 17).

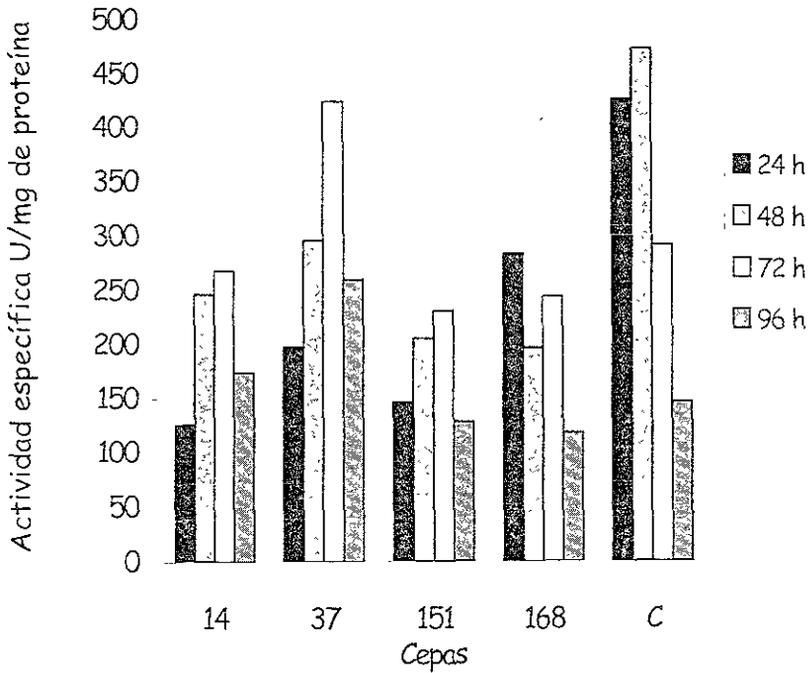


Figura 15.- Actividad específica β -galactosidasa intracelular a 16 min del inicio de reacción en mutantes sospechosas β -gal⁻ (14, 37 y 151); mutante 168 y C (cepa original) controles positivos de *S. peuceitius* var. *caesius* a diferentes tiempos de cultivo líquido en medio YMG suplementado con lactosa 27 mM.

Los datos mostrados son el promedio del resultado de 2 matraces evaluados para cada una de las cepas. Como se puede observar para todas las mutantes, la producción específica de β -galactosidasa presentó niveles superiores a los obtenidos en los experimentos anteriores, indicando que estas cepas recuperaron la actividad de β -galactosidasa. Sin embargo, en comparación con la cepa original,

las mutantes parciales 14, 37 y 151 (enumeradas en función del orden de aislamiento) presentaron niveles inferiores en cuanto a la producción específica de la enzima β -galactosidasa. Los valores de actividad correspondieron al 26.70%, 41.80% y 31.02% a las 24 h de cultivo y 52.25%, 62.70% y 43.52% a las 48 h de fermentación, respectivamente. Las cepas fueron cultivadas en medio YMG con lactosa 27 mM a 29°C y 180 rpm. Al comparar con el control, los valores de la mutante 168 corresponden a 60% y 41.72% a las 24 y 48 h de cultivo. Sin embargo, esta cepa no logró alcanzar los valores esperados ya que desde el inicio de su aislamiento fue considerada como control positivo además de que el comportamiento presentado en cuanto a la cinética de producción es diferente de la cepa original. Por otro lado placas con medio YMG suplementado con lactosa 27 mM y X-gal 40 μ g/ml mostraron cualitativamente la actividad de las mutantes de β -galactosidasa (Figura 16).

Por último, se caracterizaron las mutantes en cuanto a crecimiento es decir, cuantificación de proteína por el método Lowry como se describe en material y métodos, así como la variación del pH respecto al tiempo de cultivo (Figura 17). Como puede verse, para todas las cepas se observó la tendencia a incrementar rápidamente el crecimiento durante las primeras 24 h de cultivo, después se observa incluso, un decremento en la cantidad de proteína atribuible a lisis celular por abatimiento de nutrientes. Por otro lado, el pH de las cepas presenta un ligero cambio hacia la alcalinidad con relación al pH inicial del medio de cultivo. Además de que se observa que estas variaciones presentan el mismo comportamiento en todos los casos.

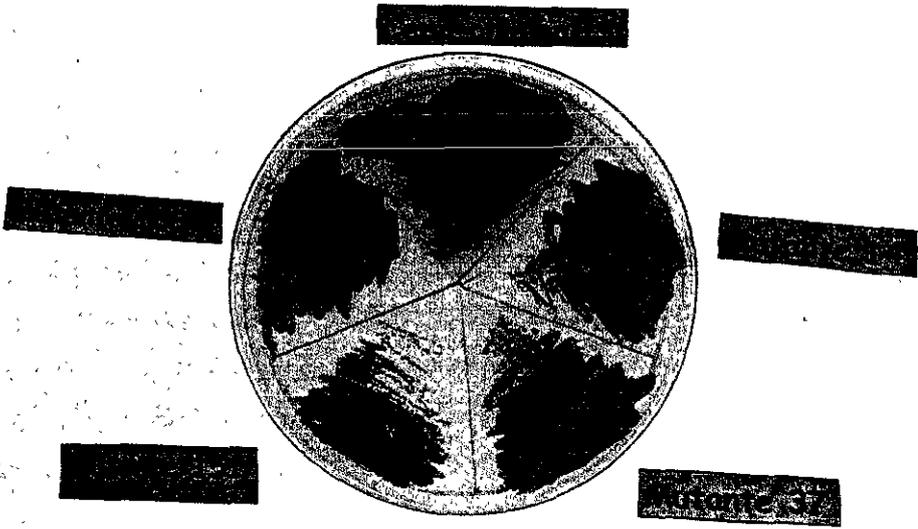


Figura 16.- Actividad cualitativa de β -galactosidasa en mutantes sospechosas de ser β -gal⁻ (14, 37 y 151); mutante 168 y cepa original (controles positivos) de *S. peuceitius* var. *caesius* en medio YMG con lactosa 27 mM y X-gal 40 μ g/ml. Foto tomada por José Avilés.

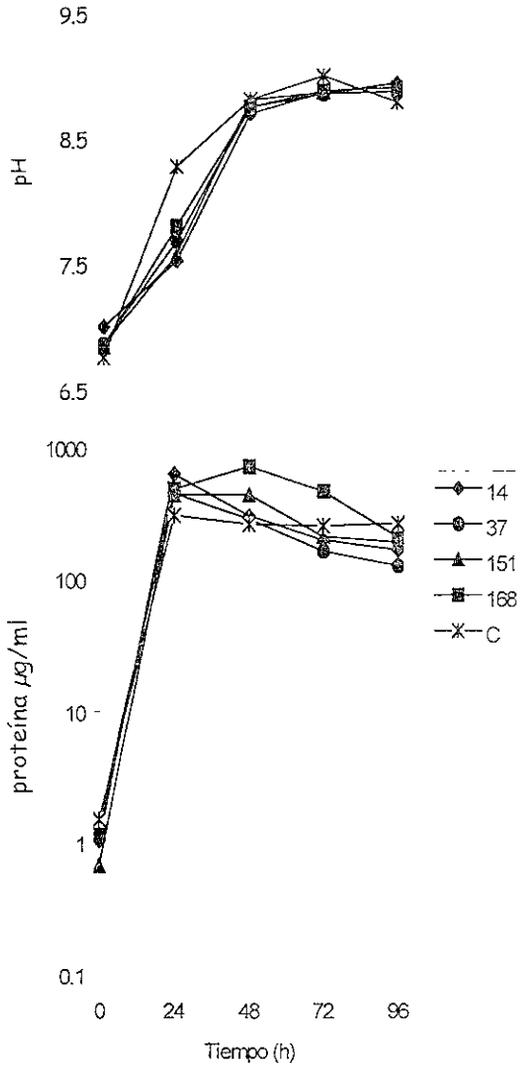


Figura 17.- Crecimiento y variación de pH en mutantes sospechosos de ser β -gal⁻ (14, 37 y 151); 168 y C cepa original (controles positivos) de *S. peucetius* var *caesius* a diferentes horas de cultivo líquido en medio YMG con lactosa 27 mM.

11. APÉNDICE 1

Medio YMG (Hopwood *et al.*, 1985)

	g/l
Extracto de levadura	4
Extracto de malta	10
Glucosa	4

Ajustar pH 7.2

Se esteriliza en autoclave a una presión de 15 lb/pulg² durante 15 min para todos los casos.

SSI

	g/l
NaCl	0.85

Medio de esporulación (Arcamone, 1969)

	g/l
Sacarosa *	20
Glucosa	10
Almidón soluble	20
Extracto de levadura	5
Hidrolizado de caseína	5
CaCO ₃	1
Agar	15

No se ajusta el pH

*Se esteriliza por separado y se agrega al medio antes de realizar el vaciado en cajas de Petri.

Medio de esporulación (modificado 1) (Arcamone, 1969)

	g/l
Almidón soluble	20
Extracto de levadura	5
CaCO ₃	1
Agar (Sigma)	15
No se ajusta el pH	
Sacarosa *	20

*Se esteriliza por separado y se agrega al medio antes de realizar el vaciado en cajas de Petri.

Medio de esporulación (modificado 2) (Arcamone, 1969)

El medio modificado 1 empleando Bacto Agar

Medio R2YE (método alternativo) (Hopwood *et al.*, 1985)

	g/l
Sacarosa	103.00
K ₂ SO ₄	0.25
MgCl ₂ .6H ₂ O	10.12
Glucosa	10.00
Casaminoácidos Difco	0.10
Solución de elementos traza	2.00 ml
Extracto de levadura Difco	5.00
Amortiguador TES	5.73
Agar	15.00
Ajustar pH 7.2	
Una vez esterilizado agregar por cada 100 ml	
KH ₂ PO ₄ (0.5%)	1.0 ml
CaCl ₂ .2H ₂ O (5M)	0.4 ml
L-prolina (20%)	1.5 ml
NaOH (1N)	0.2 ml

Medio YMG (Arcamone, 1969)

Misma fórmula (Hopwood (1985) pero agar 18 g/l

Medio YMB o YEME (Hopwood *et al.*, 1985)

	g/l
Extracto de levadura	4
Extracto de malta	10
Glucosa	4
Sacarosa *	340
Ajustar pH 7.2	
Glicina **	5

* Se esterilizó por separado y fue agregado al medio posteriormente.

** Se esterilizó por filtración en membrana Millipore de 0.45 μm de diámetro.

Medio Mínimo (MM) (Carvajal, 1957)

	g/l
NaCl	5.000
K ₂ HPO ₄	0.300
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.325
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.500
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.020
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.050
MnCl ₄ .4H ₂ O	0.020
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.001
CaCO ₃	3.000
Ajustar pH 7.2	
Lactosa *	7.2064 (20 mM)
Glucosa *	3.604 (20 mM)

* Se esterilizó por separado y fue agregado al medio posteriormente.

Otros reactivos:

Amortiguador Tris - Maleatos (TM)

Trizma base 0.05 M pH 8.5 y 7.8

Acido maleico 0.05 M

N- metil -N' -nitro- N- nitrosoguanidina (NTG)

3 mg/ml y 1 mg/ml en amortiguador TM 005 equimolar pH 8.5 y 7.8 según experimento.

Ampicilina

Solución 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, esterilizar por filtración.

5-bromo-4-cloro-3-indonil- β -galactopiranosido (X-gal)

Concentración final en caja de 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$, disolver en dimetil formamida y evitar inmediatamente la exposición a la luz.

o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG)

4 mg/ml, preparar antes de usar.

APÉNDICE 2

A continuación se presentan algunas características de las cepas.

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

Tomado de Ramos, 1998.

A continuación se presentan los valores de actividad de Glk, el transporte de glucosa, así como su sensibilidad a represión catabólica, nótese que para todas las cepas los valores fueron menores que los mostrados por la cepa original.

Cepa	Sensibilidad a 2-DOG	Transporte de glucosa (%)	Actividad de Glk (%)	Sensibilidad a represión catabólica
Original	S	100	100	S
2-dog ^R -21	R	52	15	R
2-dog ^S -2	S	5	35	R
2-dog ^S -11	S	12	84	R
2-dog ^S -53	S	57	28	S

Tomado de Ramos, 1998.

12. REFERENCIAS

Angell, S., Schwartz, E. and Bibb, J.M. (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., Lewis, C.G., Buttner, M.J. and Bibb, M.J. (1994). Glucose repression in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a likely regulatory role for glucose kinase. *Mol. Gen. Genet.* **244**, 135-143.

Arcamone, F., Cassinelli, G., Fantini, G., Grein, A., Orezzi, P., Pol, C. and Spalla, C. (1969). Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol. Bioeng.* **11**, 1101-1110.

Arcamone, F., Animati, F., Capranico, G., Lombardi, P., Pratesi, G., Manzini, S., Supino, R. and Zunino, F. (1998). New developments in antitumor anthracyclines. *Pharmacol. Ther.* **76**, 117-124.

Baltz, R.H. (1986). Mutagenesis in *Streptomyces* spp. In: Manual of Industrial Microbiology and biotechnology. Demain, A.L. and Solomon, N.A. (eds) American Society for Microbiology. Washington, D.C. pp 184-190.

Blum, R.H. and Carter, S.K. (1974). Adriamycin. A new anticancer drug with significant clinical activity. *Ann. Intern. Med.* **80**, 249-259.

Botsford, J. L. and Harman, J.G. (1992). Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiol.* **56**, 100-122.

Burnett, W.W., Brawner, M., Taylor, D.P., Fare, L.R., Henner, J. and Eckhardt, T. (1985). Cloning and analysis of an exported β -galactosidase and other proteins from *Streptomyces lividans*. In: Microbiology Lieve, L (ed). *American Society for Microbiology*, Washington, D. C pp 441-444.

Carvajal, F. (1957). U.S. Patent. 2, 808,364.

Crandall, L.W. and Hamill, R.L. (1986). Antibiotics produced by *Streptomyces*: major structural classes. In: Antibiotic-producing *Streptomyces*. Queener, S. W. and Day, L.E. (ed). *Academic Press, Inc.*, New York. pp 355-402.

Cross, T. (1981). Aquatic actinomycetes: a critical survey of the occurrence, growth and role of actinomycetes in aquatic habitats. *J. Appl. Bacteriol.* **50**, 397-423.

Crueger, W. and Crueger, A. (1982). *Biotechnology : A Textbook of Industrial Microbiology*. Sinauer, USA. pp 15-20.

Chater, K.F. (1993). Genetics of differentiation in *Streptomyces*. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**,685-713.

Chater, K.F. (1998). Taking a genetic scalpel to the *Streptomyces* colony. *Microbiology.* **144**,1465-1478.

Chatterjee, S. and Vining, L.C. (1982). Catabolite repression in *Streptomyces venezuelae*. Induction of β -galactosidase, chloramphenicol production, and intracellular cyclic adenosine 3',5'-monophosphate concentrations. *Can. J. Microbiol.* **28**, 311-317.

Chen, C.W. (1995). The unstable ends of the *Streptomyces* linear chromosomes. A nuisance without cures?. *Trends Biotechnol.* **13**, 157-160.

Chen, C.W. (1996). Complications and implications of linear bacterial chromosomes. *Trends Genet.* **12**, 192-196.

Dawes, I.W. and Sutherland, I.W. (1993). Microbial physiology. In: Regulation. *Blackwell Scientific Publications*, Oxford. pp 188-200.

DeJong, P.J. and McCoy, E. (1966). Qualitative analyses of vegetative cell walls and spore walls of some representative species of *Streptomyces*. *Can. J. Microbiol.* **12**, 985-994.

Dekleva, M.L., Titus, J.A. and Strohl, W.R. (1985). Nutrient effects on anthracycline production by *Streptomyces peucetius* in a defined medium. *Can. J. Microbiol.* 31, 287-294.

Delic, I., Robbins, P. and Westphelling, J. (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.

Delic, V., Hopwood, D.A. and Friend, E.J. (1970). Mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) in *Streptomyces coelicolor*. *Mut. Res* 9, 167-182.

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., Arcamone, F and Zunino, F. (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.

Eckhardt, T., Strickler, J., Gorniak, L., Burnett, W, and Fare, L. (1987). Characterization of the promoter, signal sequence and amino terminus of a secreted β -galactosidase from "*Streptomyces lividans*". *J. Bacteriol.* 169, 4249-4256.

Epps, H.M.R. and Gale, E.F. (1942). The influence of the presence of glucose during growth on the enzymatic activities of *Escherichia coli*: comparison of the effect with that produced by fermentation acids. *Biochem. J.* 36, 619-623.

Escalante, L., Ramos, I., Imriskova, I., Langley, E. and Sánchez, S. (1999). Glucose repression of anthracycline formation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* En prensa.

Frost, G.M. and Moss, D.A. (1987). Production of enzymes by fermentation. In: Biotechnology. Rehmand, H.J., Reed, G., Kennedy, J.F (ed) VCH Verlagsgesellschaft Weinheim. 7^a, pp 65-211.

Gersch, D., Romero, W., Bocker, H. and Thrum, H. (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.

Goodfellow, M. and Cross, T. (1983). Classification. In: The biology of the actinomycetes. Goodfellow, M., Mordaski, M. and Williams, S.T. (eds.) Academic Press, Great Britain. Pp. 102-105

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

Grein, A., Spalla, C., Di Marco, A., Canevazzi, G. (1963). Descrizione e classificazione di un attinomicete (*Streptomyces peucetius* sp. nova) produttore di una sostanza attiva antitumorale: la daunomicina. *G. Microbiol.* 11, 109-118.

Grubbs, S. (1998). Página de internet <http://www.bsi.vt.edu/>

Hammes, W., Schleifer, K.H. and Kandler, O. (1973). Mode of action of glycine on the biosynthesis of peptidoglycan. *J. Bacteriol.* 116 (2): 1029-1053.

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

Hindle, Z. and Smith, C.P. (1994). Substrate induction and catabolite repression of the *Streptomyces coelicolor* glycerol operon are mediated through the GylR protein. *Mol. Microbiol.* 12, 737-745.

Hirsch, C.F. and McCann-McCormick, P.A. (1985). Biology of *Streptomyces*. In: Biology of Industrial Microorganisms. Demain, A., Solomon, N. (ed). Butterworths. USA, 10, pp 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. 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.

Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Keiser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiate, D.J., Smith, C.P., Ward, M.D. and Schrepf, H. (1985). Genetic manipulation of *Streptomyces*. a Laboratory Manual. The John Innes Foundation, United Kingdom. pp 365.

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

Ishioka, H., Hanamura, A., Kunimura, T. and Aiba, H. (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.

King, A.A. and Chater, K.F. (1986). The expression of the *Escherichia coli* *lacZ* gene in *Streptomyces*. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 1739-1752.

Kolb, A., Busby, S., Buc, H., Garges, S. and Adhya, S. (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.

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

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

Leblond, P., Fisher, G., Francois-Xavier, F., Berger, M., Guérineau and Decaris, B (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.

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

Lewin, B. 1997. The operon. *In: Genes VI*. Oxford University Press, New York. pp. 335-391.

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

Locci, R. (1989). *Streptomyces* and Related Genera. *In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams, S.T., Sharpe, M.E. and Holt, J (eds). Williams & Wilkins, Baltimore. pp 2451-2490.

Lomovskaya, N., Doi-Katayama, Y., Filippini, S., Nastro, C., Fonstein, L., Gall, M. and Colombo, A.L. (1998). The *Streptomyces peucetius dspY* and *dnrX* genes govern early and late steps of daunorubicin and doxorubicin biosynthesis. *J. Bacteriol.* **180**, 2379-2386.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin-phenol-reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.

Lloyd, A.B. (1969). Dispersal of *Streptomyces* in air. *J. Gen. Microbiol.* **56**, 165-170.

Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J. (1998). Regulación de la expresión genética. En: *Biología de los microorganismos*. Brock (eds). Prentice Hall. UK. pp 228-245.

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

Mallery, S.R., Clark Y.M., Ness, G.M., Minishawi, O.M., Pei, P., Hohl, C.M. (1999). Thiol redox modulation of doxorubicin mediated cytotoxicity in cultures AIDS-related Kaposi's sarcoma cells. *J. Cel. Biochem.* 73, 259-277.

Margulis, L. and Schwartz, K.V. (1998). *Five Kingdoms*. W.H. Freeman and Company. New York. pp 41-56.

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

Miller, J.H. (1977). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, New York. pp 466.

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

Moat, A.G. and Foster, J.W. (1988). Microbial physiology. In: *Regulation of Prokaryotic Gene Expression*. John Wiley and Sons, Inc. USA. pp 447-455.

Monod, J. (1947). The phenomenon of enzymatic adaptation. *Growth.* 11, 123-289.

Nasti, G., Errante, D., Santarossa, S., Vaccher, E. and Tirelli, U. (1999). A risk and benefit assessment of treatment for AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Drug. Saf.* 20, 403-425.

Newell, M., Milliken S., Goldstein, D., Lewis C., Boyle, M., Dolan, G., Ryan, S. and Cooper, DA. (1998). A phase II study of liposomal doxorubicin in the treatment of HIV-related Kaposi's sarcoma. *Aust. N. Z. J. Med.* **28**, 777-783.

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

Palmer, T. (1985). Understanding enzymes. *Ellis Horwood Limited, USA*. pp 67-69.

Pandza, K., Pfalzer, G., Cullum, J. and Hranueli, D. (1997). Physical mapping shows that the unstable oxytetracycline gene cluster of *Streptomyces rimosus* lies close to one end of the linear chromosome. *Microbiol.* **143**, 1493-1501.

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

Postma, P.W., Lengeler, J.W. and Jacobson, G.R. (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. Neidhardt, F.C., Curtiss III, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M. and Umberger, H.E. (eds) 2nd 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. *caesiús*. Tesis para obtener el título de Química Farmacéutica Bióloga. México, D.F. Facultad de Química, UNAM.

Romano, A. H. (1986). Microbial sugar transport systems and their importance in biotechnology. *Trends. Biotechnol.* **104**, 808-813.

Ronne, H. (1995). Glucose repression in fungi. *Trends Genet.* **11**, 12-17.

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

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

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

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

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

Salyers, A. and Whitt, D. (1994). Bacterial pathogenesis. A molecular approach. *ASM Press*, USA. pp 97-110.

Sánchez, S., Meade, P., Ramos, I., Escalante, L., Rodríguez, R., Segura, D. (1997). Antibióticos: Bases bioquímicas y moleculares de su biosíntesis. *Biotecnología*. Vol. 1. pp 3136-146.

Santana, C., Segura, D., Sanchez, S. (1994). Síntesis, función y origen evolutivo de los metabolitos secundarios producidos por microorganismos. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* **36**, 139-158.

-Segura, D. (1995). Estudios sobre la producción de doxorubicina en mutantes de *Streptomyces peuceitius* var. *caesius*. Tesis para obtener el grado de maestría en Biotecnología. México, D.F. UNAM.

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

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

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

Smith, C.P. and Chater, K.F. (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 antraciclinas en *Streptomyces peuceitius* var. *caesius*. Tesis para obtener el título de Biólogo. México, D. F. ENEP Iztacala, UNAM.

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

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

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

Vandamme, E.J. (1984). Biotechnology of industrial antibiotics. Marcel Dekker (ed). USA. Vol. XXII. pp 569-594.

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

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

White, R.J. and Stroshane, R.M. (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, P., Gladney, S. and Keasling, J.D. (1997). Mathematical model of the *lac* operon: Inducer exclusion, catabolite repression, and diauxic growth on glucose and lactose. *Biotechnol. Prog.* 13, 132-143.

UNIVERSITY OF
SALZBURG
LIBRARY
FEB 11 1997
11 11 1997