

00581
2



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
GLUCOSA CINASA DE
Streptomyces peucetius var. *caesius*
Y DE
Streptomyces coelicolor

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

IVETA IMRISKOVA VRABLOVA



ASESOR:
DR. SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL

MÉXICO, D F

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



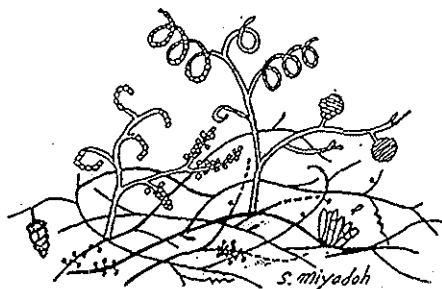
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología Industrial del departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, bajo la dirección del Dr. Sergio Sánchez Esquivel.



AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Sergio Sánchez Esquivel por toda su ayuda y valiosos consejos en la realización de esta tesis.

A mi comité tutorial de maestría y doctorado integrado por:

Dra. Maria Teresa Tusié, Dr. Guillermo Aguilar, Dr. Juan Pablo Pardo, Dr. Roberto Arreguín y el Dr. Sergio Sánchez

por su aportación a este trabajo y por su disposición siempre tan amable y amistosa para resolver mis dudas

A mi jurado de tesis formado por:

Dra. Amelia Farrés González-Saravía, Dra. Rosario A Muñoz Clares, Dr. Agustín López-Munguía Canales, Dr. Luis Servín González, Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez, Dra. María Elena Flores Carrasco y al Dr. Eleazar Martínez Barajas

por sus consejos y apoyo profesional en el contenido de este trabajo.

A mis profesores de la materia Cinética enzimática:

Dra. Rosario A. Muñoz Clares, Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez y el Dr. Mario Calcagno
por ser unos excelentes maestros.

A la M. en C. Laura Escalante, M. en B. Beatriz Ruiz, Dra. Elizabeth Langley, M. en C. Itzel Ramos y a la M. en C. Ruth Martín por la ayuda técnica durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Amelia Farrés y Leticia García por toda su ayuda durante mis estudios de maestría y doctorado

La edición del presente trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda de la M. en B. Beatriz Ruiz y la Dra. Romina Rodríguez

Agradezco a la DGEP UNAM por la beca otorgada para realizar mis estudios de doctorado, así como a los proyectos IN 201697 e IN 208000 de DGAPA UNAM, 103328 de DGEP UNAM y al proyecto 33830-B de CONACyT.

Jurado de examen de la Ing Iveta Imriskova para optar por el grado de Doctora en Ciencias (Bioquímicas), con la réplica de la tesis "Purificación y caracterización de la glucosa cinasa de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* y de *Streptomyces coelicolor*", nombrado el día 26 de noviembre del 2001.

Presidente: Dra. Amelia Farrés González-Saravía
Vocal: Dr. Agustín López-Munguía Canales
Vocal: Dr. Luis Servín González
Vocal: Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez
Secretario: Dra. Rosario A. Muñoz Clares
Suplente: Dra. María Elena Flores Carrasco
Suplente: Dr. Eleazar Martínez Barajas

CONTENIDO

1 RESUMEN – ABSTRACT	7
2 INTRODUCCIÓN	10
3 ANTECEDENTES	12
3.1 Características generales del género <i>Streptomyces</i>	12
3.1.1 <i>Streptomyces coelicolor</i>	15
3.1.2 <i>Streptomyces peucetius</i> var. <i>caesius</i>	15
3.2 Represión catabólica (RC)	17
3.3 Represión catabólica por fuente de carbono (RCC)	18
3.3.1 Mecanismo de represión catabólica por fuente de carbono en <i>Escherichia coli</i>	19
3.3.2 Mecanismo de represión catabólica por fuente de carbono en <i>Bacillus subtilis</i>	23
3.3.3 Mecanismo de represión catabólica por fuente de carbono en el género <i>Streptomyces</i>	25
3.2.3.1 Papel de la enzima glucosa cinasa en la RC	26
3.3.3.2 <i>ccrA1</i> : Mutación en <i>S. coelicolor</i> que afecta el control de la represión catabólica	30
3.3.3.3 Mutantes <i>bld</i> insensibles a la represión catabólica	31
3.3.3.4 Papel de GylR, Reg1 y MaiR en la represión catabólica en <i>Streptomyces</i>	31
3.3.3.5 Efecto represor de la glucosa en la formación del micelio aéreo en <i>Streptomyces alboniger</i> vía acumulación de ácidos orgánicos	33
3.4 Glucosa cinasa	33
4 JUSTIFICACIÓN	37
5 OBJETIVO GENERAL	37
5.1 Objetivos particulares	38
6 HIPÓTESIS	38
7 MATERIAL Y MÉTODOS	39
7.1 Microorganismos y su cultivo	39
7.2 Obtención de extracto libre de células	40
7.3 Determinación de la actividad enzimática	41
7.4 Zimograma de la actividad de glucosa cinasa	42
7.5 Purificación de la glucosa cinasa	43
7.6 Determinación del peso molecular	44
7.7 Análisis de los aminoácidos de los extremos amino- y carboxilo terminal	44
7.8 Determinación del pH óptimo y estabilidad a pH	45

7.9	Determinación del pI	46
7.10	Determinación de efecto de temperatura y termoestabilidad	46
7.11	Estudios cinéticos	47
8	RESULTADOS	48
8.1	Localización de la enzima dentro de la célula	48
8.2	Optimización de las condiciones de extracción de la enzima	48
8.3	Purificación de la glucosa cinasa	49
8.4	Determinación del peso molecular de la enzima	51
8.5	Determinación del pH óptimo y estabilidad a pH	55
8.6	Determinación de la temperatura óptima y termoestabilidad	55
8.7	Análisis de la secuencia de aminoácidos de los extremos amino y carboxilo terminal de la glucosa cinasa de <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i>	57
8.8	Estudios cinéticos	57
9	DISCUSIÓN	66
10	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	72
11	APÉNDICE	
	Imiskova, I., Langley, E., Arreguin-Espinosa R., Pardo, J. P., Sánchez, S. (2001) Rapid Purification and Biochemical Characterization of Glucose Kinase from <i>Streptomyces peucetius</i> var <i>caesius</i> . <i>Arch. Biochem Biophys.</i> : 394, 137-144.	75

ABREVIATURAS

CcpA	proteína de control catabólico
Cra	proteína represora /activadora (catabolic represor/ activador protein)
CRP	proteína receptora del AMPc
DNR	daunorrubicina
DXR	doxorrubicina
FBF	Fructosa 1,6-bifosfato
Glk	glucosa cinasa
HPr	proteína estable a calor
MTT	metil-tiazolil-tetrazolium
PEP	fosfoenol piruvato
PMS	fenzin meto-sulfato
PTS	sistema de transporte de fosfotransferasa dependiente de fosfoenol piruvato
RC	represión catabólica
RCC	represión catabólica por fuente de carbono

1 RESUMEN

La enzima glucosa cinasa cataliza la fosforilación de glucosa de manera dependiente de ATP. La glucosa cinasa de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* fue purificada a homogeneidad (292 veces). La enzima se encuentra en el citosol y está compuesta de cuatro subunidades idénticas de 31 kDa cada una. Después de la purificación, el tetrámero se disocia fácilmente a dímero, aunque en presencia de D-glucosa (100 mM) la enzima mantiene su forma tetramérica. Su máxima actividad se encontró a pH 7.5 y 42°C. Su punto isoeléctrico fue de 8.4. La secuencia de los aminoácidos de los extremos amino- y carboxilo terminal fue la siguiente: MGLTIGVDIGAAGVPD y VYFAREPDPIIM, respectivamente.

La glucosa cinasa de *Streptomyces coelicolor* también es una enzima citosólica compuesta de cuatro subunidades de 32 kDa cada una. Su máxima actividad se encontró a pH 7.6 y temperatura de 33°C. El punto isoeléctrico de esta enzima fue de 8.4.

El mecanismo cinético de las glucosa cinasas de los dos microorganismos fue BiBi ordenado en equilibrio rápido, donde la D-glucosa entra como primer sustrato. Para la glucosa cinasa de *S. peucetius* var. *caesius* se determinaron los siguientes valores de K_m para D-glucosa y $MgATP^{2-}$: 1.6 ± 0.2 y 0.80 ± 0.1 mM, respectivamente. El valor de V_{max} fue de 1086.7 ± 28.6 nmol $min^{-1} mg^{-1}$. El ion Mg^{2+} a concentraciones mayores de 10 mM inhibió la actividad de la enzima. Para la glucosa cinasa de *S. coelicolor* los valores de K_m para D-glucosa y $MgATP^{2-}$

fueron 1.4 ± 0.1 y 0.5 ± 0.1 mM, respectivamente. Su V_{max} fue de 1666.7 ± 170.0 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$.

ABSTRACT

Glucose kinase catalyzes the ATP-dependent phosphorylation of glucose. *Streptomyces peucetius* var. *caesius* glucose kinase was purified 292-fold to homogeneity. The enzyme has a cytosolic localization and is composed of four identical subunits, each of 31 kDa. The purified enzyme easily dissociates into dimers. However, in the presence of 100 mM glucose the enzyme maintains its tetrameric form. Maximum activity was found at 42°C and pH 7.5. Isoelectric focusing of the enzyme showed a pI of 8.4. The N- and C-terminal amino acid sequences were MGLTIGVDIGAAGVPD and VYFAREPDPIM, respectively.

Glucose kinase from *Streptomyces coelicolor* is also homotetrameric, composed of subunits of 32 kDa. Maximum activity was found at pH 7.6 and 33°C. Its pI was 8.4.

The kinetic mechanism of glucose kinase from both microorganisms appears to be a rapid equilibrium ordered type, i.e. ordered addition of substrates to the enzyme, where the first substrate is D-glucose. In the case of glucose kinase from *S. peucetius* var. *caesius* the K_m values for D-glucose and $MgATP^{2-}$ were 1.6 ± 0.2 and 0.80 ± 0.1 mM, respectively. V_{max} was determined to be 1086.7 ± 28.6 nmol $min^{-1} mg^{-1}$. Mg^{2+} in excess of 10 mM inhibits enzyme activity. For the glucose kinase from *S. coelicolor* the K_m values for D-glucose and $MgATP^{2-}$ were 1.4 ± 0.1 and 0.5 ± 0.1 mM, respectively. V_{max} was determined to be 1666.7 ± 170.0 nmol $min^{-1} mg^{-1}$.

2 INTRODUCCIÓN

El gran interés industrial en los estreptomicetos se debe a la capacidad que presentan para producir una amplia variedad de metabolitos secundarios, muchos de los cuales tienen propiedades de antibióticos, agentes antitumorales, herbicidas, helminticidas, etc. De los 12,000 antibióticos conocidos en el año 1995, 55% fueron producidos por bacterias de este género (Demain, 1999).

A pesar de que la producción de metabolitos secundarios está ligada a la disponibilidad de nutrientes, se sabe relativamente poco acerca de cómo es que los estreptomicetos detectan y regulan la utilización de diferentes fuentes de carbono, nitrógeno, etc., y como éstos pueden afectar la síntesis de los metabolitos secundarios.

La represión catabólica por fuente de carbono (RCC) es uno de los principales mecanismos que regulan el metabolismo de carbono. En el género *Streptomyces* puede ser ejercida por varios carbohidratos como la glucosa, fructosa, manitol, etc. (Kwakman y Postma, 1994, Segura *et al.*, 1996), aunque el mecanismo molecular que causa la RCC en este género no se conoce. Sin embargo mutaciones en el gen *glkA*, que codifica para la enzima glucosa cinasa (Glc), y en los genes *bld* y *ccrA*, que codifican para posibles proteínas reguladoras, originan insensibilidad a RCC (Angell *et al.*, 1992, Ingram *et al.*, 1995; Pope *et al.*, 1996, Segura *et al.*, 1996). De estas, sólo se considera que la Glc juega un papel global en el mecanismo de RCC en el género *Streptomyces* (Angell *et al.*, 1992, Kwakman y Postma, 1994); sin embargo esta enzima no está involucrada en la RCC de todos los genes sensibles en este género.

Aunque aparentemente la Glk juega un papel importante en la regulación del metabolismo de carbono en el género *Streptomyces*, poco se sabe sobre sus características bioquímicas.

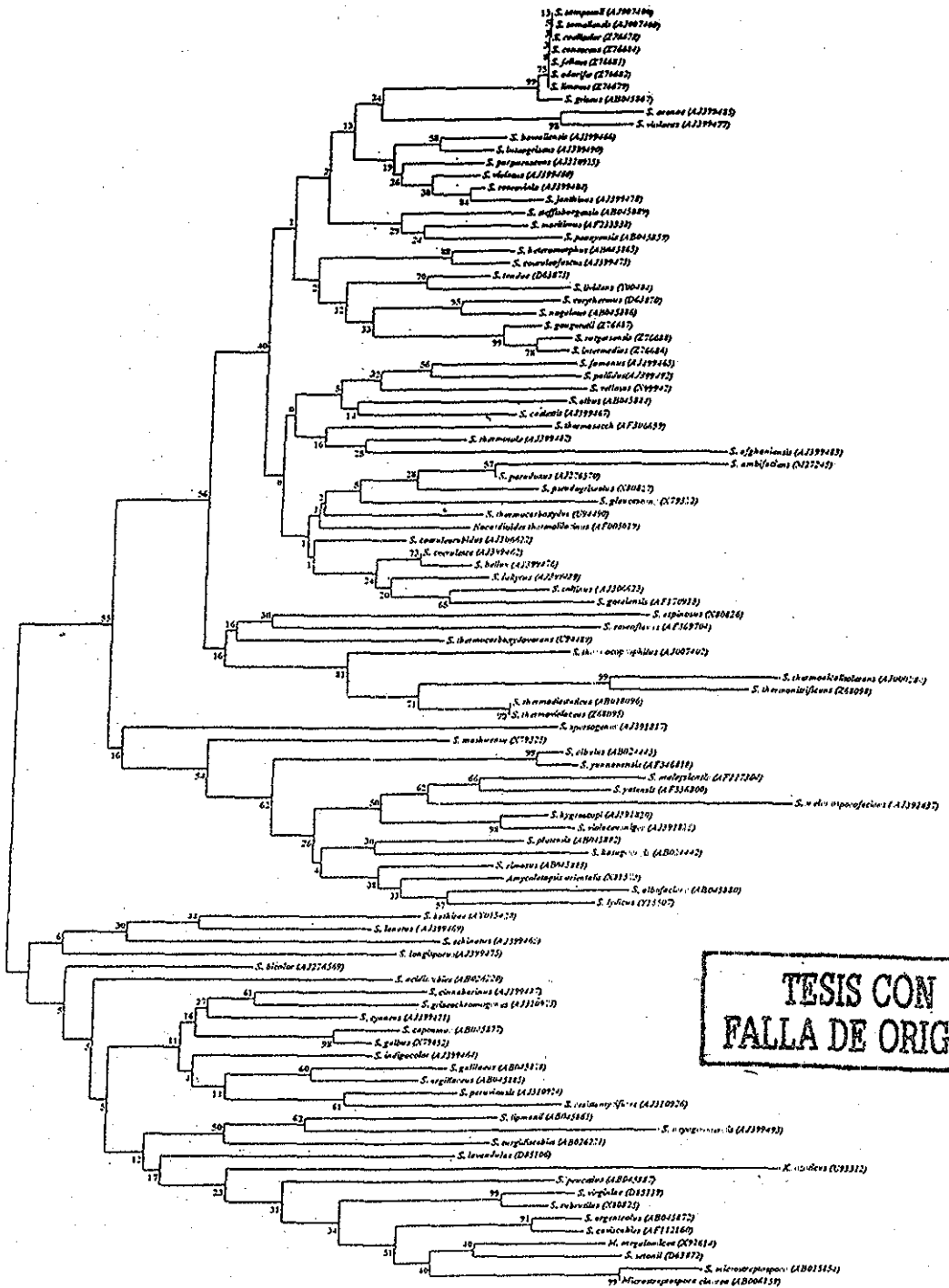
Con la finalidad de continuar los estudios del mecanismo de RC en *Streptomyces peucetius* var *caesius* se planteó como objetivo de este trabajo purificar y caracterizar bioquímicamente a la glucosa cinasa de este microorganismo y comparar sus características con las de la glucosa cinasa de *S. coelicolor*, microorganismo considerado como modelo en este género.

3 ANTECEDENTES

3.1 Características generales del género *Streptomyces*

El género *Streptomyces* (Fig. 1) es uno de los 102 constituyentes del grupo filogenético de actinomicetos. Los miembros de este género son bacterias Gram positivas con alto contenido de G+C (69 – 78 %). La mayoría son aerobios estrictos, aunque existen reportes de algunas cepas microaerófilas (Hodgson, 2000). En la naturaleza se encuentran comúnmente distribuidos en los suelos (los estreptomicetos son los actinomicetos predominantes en el suelo), aunque pueden ser encontrados también en ambientes acuáticos. Los estreptomicetos se caracterizan por ser miceliares y por presentar en su ciclo de vida una diferenciación morfo-fisiológica única dentro de los procariontes (Hirsch *et al.*, 1985, Hopwood, 1988) (Fig. 2).

El crecimiento de una nueva colonia empieza con un inóculo transferido a un medio adecuado (el inóculo puede ser esporas, un fragmento de hifa, una pequeña parte de una vieja colonia, o un cultivo "stock" de micelio o de esporas). En medio sólido, el inóculo desarrolla inicialmente el micelio vegetativo, también conocido como primario. Las hifas de aproximadamente 1 μm de diámetro (tamaño típico para bacterias y mucho más pequeño que las de hongos), crecen por extensión apical para formar un micelio ramificado. Una vez que los nutrientes se han agotado, comienza el proceso de diferenciación morfo-fisiológica, que se inicia con el surgimiento de hifas aéreas que crecen nutriéndose del micelio



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

0.005

Figura 1 Árbol filogenético del género *Streptomyces* construido con base al análisis de secuencias parciales de ARNr 16S por el método de 'neighbor-joining' (Saito, 1987).

12.A

vegetativo lisado. Posteriormente, las hifas aéreas comienzan a enroscarse y septarse para dar lugar a la formación de esporas (Fig. 3), las cuales adquieren

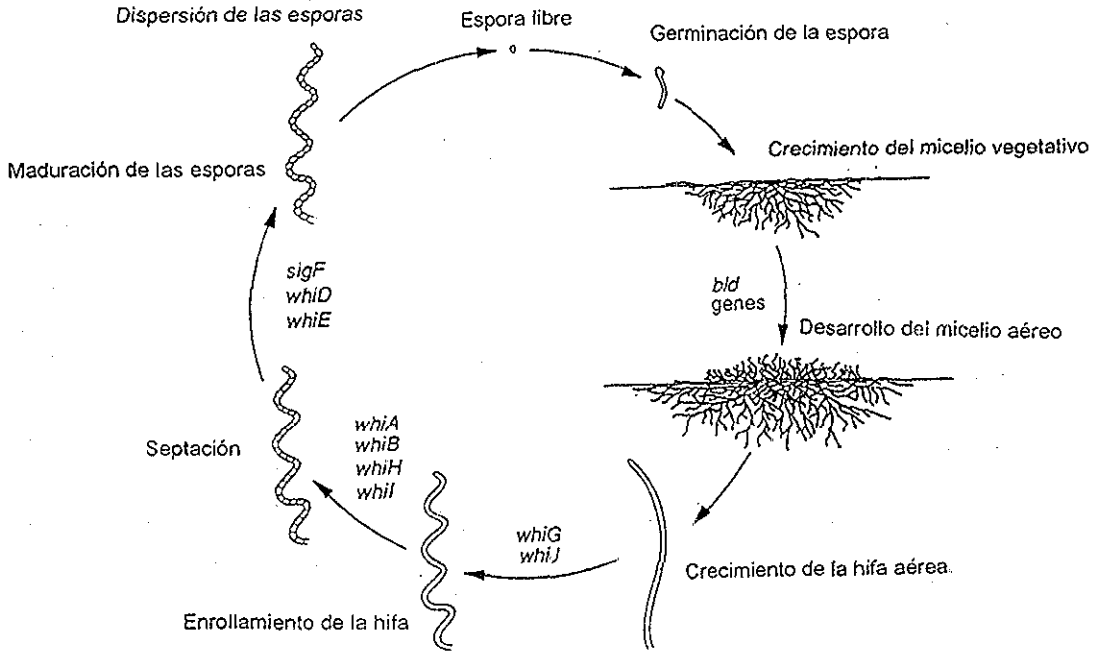


Figura 2 Ciclo de vida de *Streptomyces coelicolor* A3(2)

(Fuente: Atlas of Actinomycetes. Sociedad Japonesa de Actinomicetos 1997)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

pigmentación al madurar. Las esporas constituyen la única etapa en el ciclo de vida en la que se observa la característica unicelular, ya que al germinar éstas vuelven a generar un micelio vegetativo. La formación de las hifas aéreas comúnmente coincide con la producción de metabolitos secundarios (Hirsch *et al.*, 1985, Hopwood, 1988).

Los metabolitos secundarios más importantes producidos por el género



Streptomyces son los antibióticos. Además, se ha observado que algunos de estos son también agentes antitumorales, herbicidas, inmunosupresores, antiparasíticos, etc (Demain, 1999). Esta versatilidad biosintética, aunada a su complejidad morfológica, confiere a este género gran importancia industrial y científica (Hirsch *et al.*, 1985; Hopwood, 1988)

Figura 3 Micelio aéreo y esporas de *S. coelicolor*

(Fuente: F Buttner and Findlay, John Innes Centre, 2002)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

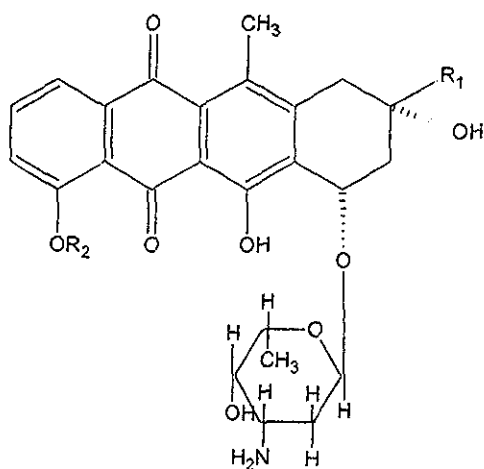
3.1.1 *Streptomyces coelicolor*

Streptomyces coelicolor A3(2) es el organismo modelo del género *Streptomyces* y actualmente es el estreptomiceto mejor caracterizado a nivel bioquímico, fisiológico y genético. Se conoce la secuencia completa de su genoma (Hopwood, 2001). Los análisis de esta secuencia revelaron su enorme capacidad codificadora, ya que el cromosoma de este microorganismo cuyo tamaño es de 8,667,507 pb codifica para más de 7,500 proteínas. Una proporción substancial de su genoma parece estar dedicada al metabolismo secundario (Hopwood, 2001). A pesar de que ninguno de los metabolitos secundarios producidos por este microorganismo es de importancia industrial, la diversidad de metabolitos secundarios producida y la facilidad de su manipulación genética convirtieron a esta bacteria en el sistema biológico modelo para estudios de regulación metabólica y expresión genética.

3.1.2 *Streptomyces peucetius* var. *caesius*

Streptomyces peucetius var. *caesius*, obtenido por tratamiento mutagénico a partir de *S. peucetius* (el microorganismo productor de daunorrubicina; DNR), es la cepa productora de doxorrubicina (DXR) (Fig. 4), un antibiótico del grupo de las antraciclinas, que posee una importante actividad antitumoral (Arcamone *et al.*, 1969). A pesar de varios efectos tóxicos no deseados (mielosupresión y cardiotoxicidad, principalmente), actualmente DXR es el fármaco antitumoral más usado a nivel mundial para el tratamiento de diferentes tipos de tumores sólidos y

hematológicos. Su mecanismo de acción no está completamente esclarecido aunque probablemente, el mecanismo principal de este compuesto sea la inhibición de la topoisomerasa II, al intercalarse entre los pares de bases de la doble hebra del DNA, produciendo ruptura de la cadena e impidiendo así la replicación del material genético.



	R ₁	R ₂	Fórmula	P M
Daunorrubicina	CH ₃ CO	CH ₃	C ₂₇ H ₂₉ NO ₁₀	527.51
Doxorrubicina	CH ₂ OHCO	CH ₃	C ₂₇ H ₂₉ NO ₁₀	543.54

Figura 4 Estructura química de la doxorubicina y la daunorrubicina
(Fuente: Hutchinson C R. y Colombo, A L., 1999)

Aunque un gran número de microorganismos son capaces de producir DNR, el precursor inmediato de DXR, *S. peucetius* var. *caesius* es el único organismo reportado capaz de producir DXR (Hutchinson y Colombo, 1999). La producción

mundial actual de DXR es de alrededor de 225 kg por año (Hutchinson y Colombo, 1999).

Como otros metabolitos primarios y secundarios producidos por este microorganismo, la producción de DXR se encuentra regulada por represión catabólica (Segura *et al.*, 1996; Escalante *et al.*, 1999)

3.2 Represión catabólica (RC)

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

Los microorganismos pueden asimilar una amplia variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos, muchos de ellos de gran complejidad. Sin embargo, en presencia de sustratos más fácilmente asimilables, se evita el gasto de energía empleada en sintetizar enzimas necesarias para el metabolismo de estos complejos nutrientes. Este mecanismo regulatorio, conocido como represión catabólica actúa al nivel de transcripción. Se conoce represión catabólica por carbono, por nitrógeno, por fósforo, etc., dependiendo del nutriente que la causa

3.3 Represión catabólica por fuente de carbono (RCC)

Este mecanismo regula el metabolismo de carbono, inhibiendo la expresión de muchos genes catabólicos y de algunos otros, en la presencia de una fuente de carbono rápidamente utilizable (Saier, 1992). Los mecanismos responsables de la RCC son diversos y muy complejos y aunque las consecuencias fisiológicas son las mismas probablemente existen varios sistemas control en un solo organismo (Angell, 1994).

A pesar de que este fenómeno regulatorio fue descubierto en el año 1901 (Saier, 1992), hasta la fecha son pocos los mecanismos que han sido elucidados. En los procariontes los únicos mecanismos esclarecidos lo han sido en *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*.

3.3.1 Mecanismo de represión catabólica por fuente de carbono en *Escherichia coli*

En *E. coli* el metabolismo de carbono está regulado por el sistema de transporte de fosfotransferasa (sistema PTS) dependiente de fosfoenol piruvato (PEP)

El sistema PTS es un complejo enzimático que además de transportar y fosforilar diferentes carbohidratos también interviene en la quimiotaxis y en diversos mecanismos regulatorios. Generalmente consiste de dos enzimas solubles, citosólicas, no específicas: la enzima I (EI) y la proteína estable a calor (heat-stable protein, HPr); así como de un conjunto de enzimas específicas para cada carbohidrato (las enzimas II). El sistema PTS es el más importante en el transporte y fosforilación de carbohidratos en las bacterias Gram negativas y en algunas Gram positivas. Más de 20 carbohidratos diferentes son transportados por este sistema (Postma *et al*, 1993), en donde se usa el PEP como el donador del grupo fosfato, según la Fig. 5.

En *E. coli* este sistema controla el metabolismo de carbono, modulando la actividad de las permeasas de los carbohidratos que no son transportados por el sistema PTS (como simportadores de azúcar- H^+ , azúcar- Na^+) y de transportadores activos dependientes de ATP. Esta regulación unidireccional permite a la célula utilizar a los carbohidratos que son sustratos de PTS preferentemente sobre los carbohidratos transportados por otros sistemas (Saier, 1995).

Además de su papel en la regulación del transporte de carbohidratos, el sistema PTS de *E. coli* también regula indirectamente la expresión de genes cuyos

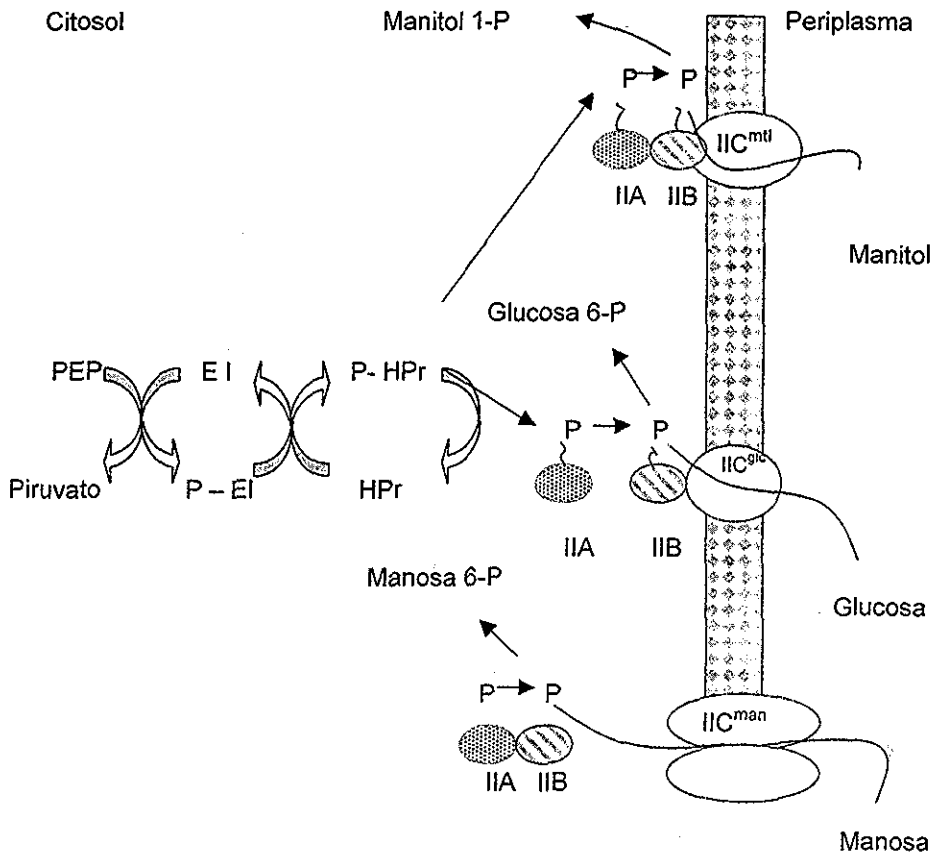


Figura 5: Sistema de PTS en *E. coli*. Las enzimas I, HPr, IIA y IIB son las fosfo-transferasas y la IIC es una permeasa que cataliza la translocación del carbohidrato al citoplasma. Sólo se muestran las enzimas IIC específicas para manitol (mtl), glucosa (glc) y manosa (man) (Postma *et al.*, 1993).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

productos están involucrados en el catabolismo de diferentes azúcares así como de muchos otros genes, regulando la actividad de la enzima sintetizadora de AMP cíclico (AMPc), la adenilato ciclasa. La concentración citosólica de AMPc, así como la de la proteína receptora de AMPc (CRP) modulan la expresión de cientos de operones catabólicos, cuya transcripción se activa únicamente si el complejo AMPc-CRP se une al ADN (Figura 6). El sistema PTS regula la actividad de la adenilato ciclasa, regulando a su vez diferentes operones a nivel transcripcional.

¿Cómo es que el sistema PTS de *E. coli* regula a todas estas permeasas, enzimas catabólicas y a la adenilato ciclasa?

Una de sus enzimas, la enzima IIA específica para glucosa (IIA^{glc}), parece ser el efector alostérico que controla el mecanismo de RC al unirse en su forma desfosforilada a algunas permeasas de otros carbohidratos o a algunas otras enzimas catabólicas (por ejemplo la glicerol cinasa). La enzima IIA^{glc} se fosforila reversiblemente en un residuo de histidina por la enzima I y la HPr, utilizando PEP. En presencia de glucosa, la enzima IIA^{glc} se desfosforila transfiriendo el grupo fosfato a la enzima IIBC membranar y posteriormente a la glucosa, produciendo así glucosa-6-P. La IIA^{glc} desfosforilada inhibe alostéricamente la actividad de permeasas de otros azúcares o de otras enzimas catabólicas, además de desactivar la adenilato ciclasa (Figura 6). La desactivación de esta enzima tiene como consecuencia la reducción de la concentración de AMPc en el citosol inhibiendo así la transcripción de los genes sensibles a la represión catabólica.

En el año 1996 Saier Jr. reportó otro mecanismo de RC en *E. coli* independiente de AMPc.

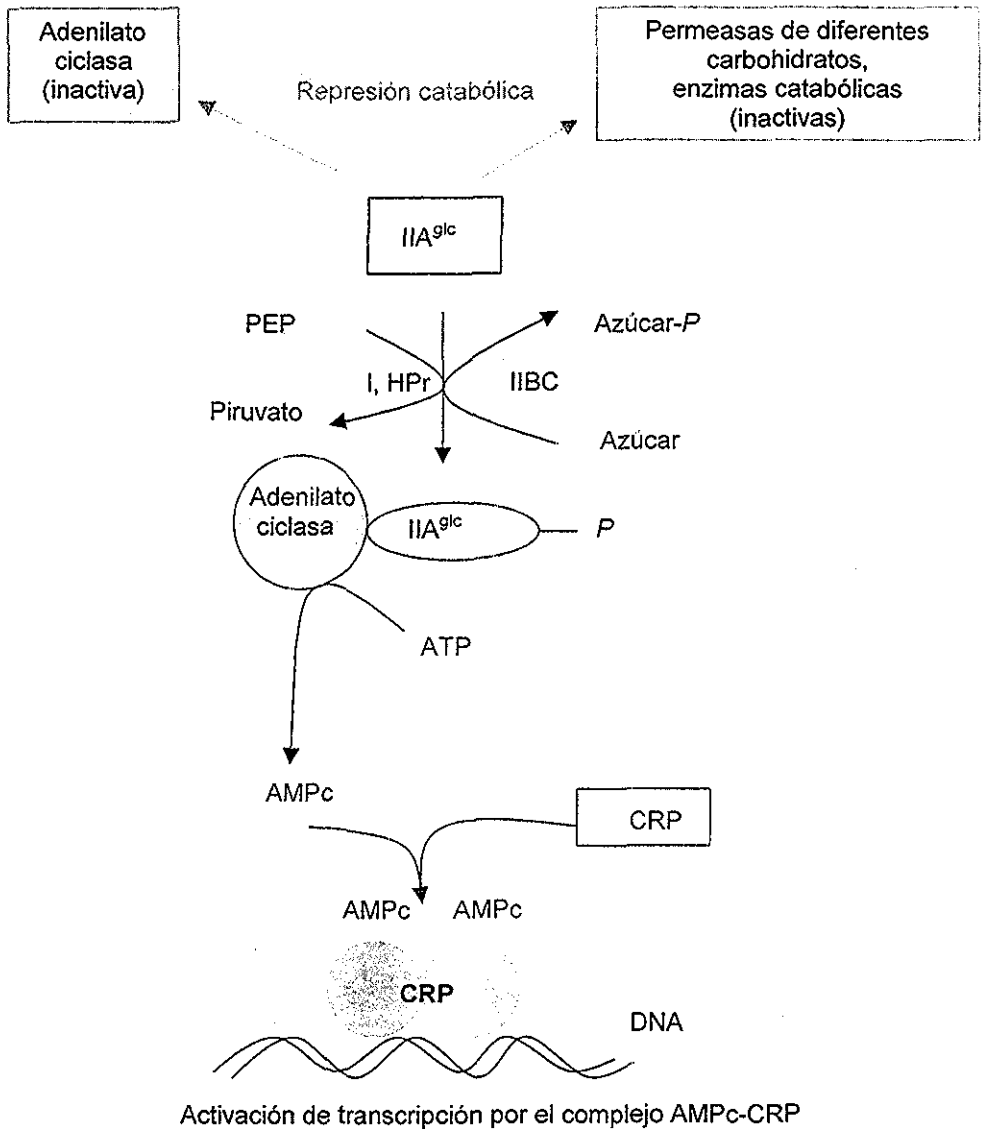


Figura 6 Modelo ilustrando el mecanismo de represión catabólica por fuente de carbono en *E. coli* (Saier, Jr, 1995).

En este mecanismo está involucrada la proteína Cra (del inglés: catabolic represor/activator protein) que reprime el catabolismo de azúcares y activa el anabolismo. Cra controla la síntesis de un gran número de enzimas de una manera sistemática; actúa reprimiendo la síntesis de las enzimas involucradas en la fermentación de azúcares y activando las enzimas necesarias para la oxidación del sustrato.

Adicionalmente, las bacterias púrpura Gram negativas, como las especies *Rhodobacter*, *Rhodospirillum* y *Azospirillum*, exhiben un fenómeno conocido como RC reversa. En este mecanismo los intermediarios del ciclo de Krebs reprimen la síntesis de las enzimas involucradas en el catabolismo de los azúcares (Saier, Jr., 1996).

3.3.2 Mecanismo de represión catabólica por fuente de carbono en *Bacillus subtilis*

En *B. subtilis* la regulación del uso de fuentes de carbono está también mediada por el sistema PTS, aunque el mecanismo es diferente que el de *E. coli*. En el caso de *B. subtilis*, la glucosa u otra fuente de carbono rápidamente metabolizable genera intermediarios metabólicos, como por ejemplo la fructosa 1,6-bisfosfato (FBF). Este metabolito activa a una HPr(Ser) cinasa y la enzima activada fosforila a HPr en su residuo Ser46. HPr(Ser-P) activa a la proteína de control catabólico (CcpA) uniéndose a ella y así induciendo una conformación que tiene alta afinidad por secuencias que actúan en *cis*, conocidas como elementos de respuesta a catabolitos (CREs). De esta manera el complejo FBF-HPr(Ser-P)-CcpA unido a

las CREs en las regiones regulatorias de los operones sensibles a la RC, inhibe la iniciación de la transcripción (Figura 7).

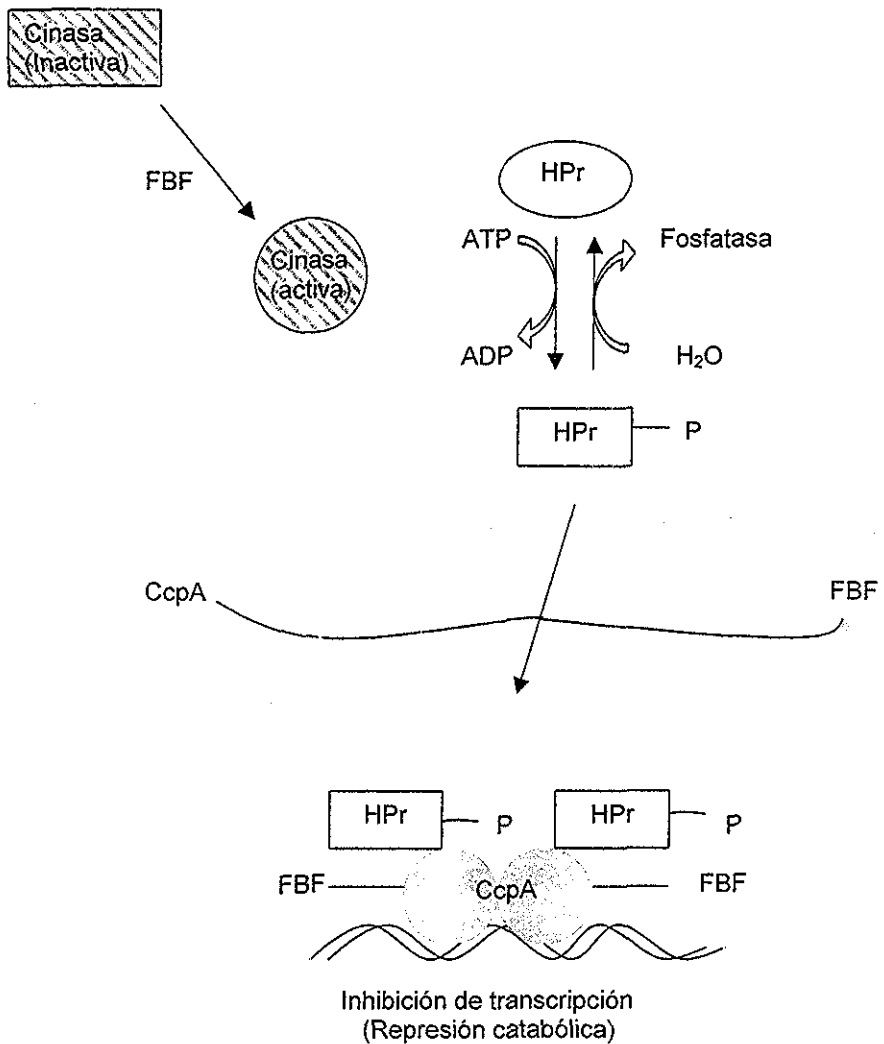


Figura 7 Mecanismo de represión catabólica por fuente de carbono en *B. subtilis* (Saier, Jr., 1995)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En el año 1999 fue reportado otro mecanismo de RC en *B. subtilis*, independiente de las proteínas del PTS, en cual pudiera estar involucrada la enzima glucosa cinasa (Rosana-Ani *et al.*, 1999) aunque este mecanismo no ha sido aclarado todavía

3.3.3 Mecanismo de represión catabólica por fuente de carbono en el género *Streptomyces*

En el género *Streptomyces* el mecanismo de RC controla la expresión de muchos genes como por ejemplo: genes involucrados en el transporte y en la utilización de fuentes de carbono alternas (Hodgson, 1982; Smith y Chater, 1988; Wong *et al.*, 1991, Ramos 1999), así como en la síntesis de enzimas extracelulares y metabolitos secundarios (Servín-González *et al.*; 1994; Violette and Gagnat, 1994 ; Segura *et al.*, 1996, Escalante *et al.*, 1999).

A pesar de la gran importancia comercial y la interesante biología de este género, los conocimientos sobre cómo las células detectan la presencia de la fuente de carbono, cómo la transportan y cuál es el mecanismo de la RC son muy limitados.

La detección de los nutrientes y la generación de señales como estímulo para producir RC está fuertemente ligada a los respectivos sistemas de transporte. Mientras que el sistema de transporte para glucosa, el azúcar que causa la represión más fuerte no ha sido identificado, se ha demostrado que los estreptomicetos transportan celotriosa, maltosa y xilobiosa por el sistema de

transportadores ABC y la fructosa es aparentemente transportada por el sistema PTS (Parche *et al.*, 1999).

La presencia del sistema PTS en *S. coelicolor* fue reportada por primera vez en el año 1995 (Titgemeyer, 1995). En 1999 dos grupos reportaron la clonación del gen *ptsH* cuyo producto es la fosfotransferasa HPr del PTS (Butler *et al.*, 1999, Parche *et al.*, 1999). Posteriormente Parche *y col.*, en el año 2000 reportaron la existencia de tres genes de *S. coelicolor* que codifican para las proteínas homólogas de las enzimas no específicas del PTS y 6 genes que codifican para las proteínas homólogas de las enzimas específicas. Es muy probable que este microorganismo tenga menos genes *pts* comparado con las decenas de *pts* de *E. coli* o con los 27 genes *pts* de *B. subtilis*.

Los estudios de RC realizados en *S. coelicolor* demostraron que los niveles de AMPc no varían con el cambio de fuente de carbono (Hodgson, 1994). Tampoco fue identificada una proteína-cinasa capaz de fosforilar a la enzima HPr, (Titgemeyer *et al.*, 1995; Parche *et al.*, 1999) lo que sugiere que el mecanismo de RC en *Streptomyces* es diferente al que existe en *E. coli* o *B. subtilis* (Angell *et al.*, 1994)

3.3.3.1 Papel de la glucosa cinasa en la RCC

Mutantes de *S. coelicolor* (mutantes 2-dog^R), aisladas por su capacidad de crecer en presencia de un análogo de glucosa, la 2-deoxiglucosa (2-dog), son insensibles a la RC (Hodgson, 1982). Este tipo de mutantes son incapaces de utilizar glucosa, aún cuando el transporte de glucosa no está afectado (Hodgson,

1980, 1982) La insensibilidad de estas mutantes a la RC fue correlacionada con la pérdida de la actividad de la glucosa cinasa (Glc).

Resultados similares se obtuvieron con las mutantes 2-dog^R de *S. peucetius* var. *caesius* (Segura *et al.*, 1996). Estas mutantes también se caracterizan por ser insensibles a la RC y la actividad de Glc se encuentra disminuida entre 10-30% de la cepa original. A diferencia de las mutantes de *S. coelicolor*, las de *S. peucetius* var. *caesius* pueden crecer en glucosa como única fuente de carbono y tienen afectado el transporte de glucosa (Segura *et al.*, 1996, Ramos 1999).

La complementación de las mutantes 2-dog^R de *S. coelicolor* con el gen que codifica para esta enzima, *glkA* restablece la capacidad de utilizar glucosa, la actividad de Glc y también la sensibilidad a la RC (Ikeda *et al.*, 1984). La expresión de *glkA* en *E. coli* confirmó que su producto es una proteína que cataliza la fosforilación de glucosa (Angell, 1992). Sin embargo, la complementación de mutantes *glkA* de *S. coelicolor* con un gen análogo de glucosa cinasa de *Zymomonas mobilis* reestablece la capacidad de utilización de la glucosa y la actividad de Glc, pero no la sensibilidad a RC (Angell, 1992). Esto sugiere que la Glc juega un papel importante en la regulación del metabolismo de carbono.

La secuenciación de un fragmento *BclI* del genoma de *S. coelicolor*, que contiene el gen de *glkA*, demostró que éste contiene dos marcos de lectura abiertos completos, SC6E10.19c (*orf2*) y SC6E10.20c (*orf3*), que codifican para proteínas de 20.1 y 33.1 kDa, respectivamente y el C-terminal de una tercera proteína (ORF1). El producto del *orf3* es la enzima Glc (GlcA). Este gen se transcribe a partir de dos promotores: de su propio promotor y del otro promotor río arriba del *orf2* (Angell *et al.*, 1992). En mutantes de *S. coelicolor* resistentes a

2-dog el gen *glkA* (ORF3) por sí solo reestablece la actividad de Glk, la utilización de glucosa, así como la sensibilidad a 2-dog y a la RC, pero para alcanzar los niveles de actividad de Glk encontrados en la cepa silvestre es necesaria la transcripción a partir de ambos promotores. El análisis de la secuencia de *glkA* muestra la existencia de largas secuencias de aminoácidos similares a las encontradas en una familia de proteínas, conocida como la familia ROK (represor, orf, kinase), que incluye diversas glucosa-cinasas y proteínas represoras, como NagC de *E. coli* y XylR de *B. subtilis* (Titgemeyer *et al.*, 1994). Sin embargo, a diferencia de estas proteínas represoras, la Glk de *S. coelicolor* carece de una extensión en la región N-terminal con dominios de unión a ADN que se encuentra en las proteínas represoras (Titgemeyer *et al.*, 1994).

La función del producto del *orf2* aún no se conoce y su secuencia no se parece a ninguna de las proteínas reportadas, aunque la cotranscripción de *orf2* y *orf3* sugiere que existe alguna conexión funcional entre estos dos productos. Como ya fue mencionado, el gen *glkA* es capaz de reestablecer la sensibilidad a la RC en las mutantes sin *glkA* y *orf2*, lo que sugiere la hipótesis de que el *orf2* no es esencial para la RC.

Otro dato que apoya la participación de la Glk en la RC consiste en que el efecto represor de diversas fuentes de carbono como la arabinosa, galactosa, citrato y glutamato, sobre la expresión de la glicerol cinasa y la agarasa se pierde en mutantes de *S. coelicolor* con deleciones en el gen *glkA*, aún cuando estas fuentes no sean metabolizadas vía la glucosa cinasa (Kwakman y Postma, 1994).

Por otro lado, Angell *et al.* (1994) aislaron mutantes de *S. coelicolor* con deleciones en el gen *glkA* capaces de utilizar glucosa, las cuales aparentemente

expresan una segunda Glk, la GlkII. La GlkII reestableció la utilización de glucosa y la sensibilidad a 2-dog, pero no la sensibilidad del gen *dagA* a la RC. Al probar la movilidad electroforética de GlkII en un gel de actividad *in situ*, ésta fue diferente a la presentada por la Glk de la cepa original

Sin embargo, existen ciertas anomalías en esta historia de la Glk. Cuando el gen de quitinasa, *chi63*, aislado de *Streptomyces plicatus*, fue introducido en *S. coelicolor* A3(2) se observó que su expresión fue inducida por quitina y reprimida por glucosa, de una manera independiente a la GlkA (Ingram y Westpheling, 1995; Hodgson, 2000), mientras que la represión por glucosa de este mismo gen en *S. lividans* es dependiente de GlkA (Saito, 1998). Otros casos de represión por glucosa independiente de *glkA* fueron reportados para la α -amilasa de *Streptomyces reticuli* (Hodgson, 2000) y para α -amilasa de *Streptomyces kanamyceticus* (Flores *et al*, 1993).

Otra anomalía es la observación de que el gen de la α -amilasa de *S. limosus*, que se encuentra bajo la RC por manitol, cuando se transfiere a *S. coelicolor* A3(2), está sujeto a la RC por glucosa dependiente de *glkA*.

Existen evidencias de que la velocidad del crecimiento juega un papel importante en la represión de α -amilasa de *Streptomyces* sp. IMD 2679 (Hodgson, 2000)

3.3.3.2 *ccrA1*: Mutación en *Streptomyces coelicolor* que afecta el control de la represión catabólica

Recientemente Ingram *et al.* (1995) aislaron y caracterizaron una mutante de *S. coelicolor*, a la que llamaron *ccrA1*. La mutación *ccrA1* se localiza cerca del locus *argA* y es distinta de otras mutaciones involucradas en el control catabólico, como la *glkA*.

Fenotípicamente las mutantes *ccrA1* difieren de las mutantes *glkA*, porque pueden utilizar glucosa como única fuente de carbono y no son resistentes a 2-dog. Además estas mutantes exhiben una expresión anormal de los promotores sensibles a la RC *galP1*, *gyl* y *chi63*, pero no de los promotores insensibles a la RCC, como es el caso del promotor *galP2*. La transcripción del *galP1* y *gyl* aumenta aproximadamente 4-5 veces, tanto en condiciones de RC como en condiciones no represoras. La expresión del promotor *chi63* es muy baja en *S. coelicolor*. Sin embargo en presencia de la mutación *ccrA1* aumentó considerablemente, hasta estar sujeta a la RC (Ingram *et al.*, 1995). A pesar de que en esta mutante se incrementa la expresión de los promotores sensibles a la RC, éstos siguen sujetos a regulación.

Actualmente nada se sabe acerca de esta mutación a nivel molecular, por lo que es difícil especular sobre su papel en el mecanismo de RC. Sin embargo las evidencias fisiológicas mencionadas sugieren que *ccrA1* afecta la expresión de los promotores sensibles a la represión catabólica.

3.3.3.3 Mutantes *bld* insensibles a la represión catabólica

Las mutantes de *S. coelicolor* incapaces de producir hifas aéreas son conocidas como mutantes *bld* (calvas, del inglés bald). Recientemente Pope *et al* (1996) reportaron que en seis diferentes clases de estas mutantes la expresión del *galP1* es insensible a la represión catabólica. La posterior caracterización de las mutantes *bldA* y *bldB* indicó que en estas cepas la transcripción de *galP1* es independiente de galactosa e insensible a la RC. La complementación de estas mutantes con el gen *bldA* o *bldB* restaura tanto la sensibilidad a la RC, como la producción de hifas aéreas (Pope *et al*, 1996). Los estudios de regulación de otros genes sujetos a RC indican que en la mutante *bld* la expresión de *dagA* y *gyl* también es insensible a la RC y que la complementación de estas mutantes con el gen *bldB* reestablece la sensibilidad a la RC. La mutación *bldB* no afecta la expresión de promotores insensibles a la RC, lo que sugiere que esta mutación no afecta a la transcripción a nivel general, sino que afecta específicamente a los genes sujetos a la RC (Pope *et al.*, 1996).

3.3.3.4 Papel de GylR, Reg1 y MalR en la represión catabólica en *Streptomyces*

Aparentemente las mutaciones *glkA*, *ccrA1* y *bld* en *S. coelicolor* afectan a la represión catabólica a nivel general, es decir, afectan a la RC de un gran número de genes y operones no relacionados entre sí.

En el caso del operón *gyl*, se ha identificado una proteína específica, GylR que actúa como represor transcripcional de este operón, pero que no está involucrada en la RC de otros genes u operones. El operón *gyl* está precedido por el gen *gylR* que se transcribe en la misma dirección. Así, *gylR* y el operón *gyl* se transcriben por separado y la transcripción de los dos está sujeta a la RC (Smith y Chater, 1988 a,b; Hindle y Smith, 1994). Como ya se mencionó, las mutaciones *glkA*, *ccrA1* y *bld*, afectan la RC del operón *gyl*. El producto del gen *gylR* contiene un motivo de unión a DNA y comparte secuencias con un gran número de represores transcripcionales (Smith y Chater, 1988b). La interrupción del gen *gylR* ha demostrado que GylR actúa como represor transcripcional de *gyl* y *gylR* (Hindle y Smith, 1994).

Parece que la RC del operón *gyl* requiere tanto del represor específico (GylR) como del represor general (que pudiera ser la enzima Glk) (Hindle y Smith, 1994).

MalR y Reg1 son otras dos proteínas involucradas en la RC en los *Streptomyces*. MalR está codificada por el gen *malR* y presenta alta similitud con las proteínas represoras de la familia Lac/Gal. MalR controla la inducción del sustrato y junto con Glk participa en la represión por glucosa de la utilización de maltosa (Wezel *et al.*, 1997).

Reg1 es aparentemente la única proteína responsable de la RC por glucosa de los genes que codifican para α -amilasas en *S. lividans* y parece estar involucrada también en la regulación de la producción de quitinasa en este microorganismo (Nguyen *et al.*, 1997).

El papel de GylR, MalR y Reg1 en la RC sugiere que en *Streptomyces* pueden existir represores específicos además de una proteína o sistema represor general

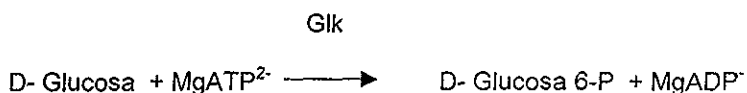
Basando se en todos estos resultados hemos diseñado el esquema que contiene los posibles mecanismos de la represión catabólica por glucosa en *Streptomyces* (Figura 8)

3.3.3.5 Efecto represor de la glucosa en la formación del micelio aéreo en *S. alboniger* vía acumulación de ácidos orgánicos

Un caso especial de RC fue reportado por Redshaw y *col* en el año 1976. Ellos reportan que el efecto represor de la glucosa en la formación del micelio aéreo en *Streptomyces alboniger* se debe a la acumulación de ácidos orgánicos. Surowitz y Pfister (1985) demostraron que la acumulación de los ácidos orgánicos fue resultado de un desequilibrio entre la glicólisis y el ciclo de Krebs inducido por la glucosa.

3.4 Glucosa cinasa

La glucosa cinasa cataliza el primer paso en el metabolismo de la glucosa, la fosforilación de la D-glucosa con ATP según la reacción:



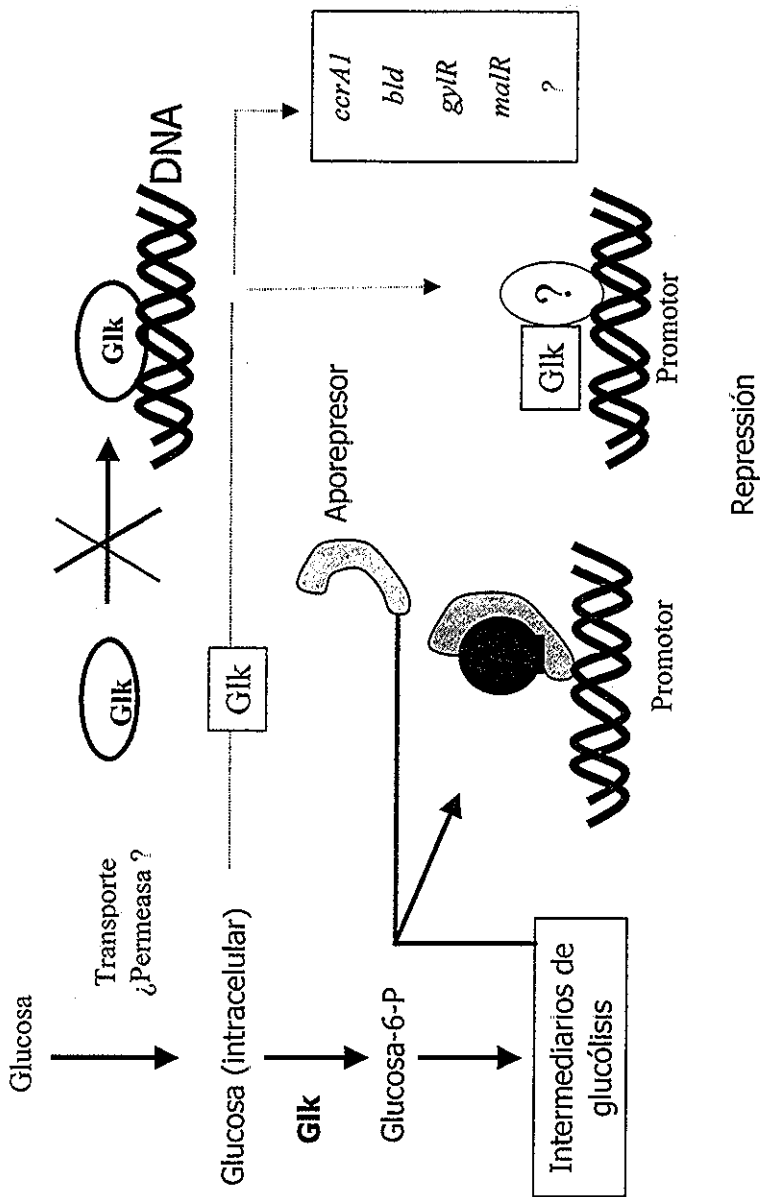


Figura 8 Posibles mecanismos de represión catabólica en el género *Streptomyces*

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Esta reacción ocurre tanto en los organismos procarióticos como en eucariontes. Sólo pocas especies, la mayoría bacterias y organismos unicelulares, poseen la glucosa cinasa verdadera (ATP: D-glucosa 6-fosfotransferasa, E.C. 2.7.1.2), es decir, la enzima específica para glucosa (Bork *et al.*, 1993).

Como ya se mencionó, el análisis de la secuencia de nucleótidos de la Glk de *S. coelicolor*, indica que esta enzima, junto con algunas otras azúcar cinasas, pertenecen a la familia ROK, pero a diferencia de las proteínas represoras de esta familia, las azúcar cinasas no tienen las secuencias de unión a DNA en sus regiones N-terminales. Hasta la fecha no se conoce la estructura tridimensional de ninguna de las proteínas de la familia ROK, aunque Swenson y Kregel ya están trabajando en la cristalización de la Glk de *S. coelicolor* (Swenson y Kregel, resultados no publicados).

La glucosa cinasa de *S. coelicolor* es una enzima constitutiva y fue purificada como Glk(His₆) por cromatografía de afinidad (Mahr *et al.*, 2000). El peso molecular de la enzima, determinado en un gel de poliacrilamida con SDS, fue de 36 kDa. La proteína purificada fue muy estable (durante varias semanas) a 4°C (Mahr *et al.*, 2000).

Analizando los elementos de estructura secundaria de esta proteína se predijo que la composición es: 32% de α -hélices, 26% de láminas β plegadas, 13% de giros- β y 29% plegamientos al azar (Geourjon y Deléage, 1995). Hasta enero del 2002, se han secuenciado 23 glucosa cinasas de diferentes orígenes, de acuerdo a datos del banco de datos Swissprot. La mayoría de las mismas no han sido purificadas ni caracterizadas bioquímicamente. Los pesos moleculares de las Glk

reportadas en el Swissprot están en la Tabla 1. Los valores de pH óptimos varían entre 6-9 y los valores de temperaturas óptimas de las Glks de organismos mesofílicos están dentro de un intervalo de 25 a 37°C (Bork *et al.*, 1993).

Los mecanismos cinéticos de algunas glucosa cinasas están en la Tabla 2.

Dominio	Especie	Peso molecular de subunidad (Da)	Número de subunidades
Bacteria	<i>Bacillus subtilis</i>	33545	-
	<i>Bacillus halodurans</i>	34496	-
	<i>Bacillus halodurans</i>	30715	-
	<i>Bacillus megaterium</i>	33899	-
	<i>B. stearothermophilus</i>	34500	2
	<i>Brucella abortus</i>	37607	-
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	34216	-
	<i>Escherichia coli</i>	24500	2
	<i>Mycobacterium leprae</i> ¹	34101	-
	<i>M. tuberculosis</i> ¹	27429	-
	<i>Mycoplasma pulmonis</i>	32189	-
	<i>Propionibacterium shermanii</i>	30000	2
	<i>Rhizobium loti</i>	34812	-
	<i>Lactococcus lactis</i>	33792	-
	<i>Staphylococcus xylosus</i>	35032	-
	<i>Streptococcus mutants</i>	24000	2
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	33397	-
	<i>Streptococcus pyogenes</i> ²	33367	-
	<i>Streptomyces coelicolor</i>	36000	4
	<i>Zymomonas mobilis</i>	35423	2
	<i>Xylella fastidiosa</i>	36119	-
	<i>Xylella fastidiosa</i>	36101	-
	Archaea	<i>Thermoplasma acidophilum</i>	35203
<i>Halobacterium sp.</i>		35203	-
<i>Pyrococcus furiosus</i>		47000	2
Eucaria	<i>Aspergillus niger</i>	54536	2
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	55377	1

¹ EC 2.7.1.63

² posible actividad de glucosa cinasa
- número de subunidades no determinado

Fuente: SWISSPROT
(<http://www.expasy.org/sprot>)

Tabla 1 Pesos moleculares de glucosa cinasas de diferentes orígenes

Tabla 2 Mecanismos cinéticos de glucosa cinasas de diferentes orígenes

Origen	Mecanismo	Referencias
<i>Streptococcus mutans</i> OMZ70	BiBi ordenado en equilibrio rápido, 1° sustrato: D-glucosa	Porter, E.V. et al., 1982
<i>Bacillus stearmophilus</i>	BiBi ordenado en equilibrio rápido, 1° sustrato: D-glucosa	Ishikawa, H. et al., 1987
<i>Zymomonas mobilis</i>	BiBi ordenado en estado estacionario, 1° sustrato: D-glucosa	Scopes R.K. y Bannon, D.R., 1995
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	BiBi ordenado en estado estacionario, 1° sustrato: ATPMg ²⁻	Hsieh et al., 1996
levadura *	BiBi ordenado en estado estacionario, 1° sustrato: D-glucosa	Noat et al., 1968
musculo esquelético de rata*	BiBi al azar	Voet, D. y Voet, G.V., 1990
	BiBi al azar en equilibrio rápido	Lueck, J. D. y Fromm, J. H., 1974

* hexocinasas

4 JUSTIFICACIÓN

El mecanismo de represión catabólica por fuente de carbono en el género *Streptomyces* está poco entendido. Los estudios de diferentes genes y operones han demostrado que son varias las proteínas involucradas en esta regulación, cuyo papel preciso no ha sido aclarado, y es muy probable que haya más proteínas por descubrir. Por esta razón, actualmente no es posible diseñar un esquema general del mecanismo de RC en este género o en otras bacterias Gram positivas con alto contenido de GC. Sin embargo, basándose en los resultados reportados, se puede proponer que la Glk juega un papel fundamental en esta regulación. Para poder evaluar el papel regulatorio de cada una de las proteínas involucradas será importante purificarlas y estudiar sus características bioquímicas, como por ejemplo en qué condiciones son más estables, cuáles son los valores de temperatura y pH óptimo, sus pI, conocer sus mecanismos y constantes cinéticos, etc

Con base en lo anterior en el presente trabajo nos planteamos el siguiente:

5 OBJETIVO GENERAL

Purificar y caracterizar bioquímicamente a la glucosa cinasa de *Streptomyces peucetius* var *caesius* y completar la caracterización de la glucosa cinasa de *Streptomyces coelicolor* para poder compararlas.

4 JUSTIFICACIÓN

El mecanismo de represión catabólica por fuente de carbono en el género *Streptomyces* está poco entendido. Los estudios de diferentes genes y operones han demostrado que son varias las proteínas involucradas en esta regulación, cuyo papel preciso no ha sido aclarado, y es muy probable que haya más proteínas por descubrir. Por esta razón, actualmente no es posible diseñar un esquema general del mecanismo de RC en este género o en otras bacterias Gram positivas con alto contenido de GC. Sin embargo, basándose en los resultados reportados, se puede proponer que la G1k juega un papel fundamental en esta regulación. Para poder evaluar el papel regulatorio de cada una de las proteínas involucradas será importante purificarlas y estudiar sus características bioquímicas, como por ejemplo en qué condiciones son más estables, cuáles son los valores de temperatura y pH óptimo, sus pI, conocer sus mecanismos y constantes cinéticos, etc

Con base en lo anterior en el presente trabajo nos planteamos el siguiente:

5 OBJETIVO GENERAL

Purificar y caracterizar bioquímicamente a la glucosa cinasa de *Streptomyces peucetius* var *caesius* y completar la caracterización de la glucosa cinasa de *Streptomyces coelicolor* para poder compararlas.

5.1 Objetivos particulares

- I. Localizar las enzimas dentro de las células
- II. Optimizar el método de extracción de la enzima de la célula
- III. Determinar su pH óptimo, pI, temperatura óptima y estabilidad a diferentes temperaturas y valores de pH
- IV. Purificar la enzima
- V. Determinar el mecanismo cinético, V_{\max} y K_m para los dos sustratos
- VI. Comparar las glucosa cinasas de los dos microorganismos

6 HIPÓTESIS

S. coelicolor y *S. peucetius* var. *caesius* pertenecen al mismo género bacteriano, pero la distancia filogenética entre ambos permite suponer que sus glucosa cinasas pudieran ser diferentes

5.1 Objetivos particulares

- I. Localizar las enzimas dentro de las células
- II. Optimizar el método de extracción de la enzima de la célula
- III. Determinar su pH óptimo, pI , temperatura óptima y estabilidad a diferentes temperaturas y valores de pH
- IV. Purificar la enzima
- V. Determinar el mecanismo cinético, V_{max} y K_m para los dos sustratos
- VI. Comparar las glucosa cinasas de los dos microorganismos

6 HIPÓTESIS

S. coelicolor y *S. peucetius* var. *caesius* pertenecen al mismo género bacteriano, pero la distancia filogenética entre ambos permite suponer que sus glucosa cinasas pudieran ser diferentes

7 MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Microorganismos y su cultivo

Los microorganismos utilizados en esta investigación fueron *Streptomyces peuceii* var. *caesius* NRRL B-5337 (cepa depositada y mantenida en la colección de cultivos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM) y *Streptomyces coelicolor* M145 (cepa donada por el Dr. Luis Servín, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM). Las esporas de los microorganismos se obtuvieron según Segura *et al.*, 1996.

Los cultivos de las cepas se realizaron a partir de inóculos obtenidos en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 25 ml de medio YMG-1, que contenían extracto de levadura 0.4%, extracto de malta 1.0%, glucosa 0.4% y agua destilada. El pH fue ajustado a 7.2 y se agregaron 5 perlas de vidrio de diámetro 5 mm antes de esterilizar el medio (Segura *et al.*, 1996). El micelio obtenido después de 48 horas de incubación a 29°C y 180 rpm, lavado tres veces con solución salina isotónica estéril (SSI; NaCl 0.85%) se utilizó para sembrar los matraces Fernbach de 2.8 L que contenía 500 ml de medio YMG-2 (extracto de levadura 0.3%, extracto de malta 0.3%, glucosa 1.8%, pH 7.2) y 10 perlas de vidrio de diámetro 5 mm por matraz. Después de 48 horas incubación a 29°C y 180 rpm, el cultivo se filtró bajo vacío utilizando filtros Whatman No. 40 (50 ml de cultivo/filtro). El micelio recuperado en el filtro se lavó con solución salina isotónica y las células fueron

deshidratadas con 50 ml de acetona. Las células deshidratadas (polvos de acetona) se guardaron a -20°C hasta su uso.

Se probó también desintegración de las células con ultrasonido. Para la desintegración con ultrasonido se tomaron 25 ml de un cultivo de 48 hrs, el micelio se lavó 2 veces con solución salina isotónica y posteriormente se resuspendió en 3 ml de Tris-HCl 50 mM, pH 7.2. Se sonicaron las muestras del micelio fresco y también del micelio congelado (durante 7 días a -20°C) 6 veces durante 10 segundos en frío (Soniprep 150).

7.2 Obtención de extracto libre de células

Para la obtención de los extractos enzimáticos se trituraron los polvos de acetona (1 mg) en un mortero con hielo seco para desintegrar las células. El micelio triturado se resuspendió en 3 ml de amortiguador Tris-HCl, 50 mM (pH 7.2). Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a $245,000\times g$ durante 1 hora en la ultracentrifuga Beckman L8-55M, utilizando el rotor SW 50.1. El sobrenadante se concentró (aprox. 15 veces) por centrifugación ($1,100\times g$, 30 min) en los conos de membrana con el tamaño de poro de 25,000 Da en la centrifuga Beckman J2-MC, utilizando el rotor JA-20. Los extractos libres de células (20-30 mg de proteína ml^{-1}) se guardaron a -20°C hasta su uso. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry (Lowry *et al*, 1951), usando como estándar albúmina sérica bovina.

7.3 Determinación de la actividad enzimática

La actividad de glucosa cinasa se determinó en los extractos libres de células, midiendo espectrofotométricamente la reducción de NADP⁺ ($\epsilon = 6.22 \text{ cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$) a 340 nm en una reacción acoplada con glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) (Angell, 1992). El sistema de reacción contenía Tris-HCl 100 mM, pH 7.5, D-glucosa 10 mM, MgCl₂ 5mM, ATP 1 mM, y G6PDH 0.7U ml⁻¹. Para convertir el cambio en unidades de absorbancia en velocidad de formación de NADPH se utilizó la ecuación de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon \times d \times c$$

donde A es la absorbancia, ϵ es el coeficiente de absorción molar ($\epsilon_{\text{NADPH}} = 6.3 \text{ L mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y d es la longitud de celda (1 cm). La actividad (z) de la Glk se calculó según la siguiente ecuación:

$$z = \frac{\Delta A \times V}{\Delta t \times \epsilon \times d \times v}$$

donde V es el volumen total de ensayo, v es el volumen del extracto enzimático, t el tiempo. La actividad de la Glk fue expresada en unidades, donde una unidad fue definida como nmoles de NADP reducidos por minuto a 25°C

Se utilizó esta definición de unidad en congruencia con lo publicado por otros autores que trabajan con la Glk de *S. coelicolor*.

Nota: En 1961, la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica recomendó el empleo de una unidad estándar (international unit) para todas las enzimas, la cual viene definida como sigue:

“Una unidad (U) de una enzima es la cantidad que catalizará la transformación de un micromol de sustrato por minuto bajo condiciones definidas”

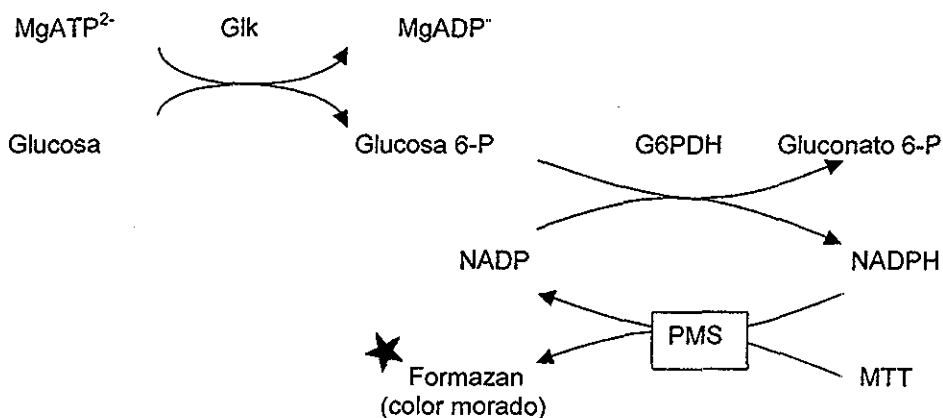
Las condiciones definidas comprenden la temperatura, el pH, el sistema tampón, la concentración del sustrato y el cofactor

(<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/nomenclature/>)

7.4 Zimograma de la actividad de glucosa cinasa

Los extractos enzimáticos de las dos cepas se sometieron a electroforesis a 4°C en un gel de poliacrilamida al 10%(p/v) en condiciones no desnaturalizantes. Para evitar la inactivación de la enzima por TEMED o persulfato de amonio, el gel se dejó correr una hora antes de que las muestras se cargaran. Después de la electroforesis, el gel se lavó con amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.2 antes de revelar la actividad, con el fin de evitar la inhibición de la mezcla de revelado por el amortiguador alcalino de corrida

La glucosa cinasa se localizó en el gel usando un sistema de revelado basado en la formación de formazan por la reducción del metil-tiazolil-tetrazolium (MTT), en presencia de fenozin meto-sulfato (PMS), según la reacción (Harris y Hopkinson, 1976):



La mezcla de reacción (10 ml) se aplicó al gel de electroforesis como un gel de agarosa al 0.8%, que contenía Tris-HCl 100 mM, pH 7.5, glucosa 20 mM, MgCl_2 25 mM, NADP^+ 0.5 mM, ATP 1 mM, MTT 0.17 mg ml^{-1} , fenozin meto-sulfato 0.08 mg ml^{-1} y 0.5U ml^{-1} de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa. Las bandas fueron visibles después de 5 - 10 min de incubación en oscuridad a 42°C.

7.5 Purificación de la glucosa cinasa

La purificación se realizó a 4°C sin protección contra el oxígeno. 1 ml del extracto libre de células concentrado se cargó a un gel de poliacrilamida preparativo a 6% (p/V). Después de la separación electroforética, la banda correspondiente a la glucosa cinasa (localizada en el gel como se describió en el punto 7.4) fue cortada y electroeluida al amortiguador Tris-HCl (50 mM, pH 7.2), con glicerol (10% v/v) y

glucosa (100 mM). La pureza de la enzima fue determinada por electroforesis en condiciones nativas y desnaturalizantes. Las bandas de proteína fueron visualizadas por tinción con azul brillante de Coomassie R-250 (Rosenberg, 1996).

7.6 Determinación del peso molecular

El peso molecular de la Glk purificada de *S. peucetius* var. *caesius* fue determinado por espectrometría de masas usando un espectrómetro con trampa de iones "Esquire" (Brucker-Flanzen Analytical GMBH) como fue descrito por Jensen *et al.*, 1998 en Kratos Analytical Corp., Boston, MA

7.7 Análisis de los aminoácidos de los extremos amino- y carboxilo terminal

La secuenciación del extremo amino terminal de la Glk purificada se realizó en el secuenciador automático "Applied Biosystem 476A Sequencer" (Automated Edman Protein Degradation), según las instrucciones del fabricante. La proteína fue modificada con fenilisotiocianato, para obtener los derivados de feniltiohidantoina (PTH-aminoácidos). Los PTH-aminoácidos fueron analizados como reportó Hoving (Hoving *et al.*, 2000).

La caracterización de la secuencia de aminoácidos del extremo carboxilo terminal (Fig. 8) se realizó según Sechi y Chait (2000). La secuenciación fue realizada en Kratos Analytical Corp., Boston, MA.

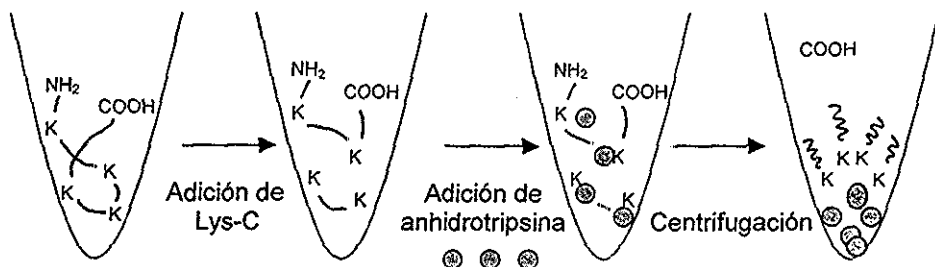


Figura 8 Esquema de obtención del extremo carboxilo terminal de una proteína para su secuenciación de aminoácidos. La proteína disuelta y digerida por la endoproteasa Lys-C fue incubada en presencia de anhidrotripsina acoplada a agarosa. Después de una centrifugación, el extremo carboxilo se recupera en el sobrenadante, mientras todos los demás péptidos quedan en el botón unidos a la anhidrotripsina-agarosa. El carboxilo terminal fue identificado por comparación de espectros de masas MALDI-TOF obtenidos antes y después de la incubación con anhidrotripsina. La secuencia de aminoácidos se obtuvo analizando el sobrenadante en un cromatógrafo de líquidos acoplado a un espectrofotómetro de masas.

7.8 Determinación del pH óptimo y el efecto de pH a la estabilidad

El pH óptimo fue determinado a 25°C utilizando amortiguador Tris-malato 100 mM en el rango de pH de 5.5 a 9.0, y Tris-HCl 100 mM en el rango de pH de 7.0 a 8.0. Se tomó la precaución de que la enzima auxiliar (G6PDH) no fuera limitando en los diferentes valores de pH. El efecto de pH sobre la estabilidad de la enzima fue estudiado a dos diferentes temperaturas: 4 y -20°C, incubando a la enzima en el amortiguador Tris-malato a diferentes valores de pH de 6 a 9, 5 días a 4°C y 1 mes a -20°C. La actividad de la enzima fue determinada a pH 7.5.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7.9 Determinación del pI

El punto isoeléctrico de la glucosa cinasa se determinó con el equipo Phastsystem (Pharmacia), utilizando placas de isoelectroenfoque con un gradiente de pH 3-9.

7.10 Efecto de temperatura sobre la cinética de la reacción catalizada y termoestabilidad de la enzima

El efecto de la temperatura sobre la actividad fue determinado midiendo la actividad enzimática a diferentes temperaturas en el intervalo de 25 a 50°C. La energía de activación se calculó según la ecuación de Arrhenius:

$$k = A e^{-E_a/RT}$$

donde k es la constante de velocidad, A es la constante de Arrhenius, E_a es la energía de activación, R es la constante universal de los gases y T es la temperatura absoluta.

La termoestabilidad de la enzima fue determinada incubando la muestra a diferentes temperaturas (-20, 4 y 25°C), utilizando el amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.2. La actividad se midió a 25°C, pH 7.5. La constante de velocidad del decaimiento de la actividad se determinó incubando la muestra a 37°C, midiendo la actividad de Glk cada 15 min durante dos horas.

7.11 Estudios cinéticos

La reducción de NADP⁺ se cuantificó a 340 nm a 25±2°C utilizando un espectrofotómetro Spectronic 21D (Spectronic Instruments). La actividad se determinó variando las concentraciones de glucosa (de 0 a 25 mM) y de ATP (de 0 a 2 mM). El efecto del ion de magnesio se estudio variando su concentración de 0 a 25 mM. La D- fructosa y el MgADP⁺ se utilizaron como análogos de los sustratos en los estudios de inhibición. Para determinar los valores de V_{max} y K_m para cada sustrato, los datos se ajustaron a la ecuación de Michaelis Menten utilizando un programa de regresión no lineal (Sigma Plot 5.0)

8 RESULTADOS

8.1 Localización de la enzima dentro de la célula

Analizando la actividad de Glk de *S. peucetius* var. *caesius* y de *S. coelicolor* en la fracción citosólica y en la fracción membranal, encontramos que el 96% de la actividad total se encuentra en la fracción citosólica. Analizando el zimograma de la actividad no se encontraron isoformas de la enzima en ninguno de los dos microorganismos. Se obtuvo la mayor actividad dejando crecer a las células 48 horas.

8.2 Optimización de las condiciones de extracción de la enzima

Se compararon dos métodos de desintegración de las células: por sonicación del micelio fresco o congelado y por desintegración de polvos de acetona con hielo seco (descrito en Matariel y métodos). Los resultados de estos experimentos se muestran en la Fig 9. La actividad de Glk obtenida por ultrasonicación del micelio fresco o por desintegración con hielo seco fue muy parecida, sin embargo en las muestras congeladas durante 7 días a -20°C no se detectó actividad de Glk. Por ello se decidió utilizar el método de desintegración con hielo seco, ya que los polvos de acetona se pueden guardar por largos periodos (3 años) a -20°C sin pérdida de actividad de la Glk.

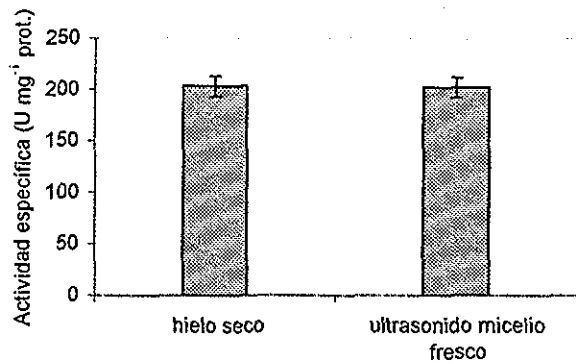


Figura 9 Actividad específica de la glucosa cinasa de *S. peuceletius* var. *caesioides* en la fracción citosólica obtenida por la desintegración de las células con hielo seco y por sonicación del micelio fresco, como fue descrito en Material y métodos

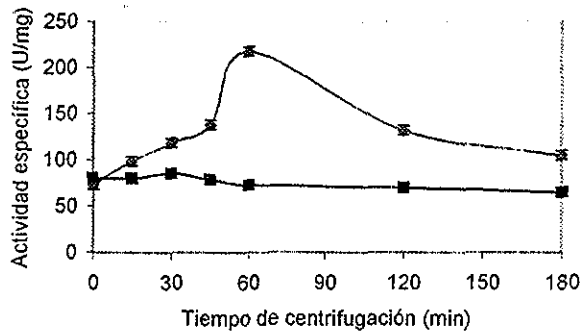


Figura 10 Optimización del tiempo de centrifugación para obtener la máxima actividad de glucosa cinasa de *S. peuceletius* var. *caesioides* en la fracción soluble después de la ruptura de las células (● muestra sometida a centrifugación, ■ control sin centrifugación)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Para obtener la máxima actividad específica de Glk en la fracción citosólica se probaron diferentes tiempos de ultracentrifugación (Fig 10). Como control se tomó muestra después de la ruptura de las células con hielo seco sin centrifugación, guardada a 4°C. Los resultados de este experimento demuestran que la máxima actividad específica de la Glk fue obtenida después de una hora de centrifugación a 245,000xg.

8.3 Purificación de la glucosa cinasa

La Glk de *S. peucetius* var. *caesius* fue purificada 292 veces, electroeluyendo la banda correspondiente a la enzima de un gel preparativo de poliacrilamida al 6% (p/v), corrido en condiciones no desnaturalizantes (Tabla 3).

Tabla 3 Purificación de la glucosa cinasa de *S. peucetius* var. *caesius*

Las actividades específicas fueron determinadas a 25°C

	Actividad total (unidades)	Proteína (mg)	Actividad específica (unidades mg ⁻¹ prot)	Factor de purificación (veces)	Rendimiento (%)
Extracto libre de Células	4219.3	22.9000	184.2	1	100
Electroforesis	478.8	0.0089	53,797.7	292	11.3

La pureza de la enzima fue verificada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (Fig. 11).

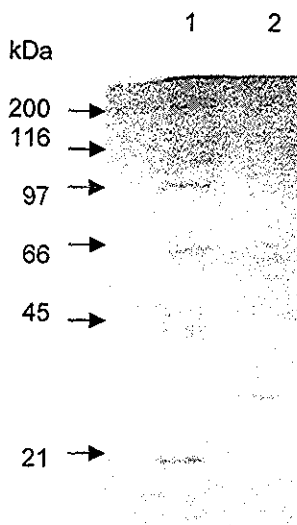


Figura 11 Electroforesis en gel de poliacrilamida corrido en condiciones desnaturizantes. Carril 1: marcadores de peso molecular, carril 2 contiene 0.75 μg de glucosa cinasa de *S. peuceitius* var. *caesius* purificada. La proteína se tiñó con azul de Coomassie.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

8.4 Determinación del peso molecular de la enzima

El peso molecular de la glucosa cinasa nativa de *S. peuceetius* var. *caesius* determinado por electroforesis a varias concentraciones de acrilamida en condiciones no desnaturalizantes fue de 132 ± 13 kDa. El peso molecular determinado por electroforesis en geles de acrilamida con SDS fue de 31.0 ± 1.5 kDa. De acuerdo a estos resultados se sugiere que la enzima está compuesta de cuatro subunidades idénticas. El peso exacto de la subunidad determinada por espectrometría de masas fue de 30961.4 ± 1.5 Da (Fig. 12). Después de algunas horas de almacenamiento a 4°C , el 85% de la enzima total de *S. peuceetius* var. *caesius* se encontró en su forma dimérica. La disociación del tetrámero se evitó adicionando glucosa 100 mM al amortiguador de electroelución (Fig. 13), sugiriendo que la presencia del sustrato estabiliza la conformación tetramérica. Este comportamiento de dimerización no fue observado con la glucosa cinasa de *S. coelicolor* (resultados no presentados).

En presencia de otras fuentes de carbono (fructosa, galactosa, arabinosa y 2-DOG), utilizando el mismo amortiguador de elución, la Gik no logró tetramerizar (Fig. 14).

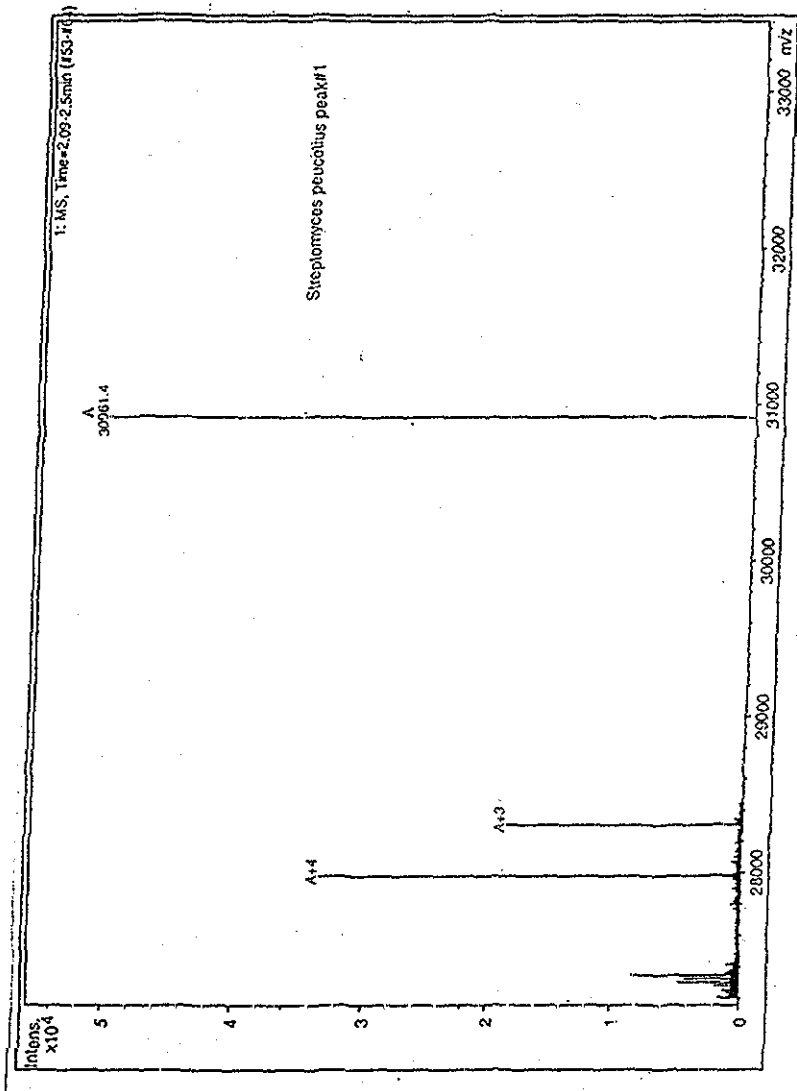


Figura 12 Determinación del peso molecular de la glucosa cinasa de *S. peuceiius* var. *caesius* por espectrometría de masas usando un espectrómetro con trampa de iones "Esquire" como fue descrito en Material y métodos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

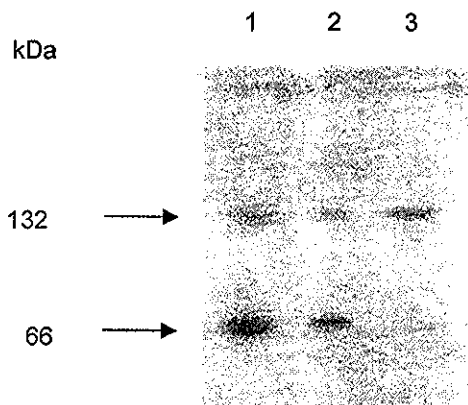


Figura 13: Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% (p/v) corrido en condiciones no desnaturalizantes. Carril 1: marcadores del peso molecular, glucosa cinasa de *S. peucetius* var. *caesius* purificada sin (carril 2) y con presencia de glucosa 100 mM (carril 3) en el amortiguador de electroelución.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

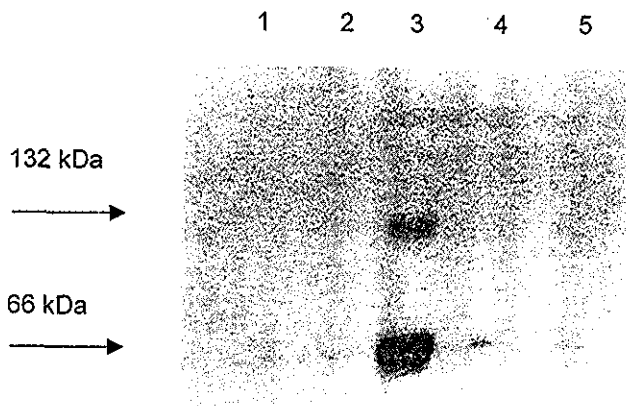


Figura 14: Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% (p/v) corrido en condiciones no desnaturalizantes. Carril 1,2,4,5: glucosa cinasa de *S peuceetius* var. *caesius* purificada con presencia de galactosa (1), arabinosa (2), fructosa (4) y 2-deoxiglucosa (5) en el amortiguador de electroelución. La concentración de todas las fuentes de carbono fue de 100 mM. Carril 3: marcadores del peso molecular

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Para comparar el peso molecular de la Glk de *S. peucetius* var. *caesius* con la de *S. coelicolor*, se hizo un zimograma de actividad (Fig. 15). El peso molecular de la enzimas nativas es igual. En un gel de poliacrilamida corrido en las condiciones desnaturalizantes de Glk de *S. coelicolor* se confirmó que la enzima está compuesta de 4 subunidades de 32 kDa cada una (resultados no presentados).



Figura 15 Comparación de peso molecular de la Glk de *S. coelicolor* (carril 1) con la de *S. peucetius* var. *caesius* (carril 2) por zimograma. Los extractos enzimáticos se sometieron a electroforesis en un gel nativo de poliacrilamida a 10% (p/v). La actividad de Glk se reveló a 42°C. En cada carril se colocó 40 µg de proteína.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

8.5 Determinación del pH óptimo y estabilidad a pH

La máxima actividad de la glucosa cinasa de *S. peucetius var caesius* se encontró a pH 7.5 (Fig. 16A), la de *S. coelicolor* a pH 7.6 (Fig. 16B). Estudiando el efecto del pH sobre la estabilidad de la enzima cruda de los dos microorganismos se determinó que la mayor estabilidad fue a pH 7.2 a las tres temperaturas probadas (-20, 4 y 25°C).

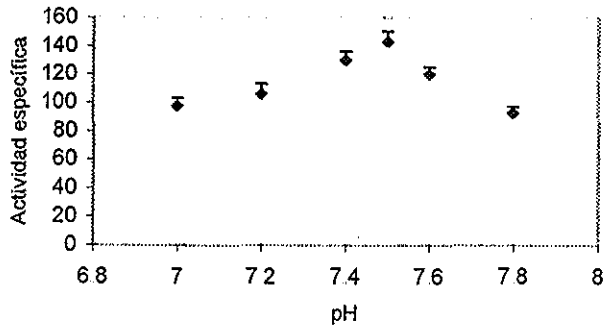
8.6 Efecto de la temperatura sobre la cinética de la reacción catalizada y termoestabilidad de la enzima

La termoestabilidad de la enzima cruda y purificada de *S. peucetius var. caesius* fue determinada a -20, 4 y 25 °C. La termoestabilidad de la enzima cruda y purificada de *S. coelicolor* fue determinada a -20 y 4°C. La enzima cruda de las dos bacterias fue muy estable a -20°C (por lo menos durante dos años).

Los estudios realizados con la Glk de *S. peucetius var caesius* mostraron que la enzima purificada fue estable a -20°C durante dos meses. A 4°C la enzima cruda no perdió actividad después de dos semanas de incubación, mientras que la enzima purificada fue estable sólo 24 horas. Incubándola 150 min a 25°C, la enzima cruda y purificada perdió 40 y 100% de su actividad, respectivamente.

En presencia de glucosa 100 mM, la estabilidad a 4°C y a 25°C se incrementó. Las constantes de velocidad del decaimiento, que se obtuvieron al incubar a la enzima a 37°C en presencia y ausencia de glucosa 100 mM fueron de $(5.1 \pm 0.5) \times 10^{-5}$ y $(3.3 \pm 0.3) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, respectivamente.

A



B

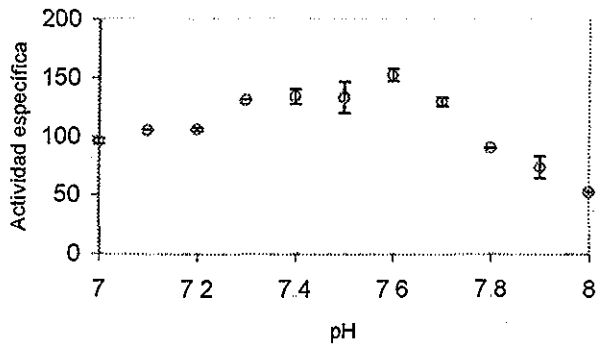


Figura 16 Determinación del pH óptimo de la glucosa cinasa de *S. peuceletius* var *caesioides* (A), y de *S. coelicolor* (B). El pH óptimo fue determinado a 25°C utilizando el amortiguador Tris-HCl 100 mM como se describe en la metodología

La Glk de *S. coelicolor* purificada mantuvo 100% de su actividad después de 1 mes de congelación a -20°C . La vida media de las dos glucosa cinasas purificadas, determinada a 4°C está en la Tabla 4

Tabla 4 Tiempos de vida media de la glucosa cinasa

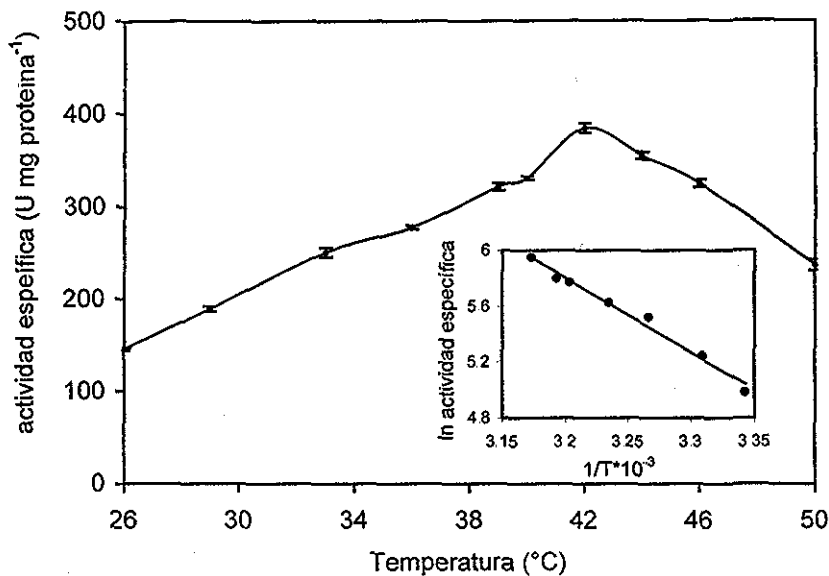
	Glucosa cinasa de	
	<i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i>	<i>S. coelicolor</i>
$t_{1/2}$ (a 4°C)	8.3 h	13.6 h
$t_{1/2}$ (a 25°C)	52.5 min	N.D

La dependencia de la actividad de las Glk de los dos microorganismos a la temperatura se muestra en la Figura 17 y en la Tabla 5

Tabla 5 Efecto de la temperatura sobre la actividad de la glucosa cinasa

	Glucosa cinasa de	
	<i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i>	<i>S. coelicolor</i>
La máxima actividad fue determinada a	42°C	33°C
E_a (kJ mol^{-1})	42.8 ± 4.5	30.6 ± 3.2

A



B

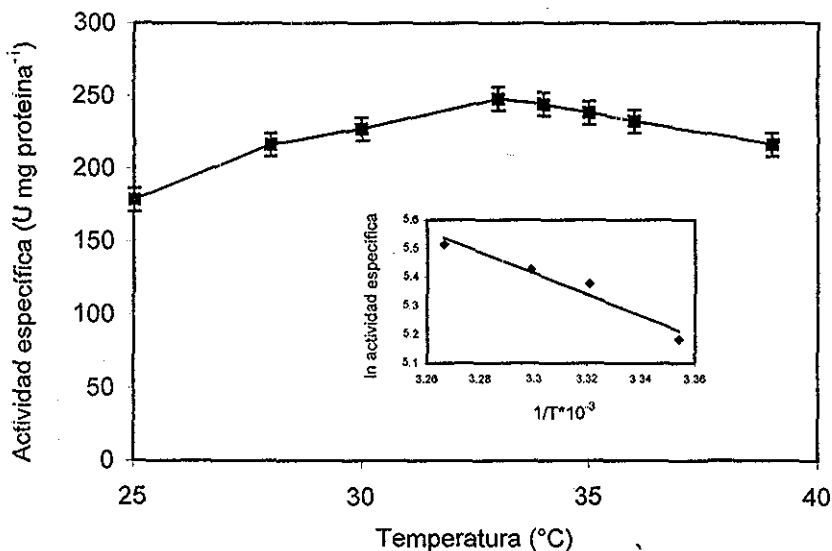


Figura 17 Efecto de la temperatura a la actividad de glucosa cinasa, A: de *S. peucetius* var. *caesius*, B: de *S. coelicolor*. La actividad se determinó midiendo la reducción de NADP a diferentes temperaturas, cómo se describió en Material y métodos. *Insertos*: Gráficas de Arrhenius de los valores de 26 a 42°C (A) y de 25 a 33°C (B)

8.7 Análisis de la secuencia de aminoácidos de los extremos amino y carboxilo terminal de la glucosa cinasa de *S. peucetius* var. *caesius*

Se determinó la siguiente secuencia de aminoácidos del extremo amino terminal (los primeros dieciséis residuos):

S. peucetius var. *caesius*: NH_3^+ , MGLTIGVDIG- - - - AAGVPD

S. coelicolor: NH_3^+ , MGLTIGVDIGGTKIAAGVVD (Angell, 1994)

La secuencia de aminoácidos del carboxilo terminal fue la siguiente:

S. peucetius var. *caesius*: VYFAREPDPIIM, COO^-

S. coelicolor: ADLAREPDPIIM, COO^- (Angell, 1994)

Comparando las secuencias de los aminoácidos de las dos glucosa cinasas se observaron diferencias tanto en el extremo amino- como en el carboxilo terminal. Se observó que la Glk de *S. peucetius* var. *caesius* tiene incompleta la secuencia de unión al ATP (residuos 8-12 del extremo amino terminal de la Glk de *S. coelicolor*, Angell, 1992).

8.8 Estudios cinéticos

Los estudios de las velocidades iniciales (Fig. 18, 19) de las glucosa cinasas de los dos microorganismos muestran que el mecanismo es BiBi ordenado en equilibrio rápido según la Fig. 20:

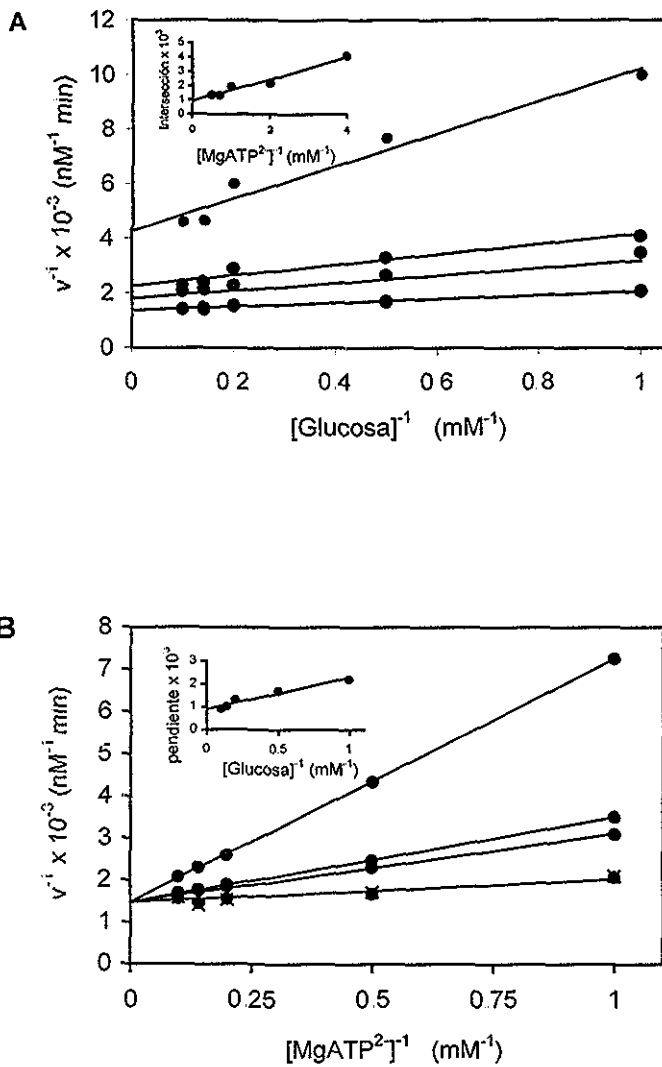
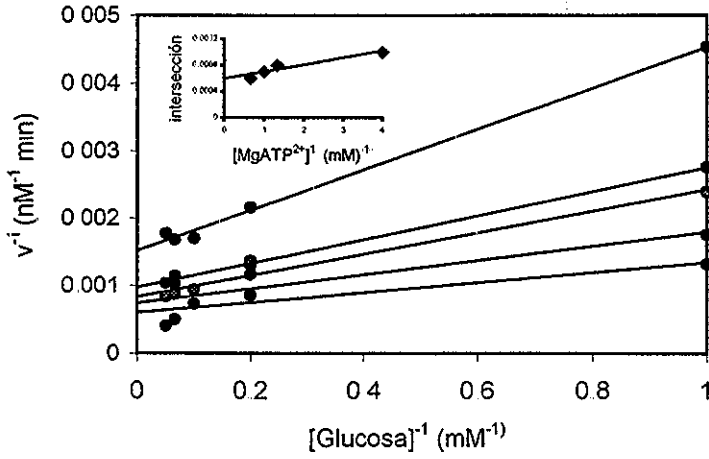


Figura 18 A,B Dobles recíprocos de las velocidades iniciales de la reacción catalizada por la glucosa cinasa de *S. peuceletius* var. *caesioides* A variando las concentraciones de glucosa y fijando las concentraciones de MgATP^{2-} (0.25, 0.5, 1 y 1.5 mM) *Inserto*: Intersección con el eje "y" contra los recíprocos de la concentración de MgATP^{2-} . B variando las concentraciones de MgATP^{2-} y fijando las concentraciones de glucosa (1, 2, 5, 7 y 10 mM) *Inserto*: pendiente contra los recíprocos de concentración de glucosa

A



B

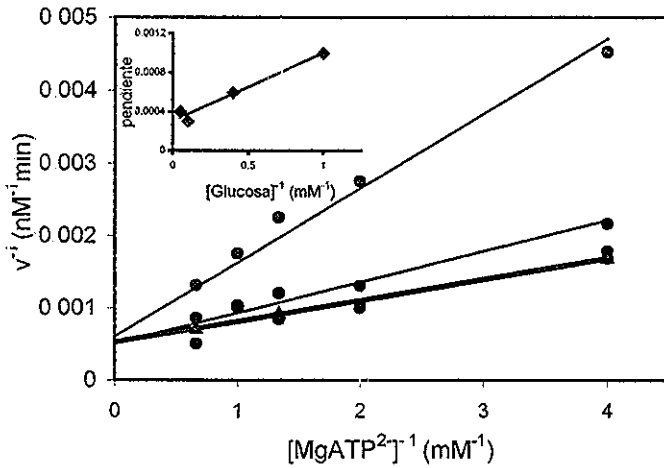


Figura 19 A,B Dobles recíprocos de las velocidades iniciales de la reacción catalizada por la glucosa cinasa de *S. coelicolor*. A, variando las concentraciones de glucosa y fijando las concentraciones de MgATP^{2-} (0.25, 0.5, 1 y 1.5 mM). *Inserto*: Intersección con el eje "y" contra los recíprocos de la concentración de MgATP^{2-} . B, variando las concentraciones de MgATP^{2-} fijando las concentraciones de glucosa (1, 2, 5, 7 y 10 mM). *Inserto*: pendiente contra los recíprocos de concentración de glucosa.

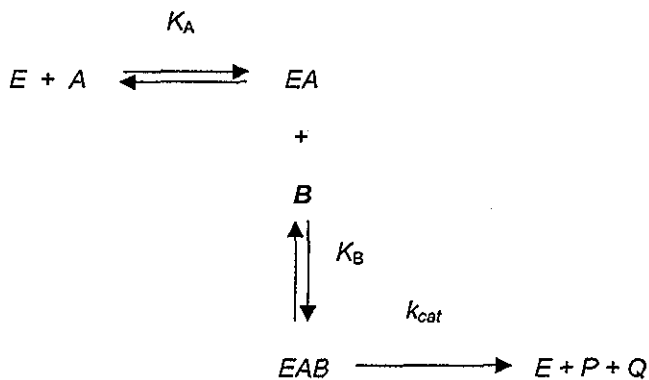


Figura 20 Mecanismo cinético de la glucosa cinasa

La deducción de la ecuación de velocidad para este mecanismo es la siguiente:

$$v = k_{cat} [EAB] \quad [1]$$

la concentración de enzima total, $[E_T]$ según el esquema 4, es:

$$[E_T] = [E] + [EA] + [EAB] \quad [2]$$

$$\frac{v}{[E_T]} = \frac{k_{cat} [EAB]}{[E] + [EA] + [EAB]} \quad [3]$$

en términos de las constantes de disociación:

$$\frac{v}{[E_T]} = \frac{k_{cat} \frac{[A][B]}{K_A K_B}}{1 + \frac{[A]}{K_A} + \frac{[A][B]}{K_A K_B}} \quad [4]$$

reorganizando terminos:

$$v = \frac{V_{max} [A][B]}{K_B(K_A + [A]) + [A][B]} \quad [5]$$

donde v , V_{max} , $[A]$, $[B]$, K_A , K_B representan la velocidad inicial, la velocidad máxima, la concentración del sustrato A (D-glucosa), la concentración del sustrato B ($MgATP^{2-}$), la constante de Michaelis para el sustrato A y B, respectivamente. Modificando la ecuación [5] para expresarla en función del sustrato A, cuando la [B] se mantiene constante:

$$v = \frac{V_{max}[A]}{K_A K_B/[B] + [A] (1+K_B/[B])} \quad [6]$$

la ecuación de la doble recíproca de [6]:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_A K_B}{V_{max}[B]} \frac{1}{[A]} + \frac{K_B}{V_{max}[B]} + \frac{1}{V_{max}} \quad [7]$$

La ecuación [7] representa una línea recta, cuya ordenada al origen es:

$$b = \frac{K_B}{V_{max}[B]} + \frac{1}{V_{max}} \quad [8]$$

La representación gráfica de la ecuación [8] es también una línea recta (Figura 21).

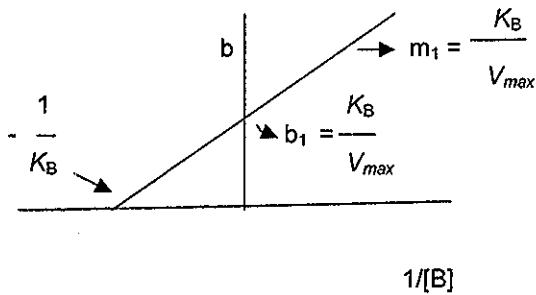


Figura 21 Representación gráfica de la ecuación [8]

Modificando la ecuación [5] en función del sustrato B, cuando la [A] se mantiene constante:

$$v = \frac{V_{max}[B]}{K_A K_B/[A] + K_B + [B]} \quad [9]$$

la ecuación de doble recíproca de [9] :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_A K_B/[A] + K_B + [B]}{V_{max}[B]} \quad [10]$$

La ecuación [10] es también ecuación de una línea recta, cuya pendiente es:

$$m = \frac{K_A K_B}{V_{max}[A]} + \frac{K_B}{V_{max}} \quad [11]$$

La representación gráfica de la ecuación [11] está en la Figura 22

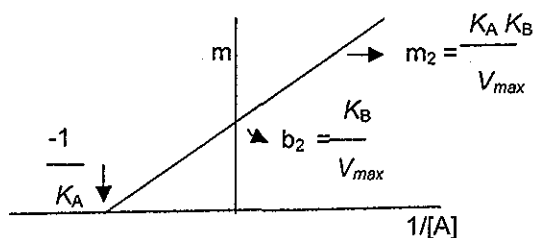


Figura 22 Representación gráfica de la ecuación [11]

Los valores de V_{max} , K_A and K_B , obtenidos por regresión no lineal global utilizando la ecuación [5] están en la Tabla 6.

Tabla 6 Características cinéticas de la glucosa cinasa de *Streptomyces coelicolor* y de *Streptomyces peucetius* var. *caesius*

	Glucosa cinasa de	
	<i>S. coelicolor</i>	<i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i>
V_{max} (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	1666.7±170.0	1086.7±28.6
K_A (mM)	1.4±0.1	1.6±0.2
K_B (mM)	0.5±0.1	0.8±0.1

Para confirmar el mecanismo cinético, se realizaron los estudios de las velocidades iniciales en presencia de análogos de los dos sustratos. Se utilizó la

D-fructosa (I) como análogo de la D-glucosa, y el MgADP⁻ (Y), como análogo del MgATP²⁻.

Si el mecanismo cinético es BiBi ordenado se pueden esperar las siguientes interacciones según la figura 23:

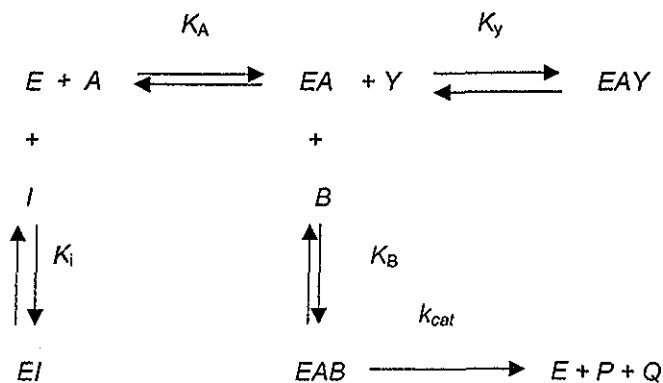


Figura 23 Mecanismo de acción de la glucosa cinasa en presencia de inhibidores

En presencia de la D-fructosa (I), la concentración de la enzima total [E_T] es:

$$[E_T] = [E] + [EA] + [EAB] + [EI] \quad [12]$$

$$v = k_{cat} [EAB] \quad [13]$$

$$\frac{v}{[E_T]} = \frac{k_{cat} [EAB]}{[E] + [EA] + [EAB] + [EI]} \quad [15]$$

$$\frac{v}{[E_T]} = \frac{k_{cat} \frac{[A][B]}{K_A K_B}}{1 + \frac{[A]}{K_A} + \frac{[A][B]}{K_A K_B} + \frac{[I]}{K_i}} \quad [16]$$

$$v = \frac{V_{max} [A][B]}{K_A K_B (1 + [I]/K_i) + K_B [A] + [A][B]} \quad [17]$$

Modificando la ecuación [17] en función de [A], cuando la [B] se mantiene constante:

$$v = \frac{V_{max} [A]}{K_A K_B / [B] + [I] K_A K_B / [B] K_i + A (K_B / [B] + 1)} \quad [18]$$

La ecuación de la doble recíproca:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_A K_B / [B] + [I] K_A K_B / K_B K_i}{V_{max}} \frac{1}{[A]} + \frac{(K_B / [B] + 1)}{V_{max}} \quad [19]$$

Como se puede ver, la presencia del inhibidor I afecta únicamente la pendiente, es decir, es un inhibidor competitivo con respecto al primer sustrato A

Modificando la ecuación [17] en función de [B], cuando la [A] se mantiene constante:

$$v = \frac{V_{max} [B]}{K_A K_B / [A] + [I] K_A K_B / [A] K_i + K_B + [B]} \quad [20]$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_A K_B / [A] + [I] K_A K_B / [A] K_i + K_B}{V_{max}} \frac{1}{[B]} + \frac{1}{V_{max}} \quad [21]$$

Con respecto al segundo sustrato B, el inhibidor I también actúa como un inhibidor competitivo, ya que afecta únicamente a la pendiente. El valor de K_i para la Glk de *S. peuceetius* var *caesius* es de 4.0 ± 0.5 mM.

El segundo inhibidor, utilizado en estos estudios fue el $MgADP^-$ (Y), como análogo del segundo sustrato. En presencia de este inhibidor, la ecuación de velocidad es:

$$v = \frac{V_{max}}{1 + K_a K_b / [A][B] + K_b / [B] + Y K_b / [B] K_y} \quad [22]$$

en función del primer sustrato A, cuando la [B] se mantiene constante:

$$v = \frac{V_{max} [A]}{K_a K_b / [B] + A (K_b / [B] + Y K_b / [B] K_y + 1)} \quad [23]$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_a K_b}{[B] V_{max}} \frac{1}{[A]} + \frac{K_b / [B] + [Y] K_b / [B] K_y + 1}{V_{max}} \quad [24]$$

La presencia del inhibidor [Y] sólo afecta a la ordenada de origen, es decir es un inhibidor acompetitivo con respecto al primer sustrato A.

La ecuación [25] en función del B, cuando la [A] se mantiene constante:

$$v = \frac{V_{max} [B]}{K_a K_b [A] + K_b + [Y] K_b / K_y + [B]} \quad [26]$$

La ecuación de doble recíproca:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_a K_b [A] + K_b + [Y] K_b / K_y}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[B]} + \frac{1}{V_{max}} \quad [27]$$

En este caso el inhibidor Y afecta sólo a la pendiente, por lo cual es un inhibidor competitivo con respecto al segundo sustrato. La K_y para la Glk de *S. peuceitius* var. *caesius* es de 2.8 ± 0.2 mM. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos experimentalmente midiendo las velocidades iniciales en presencia de los dos inhibidores (Figura 24, 25)

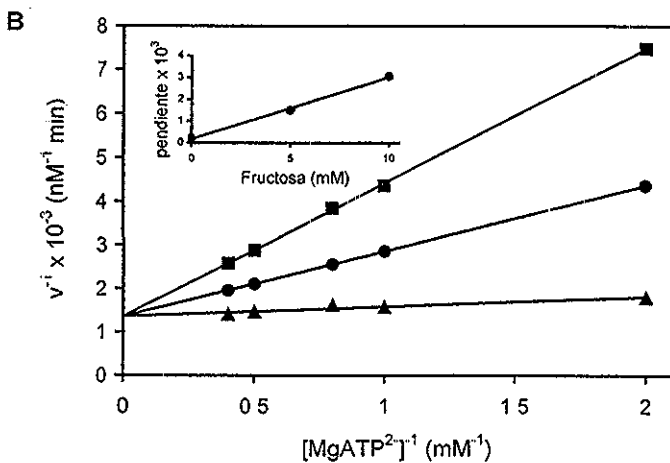
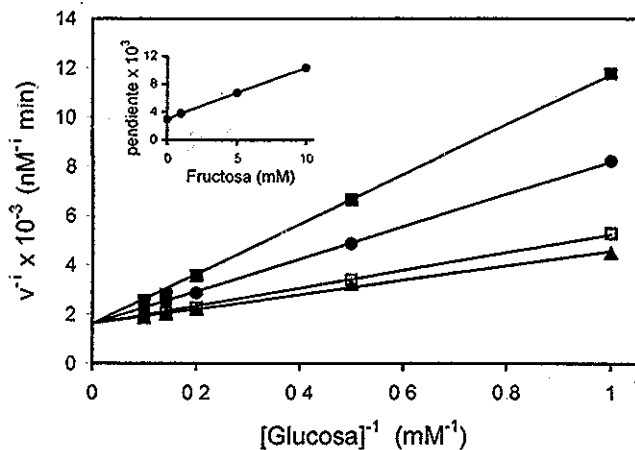


Figura 24 A, Dobles recíprocos de las velocidades iniciales obtenidos variando la concentración de glucosa en la ausencia (\blacktriangle) y presencia de D-fructosa a 1 mM (\square) a 5 mM (\bullet) y a 10 mM (\blacksquare) La concentración de $MgATP^{2-}$ se mantuvo constante a 1 mM. *Inserto*: Pendiente contra la concentración de D-fructosa. **B**, Dobles recíprocos de las velocidades iniciales obtenidos variando la concentración de $MgATP^{2-}$ en la ausencia (\blacktriangle) y presencia de D-fructosa 5 mM (\bullet) y 10 mM (\blacksquare) La concentración de D-glucosa se mantuvo constante a 10 mM. *Inserto*: pendiente contra la concentración de D-fructosa

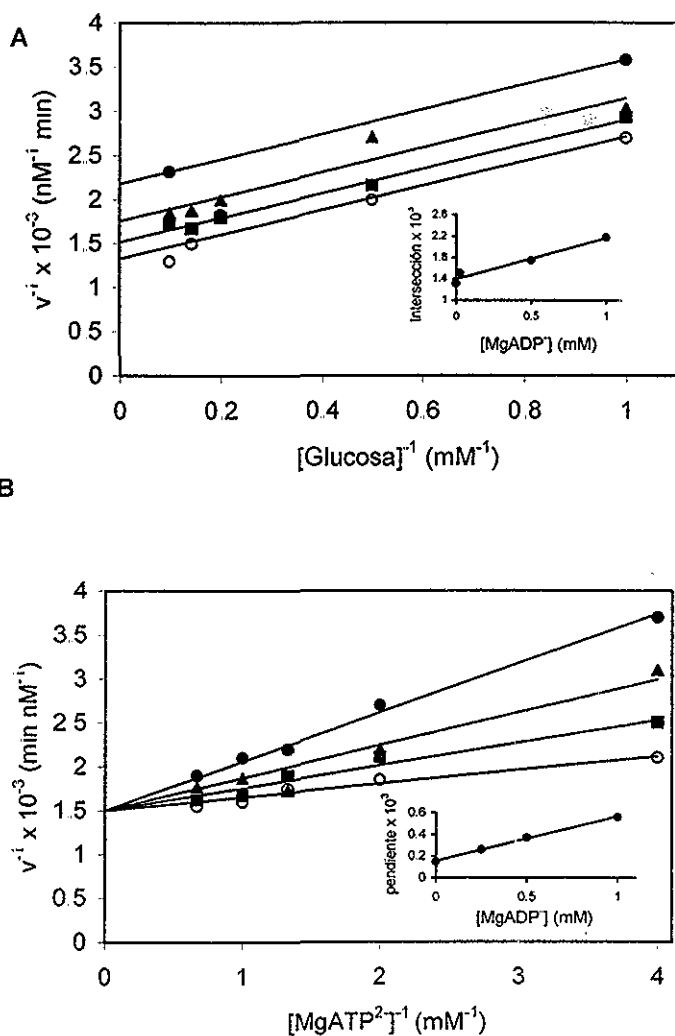


Figura 25 A, Dobles recíprocos de las velocidades iniciales obtenidos variando la concentración de glucosa en la ausencia (o) y presencia de MgADP^+ a 0.25 mM (■), a 0.5 mM (▲) y a 1 mM (●). La concentración de MgATP^{2-} se mantuvo constante a 1 mM *Inserto*: Intersección contra la concentración de MgADP^+ **B**, Dobles recíprocos de las velocidades iniciales obtenidos variando la concentración de MgATP^{2-} en la ausencia (o) y presencia de MgADP^+ a 0.25 mM (■), 0.5 mM (▲) y 1 mM (●) La concentración de D-glucosa se mantuvo constante a 10 mM *Inserto*: Pendiente contra la concentración de MgADP^+

9 DISCUSIÓN

En este trabajo se reportan las características bioquímicas de la glucosa cinasa de dos miembros del género *Streptomyces*, de *S. peucetius* var *caesius* y la de *S. coelicolor*, siendo este trabajo la primera caracterización bioquímica reportada de la Glk de *S. peucetius* var *caesius*.

La enzima de los dos microorganismos está localizada en citosol, indicando que la fosforilación se realiza probablemente en este compartimiento. Nosotros no hemos identificado isoenzimas de la Glk en ninguno de los dos microorganismos, sugiriendo que la misma enzima cataliza la fosforilación de la glucosa, y en el caso de su participación en la RC, en presencia de altas concentraciones de glucosa regula el metabolismo de otras fuentes de carbono de una manera hasta ahora poco entendida.

Para los fines de este estudio, se decidió obtener la Glk de *S. peucetius* var *caesius* y de *S. coelicolor* en forma pura a través un método de purificación rápido, de un solo paso: electroelución de la banda correspondiente a la Glk de un gel preparativo después de la separación de todas las proteínas citosólicas por electroforesis en condiciones no desnaturizantes. La ventaja de este método es su rapidez (más o menos 12 horas) y su relativamente buena recuperación.

La enzima es oligomérica, compuesta de 4 subunidades iguales, de 31 kDa en *S. peucetius* var *caesius* y de 32 kDa en *S. coelicolor* (36 kDa, Mahr *et al* , 2000).

La Glk de los dos microorganismos difiere de otras glucosa cinasas bacterianas reportadas en Swissprot en el peso molecular de la enzima nativa, que es más o menos dos veces más grande, y en el número de las subunidades. La mayoría de

las glucosa cinasas de origen bacteriano están compuestas de dos subunidades o son monoméricas (Swissprot).

La Glk purificada de *S. peuceitius* var. *caesius* se disocia a su forma dimérica después de algunas horas de almacenamiento a 4°C. Sin embargo, la adición de glucosa 100 mM al amortiguador de elución ayuda a mantener su estado tetramérico, lo que fue confirmado determinando la constante de velocidad de decaimiento en la presencia y ausencia de glucosa. La presencia de otros azúcares como fructosa, arabinosa, galactosa y 2-DOG no logró mantener a la enzima en su estado tetramérico.

En el año 1993 Bork *et al.* compararon más de 60 secuencias de genes de diferentes azúcar cinasas. Basándose en estos análisis dividieron a las azúcar cinasas en tres principales familias no homólogas: la familia de hexocinasas, ribocinasas y galactocinasas. Analizando la secuencia de *glkA* de *S. coelicolor*, propusieron que las glucosa cinasas del género *Streptomyces* pertenecen a la familia de las hexocinasas.

Cárdenas (Cárdanes *at al.*, 1998) propone que las hexocinasas de los organismos actuales son derivadas de un gen ancestral cuyo producto es una proteína de más o menos 25 kDa, todavía presente en algunas bacterias. La propuesta inicial fue que la duplicación y/o fusión del gen ancestral dieron origen a las hexocinasas de tamaño 50 kDa, y la siguiente duplicación y fusión resultó en las hexocinasas de 100 kDa. Dos preguntas importantes son si el cambio de del tamaño de la proteína de 50 a 100 kDa debido a las duplicación y/o fusiones corresponde a la adquisición de nuevas funciones y si la disociación del tetrámero a dímero en el caso de Glk de *S. peuceitius* var. *caesius* juega algún papel

importante en el metabolismo de la glucosa o en la RC. Son preguntas que todavía no sabemos a responder. Sin embargo la estabilización del tetrámero por glucosa sugiere que bajo las condiciones de RC la enzima está en esta configuración. Este tipo de asociación dímero-tetrámero en presencia de glucosa no ha sido reportado por ninguna otra gluco- o hexocinasa, no lo hemos observado ni para la Glk de *S. coelicolor*.

Comparando los tiempos de vida media (a 4°C) de las dos enzimas se observó que la Glk de *S. coelicolor* es más estable, lo que se pudiera explicar por la estabilidad de la conformación tetramérica de esta enzima.

El pH óptimo de las dos glucosa cinasas y la temperatura óptima de la Glk de *S. coelicolor*, son semejantes al de otras glucosa cinasas reportadas en Swissprot (pH óptimos 7-9, temperaturas óptimas de las Glk de organismos mesofílicos 20-37°C), sin embargo la temperatura óptima de la Glk de *S. peucetius* var *caesius* está sorprendentemente alta para la Glk de este tipo de bacteria no hipertermofílica de suelo.

La secuencia de los primeros dieciséis aminoácidos de amino terminal y de once aminoácidos de carboxilo terminal demostró diferencias, lo que puede sugerir diferencias en algunas características bioquímicas. Para poder explicar las diferencias encontradas será necesario tener la secuencia completa de la Glk de *S. peucetius* var *caesius*.

La segunda parte de nuestros estudios fue enfocada al comportamiento cinético de las dos enzimas. Uno de los problemas más difíciles en la cinética enzimática es escoger el mecanismo correcto entre la gran variedad de los mecanismos con dos sustratos. La selección se complica por la existencia de varios modelos

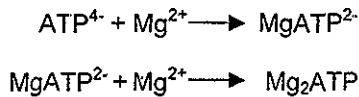
homeomórficos (dos mecanismos de reacción de reacción son homeomórficos si son diferentes pero la ecuación de velocidad es indistinguible) (Ricard *et al.* 1972).

Los resultados sugieren que el mecanismo de reacción de la Glk de los dos microorganismos es BiBi ordenado en el equilibrio rápido, donde glucosa es el primer sustrato que se une a la enzima y después el complejo $MgATP^{2-}$ para formar el complejo ternario EAB (Glk, D-glucosa, $MgATP^{2-}$). Como fue reportado también para la hexocinasa de levadura (Noat *et al.*, 1968), las especies iónicas de Mg^{2+} y ATP^{4-} tienen muy poca afinidad por la enzima o por el complejo enzima-D-glucosa. El ATP existe en una proporción alta y prácticamente constante (más o menos 80%) como $MgATP^{2-}$ en las soluciones donde la concentración total de $MgCl_2$ excede la concentración total de ATP de 1 a 10 veces. En cambio, la proporción de ATP presente como $MgATP^{2-}$ se modifica mucho si la concentración total de $MgCl_2$ y ATP varían en una proporción constante (Stroerer y Cornish-Bowden, 1976). El papel principal de Mg^{2+} es polarizar el enlace fosfato del ATP en el complejo ternario de la glucosa cinasa y así facilitar el transfer del grupo fosforilo. Aparentemente Glk no tiene el sitio activo disponible para el $MgATP^{2-}$, sino que éste se forma después de la formación del complejo enzima-D-glucosa (Noat *et al.*, 1968; Voet y Voet, 1990; Fersht, 1985). Noat *et al.*, en su trabajo de 1968 demostraron que la hexocinasa de levaduras une a la glucosa, pero no al complejo $MgATP^{2-}$ sin presencia de D-glucosa.

El mecanismo cinético fue confirmado utilizando análogos de los dos sustratos, la D-fructosa como análogo de la D-glucosa y $MgADP^-$ como análogo del $MgATP^{2-}$.

Los datos sugieren que la D-fructosa es capaz de interactuar con la enzima libre (la D-fructosa se comportó como inhibidor competitivo de la D-glucosa), pero no pudo inducir los cambios conformacionales de la enzima necesarios para la unión del MgATP^{2-} (la D-fructosa fue también un inhibidor competitivo del MgATP^{2-}). La presencia de estos cambios conformacionales resultaría en la formación del complejo abortivo enzima-D-fructosa- MgATP^{2-} , y en la inhibición no competitiva de la D-fructosa contra el MgATP^{2-} . No conocemos ningún otro mecanismo BiBi, excepto el BiBi ordenado en equilibrio rápido, que produzca estos patrones de velocidades iniciales y de inhibición.

El magnesio en concentraciones más grandes de 10 mM inhibe la actividad de la Glk. Noat sugiere (Noat *et al.*, 1970) que la inhibición por magnesio se puede explicar por la formación de quelatos ternarios del tipo Mg_2ATP , según las reacciones:



Noat (1970) propone que si la enzima no se une a los quelatos ternarios, la inhibición por las especies iónicas de Mg^{2+} se puede explicar simplemente por la disminución de la concentración de MgATP^{2-} . Sin embargo, analizando las concentraciones de Mg_2ATP , MgATP^{2-} y de otras especies iónicas presentes en la mezcla de reactivos a pH 7.5, basándose en los constantes de asociación (Storer y Cornish-Bowden, 1976), la concentración de Mg_2ATP es muy baja (sólo 4.2% de la concentración de MgATP^{2-}). Se cree que es poco probable que tenga un efecto

inhibidor y se sugiere que la glucosa cinasa está inhibida directamente por Mg^{2+} , implicando la presencia de un sitio de unión para Mg^{2+} en la enzima.

10 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

1. La glucosa cinasa de *S. peucetius* var. *caesius* y la de *S. coelicolor* son enzimas citosólicas, compuestas de cuatro subunidades iguales del tamaño 31 y 32 kDa, respectivamente.

2. Sus características bioquímicas determinadas están resumidas en la siguiente tabla:

	Glucosa cinasa	
	<i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i>	<i>S. coelicolor</i>
T óptima (°C)	42	33
E _a (kJ mol ⁻¹)	42.8	30.6
pH óptimo	7.5	7.6
pI	8.4	8.4
V _{max} (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	1086	1667
K _A (mM)	1.6	1.4
K _B (mM)	0.8	0.5
K _I (mM)	4.0	ND
K _Y (mM)	2.8	ND
t _{1/2} (4°C) (h)	8.3	13.61

ND – no determinado

Comparando los resultados de la caracterización bioquímica de las dos enzimas, se puede concluir que las diferencias más significativas que se encontraron entre ellas son:

- en las temperaturas óptimas
- en los valores de E_a
- en los tiempos de vida media (a 4°C)
- en las velocidades máximas.

3 El mecanismo cinético de las dos glucosa cinasas fue BiBi ordenado en equilibrio rápido, donde la D-glucosa se une a la enzima como el primer sustrato

4. Después de algunas horas (2 y más) de almacenamiento a 4°C, la Glk pura de *S. peucetius* var. *caesius* purificada, se encuentra disociada en un 85% a su forma dimérica. La presencia de glucosa 100 mM evita la disociación del tetrámero. La presencia de otros azúcares como fructosa, arabinosa, galactosa y 2-DOG no logra mantener a la enzima en su estado tetramérico. Este comportamiento de dimerización no fue observado con la glucosa cinasa de *S. coelicolor*.

5 La comparación de los primeros dieciséis aminoácidos del extremo N-terminal y once del C-terminal de la Glk de *S. peucetius* var. *caesius* con los de la Glk de *S. coelicolor* mostraron que hay diferencias entre ellas. La Glk de *S. peucetius* var. *caesius* tiene incompleta la secuencia de unión al ATP localizada en la región N-terminal

Queda por comprobar la significancia de estas diferencias, para ello se proponen los siguientes experimentos:

- Clonar y sobreexpresar la glucosa cinasa de *Streptomyces peucetius* var *caesius*, con el fin de analizar la secuencia del gen y establecer las similitudes existentes con otras proteínas o enzimas regulatorias y para obtener la concentración de proteína necesaria para poder continuar su caracterización e incluso para su cristalización.
- Caracterizar el comportamiento de oligomerización de la Glk de *S. peucetius* var. *caesius* en función de temperatura, pH y concentración de sustratos, así como las propiedades cinéticas de la forma dimérica y tetramérica de la enzima para poder establecer si los cambios conformacionales tienen un papel regulatorio.
- Estudiar la capacidad de la glucosa cinasa de interactuar con otras macromoléculas para poder evaluar su posible papel en el mecanismo de represión catabólica en el género *Streptomyces*.

11 Apéndice

Imiskova, I., Langley, E., Arreguin-Espinosa R., Pardo, J. P., Sánchez, S.
(2001) Rapid Purification and Biochemical Characterization of Glucose Kinase
from *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Arch. Biochem Biophys.* : 394, 137-
144



Rapid Purification and Biochemical Characterization of Glucose Kinase from *Streptomyces peucetius* var. *caesius*¹

I. Imriskova, E. Langley, R. Arreguín-Espinosa,* G. Aguilar,† J. P. Pardo,‡ and S. Sánchez²

*Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, *Instituto de Química and †Facultad de Química, Departamento de Alimentos y Biotecnología, and ‡Facultad de Medicina, Departamento de Bioquímica, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., 04510, México*

Received April 12, 2001, and in revised form July 2, 2001; published online September 20, 2001

Glucose kinase catalyzes the ATP-dependent phosphorylation of glucose. *Streptomyces peucetius* var. *caesius* glucose kinase was purified 292-fold to homogeneity. The enzyme has cytosolic localization and is composed of four identical subunits, each of 31 kDa. The purified enzyme easily dissociates into dimers. However, in the presence of 100 mM glucose the enzyme maintains its tetrameric form. Maximum activity was found at 42°C and pH 7.5. Isoelectric focusing of the enzyme showed a pI of 8.4. The N- and C-terminal amino acid sequences were MGLTIGVD and VYFAREDDPIM, respectively. The kinetic mechanism of *S. peucetius* var. *caesius* glucose kinase appears to be a rapid equilibrium ordered type, i.e., ordered addition of substrates to the enzyme, where the first substrate is D-glucose. The K_m values for D-glucose and MgATP²⁺ were 1.6 ± 0.2 and 0.8 ± 0.1 mM, respectively. Mg²⁺ in excess of 10 mM inhibits enzyme activity. © 2001 Academic Press

Key Words: *Streptomyces peucetius* var. *caesius*; glucose kinase; carbon catabolic repression.

Streptomyces peucetius var. *caesius* is the only organism reported to produce doxorubicin (DXR),³ a clinically important chemotherapeutic agent. In spite of its undesirable acute and long-term toxic effects, DXR

remains one of the most widely used antitumoral drugs because of its broad spectrum activity for different kinds of cancer (1). The production of this compound, as well as other secondary metabolites, is negatively affected by high glucose concentrations (2). This phenomenon, known as carbon catabolic repression (CCR), has been extensively studied both in prokaryotes and eukaryotes. Although the physiological consequences of the regulation are the same, the mechanisms responsible for CCR in microorganisms are entirely different and there are likely to be several different systems in any one organism (3). In prokaryotes, the best understood mechanisms controlling CCR are those of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. In *E. coli*, enzyme II^{glc} of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system (PTS) and cAMP appear to play major roles (4, 5). In *B. subtilis* CCR is mediated by an ATP-dependent HPr kinase (6). In the genus *Streptomyces* it is not yet clear how CCR is triggered, but there appear to be significant differences compared to the processes mentioned above. In *Streptomyces coelicolor*, the genetically most studied streptomycete, glucose kinase (GlcK) has been shown to play a central role in the phenomenon (7). Mutants of this bacteria obtained for their ability to grow on the non-utilizable glucose analogue, 2-deoxyglucose (2-dog), appear to be generally deficient in glucose kinase activity and defective in glucose repression (8). Introduction of a DNA fragment containing the glucose kinase gene (*glkA*), restored both enzyme activity and glucose repression (3, 9, 10). Similar results were obtained with 2-dog resistant mutants of *Streptomyces peucetius* var. *caesius* isolated in our laboratory (2, 11). The insensitivity of these mutants to CCR was correlated with almost total loss of glucose kinase activity. These results strongly suggest an important role for glucose kinase in this regulatory mechanism in the genus *Streptomyces*. In spite of the

¹ This work was supported, in part, by Grant IN 201697 and IN 208000 from DGAPA UNAM, México; PAEP 202320 and 103328 from DGEP UNAM, México; and 33830-B from CONACyT, México. I. Imriskova was granted a scholarship by the Dirección General de Posgrado of the Universidad Nacional Autónoma de México.

² To whom correspondence and reprint requests should be addressed. Fax: 52-6-6223855. E-mail: sersan@servidor.unam.mx.

³ Abbreviations used: CCR, carbon catabolic repression; DXR, doxorubicin; MTT, methyl thiazoyl tetrazolium; PTH, phenylthiohydantoin.

important role that this enzyme seems to play in CCR in *Streptomyces*, to date no purification or biochemical characterization of a glucose kinase from any member of this genus has been reported. The present study is the first thorough characterization of a streptomycete glucose kinase: the glucose kinase of *S. peucetius* var. *caesius*

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials. ATP (disodium salt), ADP (sodium salt), methyl thiazolyl tetrazolium (MTT), D-glucose and D-fructose were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Glucose-6-phosphate dehydrogenase (D-glucose-6-phosphate: NADP oxidoreductase, EC 1.1.1.49; yeast) and NADP (disodium salt) were obtained from Boehringer GmbH (Mannheim, Germany). Phenazine methosulfate (PMS) was from Aldrich Chemical Company, Inc. (Milwaukee, WI). Glucose determination kit was from Erlic Mexicana S.A. de C.V. (Mexico). The materials for polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and SDS-PAGE were from Bio-Rad (Venendaal, The Netherlands). All other chemicals were of analytical purity.

Bacterial strain and cultivation. *S. peucetius* var. *caesius* NRRL B-5337 was kindly provided by the Agriculture Research Service culture collection U.S. Department of Agriculture (Peoria, IL). Spores from this microorganism were obtained as previously reported (2). The organism was maintained by serial transfer and stored at 4°C on yeast malt agar (YMA) (0.4% yeast extract, 1.0% malt extract, 0.4% glucose, and 1.6% agar) plates. The cultures were transferred every 8 weeks.

For glucose kinase activity, 25 ml of a seed culture (2) were used to inoculate a 2.8-liter Fernbach flask with 10 glass beads (diameter 5.0 mm), containing 500 ml of liquid YM (0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 1.8% glucose) and cultured at 29°C on a rotary shaker at 180 rpm (amplitude ca 2 cm) for 48 h. The culture was vacuum filtered through a No. 40 Whatman Filter Paper (50 ml of culture/filter), washed with 0.85% NaCl, and dehydrated with 50 ml of acetone. The dehydrated cells (acetone powders) were stored at -20°C until use. Remaining glucose and pH of the culture medium during growth were determined as described by Escalante *et al.* (11)

Preparation of cell-free extracts. Cell free extracts were prepared aseptically at 4°C from acetone powders. The dehydrated cells (1.0 g) were broken with dry ice and rehydrated in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2). Cell debris was removed by centrifugation at 245,000g for 1 h in a Beckman L8-55M ultracentrifuge, using the SW 50.1 rotor. The supernatant was concentrated in ultrafiltration membrane cones (25,000 Da cut off, Amicon, MA), by centrifugation for 30 min at 1100g in a Beckman J2-MC centrifuge, using the JA-20 rotor. The cell free extracts containing 10–20 mg protein ml⁻¹ were stored at -20°C until use. Protein was determined as described by Lowry (12), using bovine serum albumin as standard

Determination of enzyme activity. The activity of glucose kinase, extracted from 48 h fermentation cultures, was measured spectrophotometrically by monitoring the reduction of NADP ($\epsilon_{290} = 6.22 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) in a glucose-6-phosphate dehydrogenase coupled reaction (2). The assay mixture contained 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM D-glucose, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM NADP, 1 mM ATP, and 0.7 U ml⁻¹ yeast glucose-6-phosphate dehydrogenase. Units of enzyme activity were expressed as nmol of NADP reduced min⁻¹ mg cell protein⁻¹ at 25°C

Purification of glucose kinase. All purification steps were performed without protection against oxygen at 4°C. A 1 ml sample from the concentrated cell free extract was loaded onto a 6% preparative acrylamide gel and protein electrophoresis was performed according to the manufacturer's instructions. To avoid inactivation of the enzyme by TEMED or ammonium persulfate the gel was electropho-

resed for 1 h before the sample was loaded. Glucose kinase was localized in the gels using the enzyme-linked staining system based on the formation of formazan by reduction of MTT (3, 13). The gel was rinsed in 50 mM Tris-HCl pH 7.2 prior to staining to avoid inhibition of the staining mixture by the alkaline running buffer. The staining mixture was applied to the gel as an agarose overlay containing 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM glucose, 5 mM NADP, 1 mM ATP, 0.17 mg ml⁻¹ MTT, 0.03 mg ml⁻¹ phenosine methosulfate, and 0.5 U ml⁻¹ yeast glucose-6-phosphate dehydrogenase. The band was visible after incubation for approximately 5 min at 29°C in the dark. The band corresponding to glucose kinase was cut out and eluted from the gel in Tris-HCl buffer (50 mM, pH 7.2) with glycerol (10%) and glucose (100 mM). Enzyme purity was checked by native and denaturing PAGE. For determination of the subunit composition by SDS-PAGE, protein samples were diluted in sample buffer, containing 2% SDS and 5% 2-mercaptoethanol and heated at 93°C for 5 min. The protein bands were visualized using Coomassie brilliant blue R-250 stain or by silver staining as described elsewhere (14).

Molecular mass determination. The molecular mass of the native enzyme was estimated by native PAGE and gel filtration. The native PAGE was performed using various acrylamide concentrations (6.0, 7.5, and 10.0%), as described by Hedrick and Smith (15), using as molecular mass standards: lactalbumin (14.2 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), chicken egg albumin (45 kDa), bovine serum albumin monomer and dimer (66 and 132 kDa), and urease hexamer (545 kDa) (Sigma, Chemical Co). Gel filtration was performed on a Sephadex G150 column, using the following molecular mass standards: carbonic anhydrase (29 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), yeast alcohol dehydrogenase (150 kDa) and sweet potato α -amylase (200 kDa) (Sigma Chemical Co.). The exact molecular mass was determined by mass spectrometry. Nano-electrospray mass was acquired on a Esquire ion trap mass spectrometer (Bruker-Flanzen Analytical GmbH) as described by Jensen *et al.* (16). Molecular weight information was analyzed using MASSMAP software.

N- and C-terminal amino acid sequence analysis. The N-terminal sequence analysis of the purified glucose kinase was performed in an Applied Biosystem 476A Sequencer (Automated Edman Protein Degradation), following the manufacturer's instructions. An unmodified α -amino group at the N terminal end of the molecule was obtained after modification of the protein with phenylisothiocyanate and the derivatized terminal amino acid was removed by acid cleavage as its phenylthiohydantoin (PTH) derivative. Identification of the PTH-amino acids was carried out according to Hoving (17). Characterization of the C-terminal sequence was performed as described by Sechi and Chait (18)

pH optimum and pH effect on stability. The optimal pH was determined at 25°C in 100 mM Tris/maleate buffer over a pH range of 5.5–9.0 and in 100 mM Tris-HCl buffer over a pH range of 7–8. Care was taken that the auxiliary enzyme (glucose-6-phosphate dehydrogenase) was not limiting at the various pH values. The effect of pH on enzyme stability was studied at two different temperatures: 4 and -20°C, incubating the enzyme in Tris/maleate buffer over the pH range 6–9 for 5 days (at 4°C) and 1 month (at -20°C). The activity of the enzyme was determined at pH 7.5

Isoelectric point determination. Analytical isoelectric focusing of the purified enzyme was performed with the Pharmacia Phast System using a Phast Gel IIF 3-9. Protein bands were visualized using Coomassie brilliant blue R-250

Temperature effect and thermostability. The effect of temperature on the activity was determined by measuring the enzyme activity at different temperatures varying from 25 to 50°C. Thermostability was determined by incubating crude and purified glucose kinase in 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2) at -20, 4, and 25°C. To determine the decay rate constant the purified enzyme was incubated at 37°C during 1 h in the presence and absence of 100 mM glucose measuring enzyme activity every 15 min

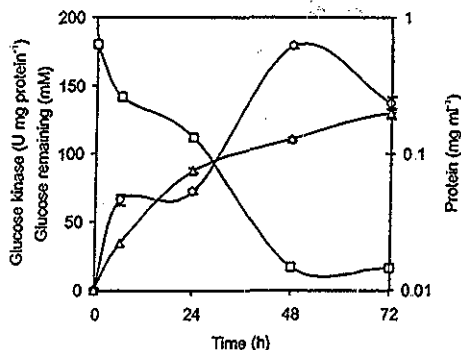


FIG. 1. Time course of *Streptomyces peucetius* var. *caesius* glucose kinase activity (○), glucose remaining (□), and protein concentration (△) in liquid YM medium with 100 mM glucose. Fermentation was performed at 29°C and 180 rpm in 2.8-liter Fernbach flask containing 500 ml of culture medium and 10 glass beads (diameter 5 mm).

Kinetic studies. Rates of NADP reduction were followed at 340 nm at 25 ± 2°C in a Spectronic 21D spectrophotometer. Kinetic studies for glucose kinase were carried out in reaction mixture (1 ml) containing purified Gik (1.0 ± 0.2 μg), 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM NADP, 1–10 mM D-glucose, 0.25–2 mM ATP, and 0.7 U yeast glucose-6-phosphate dehydrogenase. The effect of Mg²⁺ was studied by varying Mg²⁺ concentrations from 0 to 25 mM. D-Fructose and MgADP⁺ were used as substrate analogues in the inhibition studies. To determine V_{max} and K_m for each substrate, the data were fit to the Michaelis-Menten equation by a nonlinear regression program.

RESULTS

Glucose kinase activity, glucose consumption, and pH values during the growth of *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. To determine the duration of fermentation associated with the maximum glucose kinase activity, we monitored its activity at different times of fermentation. As can be seen in Fig. 1, the maximum activity was found at 48 h of incubation, corresponding to exponential growth phase. After this time, when almost all of the glucose in the culture medium was consumed, there was a decrease in enzyme activity. pH monitoring during fermentation showed no significant changes (not shown).

Localization of glucose kinase in *Streptomyces peucetius* var. *caesius* cells. After fractionation of the broken cell suspension, most of the activity (96%) was recovered in the supernatant, indicating that the enzyme is located in the cytoplasm. We used activity staining to analyze the protein extract and detected a single glucose kinase band, suggesting the presence of a single isoform of the protein in this bacteria (Fig. 2A)

Purification of glucose kinase. The enzyme was purified about 292-fold by direct electroelution of the band corresponding to glucose kinase from a 6% preparative native polyacrylamide gel (Table I). Enzyme purity was checked by SDS-PAGE (Fig. 3). 70.6% of the total enzyme was present in the monomeric form and the rest as a dimer.

Physical properties. The molecular mass of the native enzyme, as estimated by gel filtration on a Sephadex G150 column and native PAGE at various acrylamide concentrations, was 135 ± 5 kDa and 132 ± 13 kDa, respectively. SDS-PAGE of the 292-fold purified protein gave a single band of 31.0 ± 1.5 kDa. The exact molecular mass of the subunit as determined by mass spectrometry was 30961.4 ± 1.5 Da. Apparently, the native enzyme is integrated by four identical subunits. After a few hours at 4°C the homotetrameric native enzyme dissociates into two dimers (Fig. 2B, lane 2). Analyzing the bands corresponding to the tetramer and dimer by Camag TLC Scanner II, we observed that 85% of glucose kinase was present as a dimer and the rest in a tetrameric form. No monomer was detected. However, when 100 mM glucose was added to the elution buffer, dissociation of the tetramer was prevented (Fig. 2B, lane 3), suggesting that the presence of the substrate stabilized the tetrameric integrity.

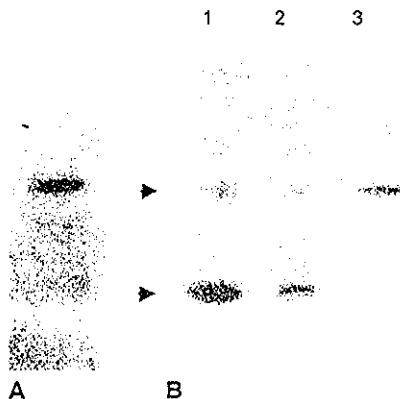


FIG. 2. (A) Glucose kinase activity gel of cell-free extracts of *S. peucetius* var. *caesius*, 80 μg of protein loaded. (B) Native polyacrylamide gel electrophoresis of glucose kinase from *S. peucetius* var. *caesius*. Lane 1 shows protein standards: bovine serum albumin monomer and dimer, with molecular masses of 66 and 132 kDa, respectively. Lanes 2 and 3 contain 3 μg of the 292-fold purified glucose kinase in sample buffer without and with 100 mM D-glucose, respectively. Proteins were stained with Coomassie brilliant blue R-250.

TABLE I
Purification of the ATP-Dependent Glucose Kinase from *S. peuceitius* var *caesius*

Purification step	Total activity (units)	Protein (mg)	Specific activity (units mg ⁻¹)	Purification factor (-fold)	Recovery (%)
Cell-free extract	4219.3	22.9000	184.2	1	100.0
Gel electrophoresis	478.8	0.0089	53797.7	292	11.3

Note. Specific activities were determined at 25°C.

Determination of pH optimum, pI, and pH effect on stability. Glucose kinase exhibited maximal activity at pH 7.5. No activity was found at pH values below 3.0. Isoelectric focusing of the enzyme gave a pI of 8.4. Studying the effect of pH on enzyme stability we observed no loss of activity after 5 days of incubation at 4°C, pH 7.2. After 1 month of incubation at -20°C, in buffers with different pH values (6.5-8.5), the total activity remained constant, and the enzyme retained its tetrameric structure.

Thermostability and temperature optimum. The thermostability of crude and purified enzyme was determined at -20, 4, and 25°C. At -20°C the enzyme was very stable: crude enzyme was stable up to 2 years, purified at least 2 months. Thawing and freezing the sample decreased enzyme activity by about 20%. At 4°C the crude enzyme did not lose any activity after 2

weeks of incubation, while the purified enzyme was stable for 1 day. After 150 min of incubation at 25°C the crude and purified enzyme lost 40 and 100% of the activity, respectively. The stability of the enzyme at 4 and 25°C was markedly improved by addition of 100 mM glucose to the elution buffer. The decay rate constant, obtained incubating the enzyme at 37°C in the presence and absence of 100 mM glucose were $(5.1 \pm 0.5) \times 10^{-6}$ and $(3.3 \pm 0.3) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, respectively.

The temperature dependence of glucose kinase activity is shown in Fig. 4. The maximum activity was found at 42°C. The activation energy as determined from the Arrhenius plot (Fig. 4, insert) was $42.8 \pm 4.5 \text{ kJ/mol}$.

N- and C-terminal amino acid sequence analysis. The following N-terminal amino acid sequence was determined (first eight residues): NH₂, MGLTIGVD. This sequence did not show similarity with any other hexokinase sequence in the SWISSPROT data base, except that of the glucose kinase of *S. coelicolor*. The C-terminal amino acid residues were determined to be VYFAREPDPIM, COOH. This sequence differs in three amino acids (VYF) from the predicted sequence of *S. coelicolor*.

Kinetic studies. As mentioned above, glucose kinase exhibited maximal activity at 42°C and pH 7.5. Similar to other kinases, the enzyme required divalent cations for activity. The rate data for glucose kinase were obtained using a concentration of 5 mM Mg²⁺ in excess over the ATP concentration. Storer and Cornish-Bowden (19) showed that under these conditions, ATP is in the form of MgATP²⁻ throughout the ATP concentration range used in this work. The constant Mg²⁺ concentration in the kinetic studies ensured the formation of MgATP²⁻ and simplified treatment of the kinetic data. However, Mg²⁺ concentrations in excess of 10 mM inhibit glucose kinase activity (not shown). No activity was found in the absence of divalent cations. Initial velocity experiments (Figs. 5A and 5B) and inhibition studies (see below) show that the enzyme follows a rapid equilibrium ordered mechanism in which the enzyme first binds D-glucose and then the MgATP²⁻ complex. Scheme 1:

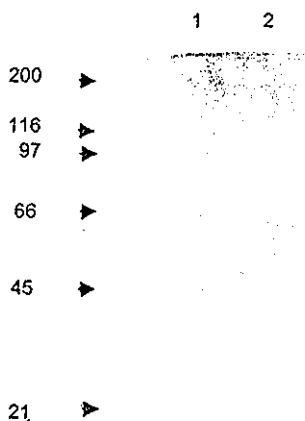


FIG. 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of glucose kinase from *S. peuceitius* var *caesius* stained with Coomassie brilliant blue R-250. Lane 1 contains protein standards with the molecular masses indicated. Lane 2 contains 0.75 µg of the 292-fold purified protein.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

75-0

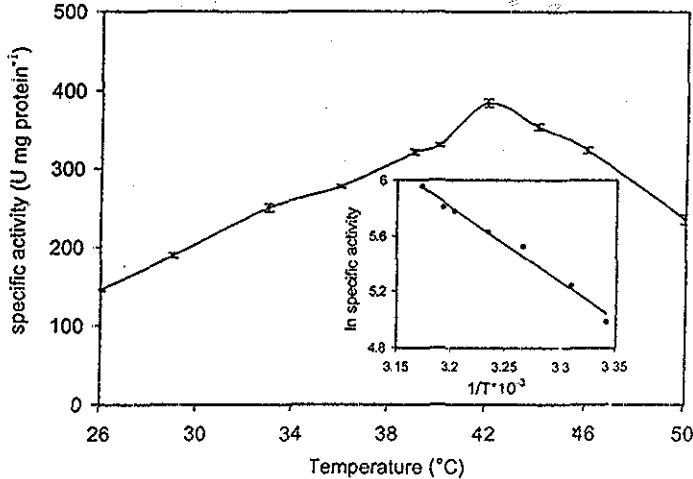
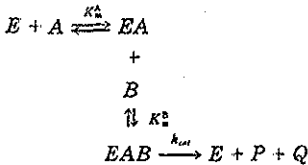


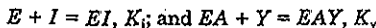
FIG. 4. Temperature dependence of glucose kinase activity. Activity was determined at different temperatures (from 25 to 50°C) following the reduction of NADP as described under Experimental Procedures. Inset: Arrhenius plot of the data from 26 to 42°C



The rate expression for this mechanism, assuming all steps equilibrate rapidly relative to the interconversion of the ternary complexes, is shown in Eq. [1]:

$$v = \frac{V_{max}AB}{K_m^B(K_m^A + A) + AB} \quad [1]$$

where v , V_{max} , A , B , K_m^A , K_m^B represent initial velocity, maximal velocity, substrate A (D-glucose), substrate B (MgATP²⁺), Michaelis constants for A and B , respectively. The values of V_{max} , K_m^A , and K_m^B , obtained by nonlinear regression analysis using Eq. [1], were $1086.7 \pm 114.3 \text{ U min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, $1.6 \pm 0.2 \text{ mM}$, and $0.8 \pm 0.1 \text{ mM}$, respectively. This mechanism was confirmed by using the inhibitors D-fructose (as a D-glucose analogue), and ADP (as an ATP analogue). If the kinetic mechanism is ordered Bi Bi, the following interactions might be expected in the presence of D-fructose (I) and ADP (Y):



Equations [2] and [3] describe the expected rate equations:

$$v = \frac{V_{max}}{1 + K_m^B/B + K_m^A K_m^B/AB(1 + I/K_i)} \quad [2]$$

$$v = \frac{V_{max}}{1 + K_m^A K_m^B/AB + K_m^B/B + YK_m^B/BK_y} \quad [3]$$

The results showed that D-fructose acts as competitive inhibitor with respect to both D-glucose and MgATP²⁺ (Figs 6A and 6B), with a K_i of $4.0 \pm 0.5 \text{ mM}$. MgADP⁻ was an uncompetitive inhibitor of D-glucose and competitive inhibitor of MgATP²⁺, displaying a K_y of $2.8 \pm 0.2 \text{ mM}$ (Figs. 7A and 7B)

DISCUSSION

This paper describes the first thorough characterization of the enzymatic properties of glucose kinase from *S. peucetius* var. *caesius*, an enzyme which seems to play an important role in the phenomenon of carbon catabolic repression in this bacteria. In 1993, Bork *et al* (20) compared more than 60 sequences of sugar kinases with 20 different sugar-binding activities. From these studies three major nonhomologous families were distinguished: the hexokinase, ribokinase, and galactokinase families. Based on DNA sequence analysis of the *S. coelicolor* glucose kinase gene (3), it

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

75-E

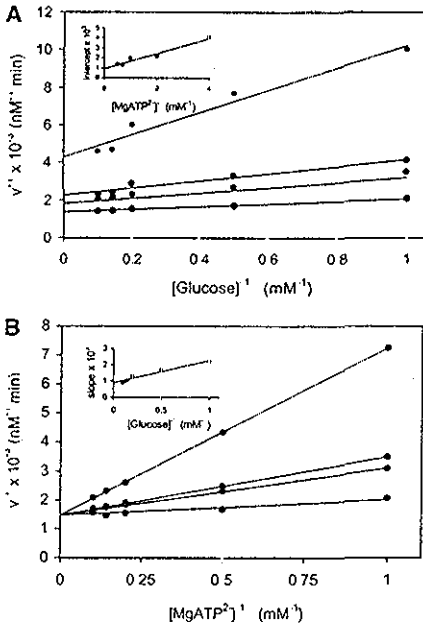


FIG. 5. Double reciprocal plots of the initial velocity of the reaction catalyzed by *S. peucetius* var. *caesius* glucose kinase. (A) At varying concentrations of glucose, and 0.25, 0.5, 1, and 1.5 mM MgATP²⁻. Inset: Y-intercept versus the reciprocal of the concentration of MgATP²⁻. (B) At varying concentrations of MgATP²⁻ and 1, 2, 5, and 10 mM glucose. Inset: slope versus the reciprocal of the concentration of glucose. A 5 mM concentration of Mg²⁺ was used in excess over the concentration of ATP

was shown that glucose kinases from this genus belong to the hexokinase family

This enzyme catalyzes the first step in glucose metabolism, glucose phosphorylation by ATP, a reaction occurring in both prokaryotic and eukaryotic cells. Only a few species, mostly bacteria and unicellular eukaryotic organisms, are known to contain a true glucose kinase (ATP: D-glucose 6-phosphotransferase, EC 2.7.1.2), i.e., an enzyme specific for glucose (20). The *S. peucetius* var. *caesius* glucose kinase is highly specific for glucose and only weakly active with galactose and arabinose (results not shown).

Further characterization of glucose kinase showed cytoplasmic localization, indicating that glucose phosphorylation takes place in this compartment. Our results show that *S. peucetius* var. *caesius* glucose kinase is induced by glucose. However, it is not induced by other carbon sources such as galactose, arabinose, pyruvate, and glutamate (manuscript in preparation)

For the purpose of the present study we decided on a rapid 1-step purification procedure: electroelution of the glucose kinase band from preparative native PAGE, having the advantage of rapid purification (critical in maintaining enzyme activity) with relatively good recovery.

The molecular mass of the native enzyme, 124 kDa, is comparable to the molecular mass of 110 ± 20 kDa estimated for glucose kinase from *S. coelicolor* (3). The enzyme is an oligomer consisting of four identical subunits, each 31 kDa. The *S. peucetius* var. *caesius* glucose kinase differs from most bacterial kinases by its native molecular mass, which is about twice the size of other known kinases (about 50 kDa) and by the number of subunits. The great majority of the reported bacterial glucose kinases are either composed of two subunits or are monomeric (SWISSPROT). The purified enzyme, after few hours at 4°C dissociates into its dimers. However, addition of 100 mM glucose helps

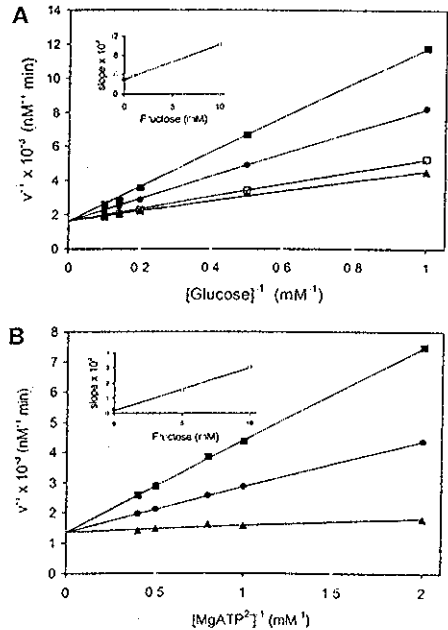


FIG. 6. (A) Double reciprocal plot of the initial velocity at varying concentrations of glucose, in the absence (▲) and presence of 1 mM (□), 5 mM (●), and 10 mM (■) D-fructose. MgATP²⁻ concentration was held constant at 1 mM. Inset: slope versus the concentration of fructose. (B) Double reciprocal plot of the initial velocity at varying concentrations of MgATP²⁻ in the absence (▲) and presence of 5 mM (●) and 10 mM (■) D-fructose. Glucose concentration was held constant at 10 mM. Inset: slope versus the concentration of fructose

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

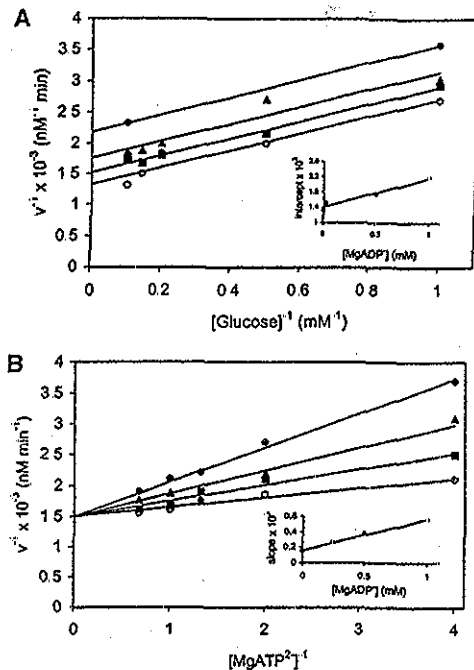


FIG. 7. (A) Double reciprocal of the initial velocity at varying concentrations of glucose in the absence (O) and presence of 0.25 mM (■), 0.5 mM (▲), and 1.0 mM (●) $MgADP^{2-}$. The $MgATP^{2-}$ concentration was held constant at 1 mM. Inset: Y-intercept versus the concentration of $MgADP^{2-}$. (B) Double reciprocal of the initial velocity at varying concentrations of $MgATP^{2-}$ in the absence (O) and presence of 0.25 mM (■), 0.5 mM (▲), and 1 mM (●) $MgADP^{2-}$. Glucose concentration was held constant at 10 mM. Inset: slope versus the concentration of $MgADP^{2-}$.

maintain its tetrameric integrity, which was quantitatively confirmed by determining of the decay rate constant in the presence and absence of glucose.

Cárdenas *et al.* (21) proposed that hexokinases of present-day organisms are derived from an ancestral gene specifying a protein of about 25 kDa, that is still present in some bacteria. The initial proposal was that the ancestral gene was duplicated and fused to encode a new hexokinase of about 50 kDa. A further duplication and fusion produced a gene for a protein of about 100 kDa. The possibility of gene duplication and fusion raises the question of whether the change from 50 to 100 kDa corresponded to the acquisition of a new function. Does the dissociation of the tetramer to the dimer, in the case of *S. peucetius* var. *caesius* glucose kinase, play any role in glucose metabolism or CCR? This question is still waiting to be answered. However, increased tetramer stability at elevated glucose concen-

trations suggests that this form will remain active during CCR. This type of dimer-tetramer association in the presence of glucose has not been reported for any other gluco- or hexokinase.

We did not identify any glucose kinase isoenzymes, suggesting that the same enzyme catalyzes the phosphorylation of glucose and, in case of its participation in CCR under conditions of excess glucose, may be involved in regulation of expression of many proteins involved in the production of different primary and secondary metabolites, in a manner not yet understood.

The pH optimum of the glucose kinase is in the common range (7–9) for other glucose kinases (SWISSPROT). However, the optimum temperature was surprisingly high for an enzyme from soil bacteria, since the optimum temperatures for nonhyperthermophilic organism glucose kinases are in the range of 20–37°C (SWISSPROT).

Comparison of the N-terminal amino acid sequence with the amino acid sequences of other members of the hexokinase family, showed 100% homology with *S. coelicolor* glucose kinase, but very little similarity to the other enzymes. In contrast, 3 of 11 C-terminal amino acids (VYF) are different from those of *S. coelicolor*, suggesting differences in biochemical characteristics of the two enzymes.

The second part of our study was focused on the kinetic behavior of this enzyme. One of the most puzzling problems of enzyme kinetics is choosing the mechanism from among a variety of bi-substrate enzyme types. This choice is complicated because of the occurrence of a large number of homeomorphic two-substrate models (two reaction mechanisms are said to be homeomorphic when they are different and still give rise to an indistinguishable rate equation) (22).

Our results (see below) suggest that the ATP-dependent glucose kinase of *S. peucetius* var. *caesius* follows a rapid equilibrium ordered Bi Bi sequential mechanism, where the enzyme first binds glucose and then the $MgATP^{2-}$ complex, to form a ternary EAB complex (enzyme D-glucose- $MgATP^{2-}$). As was also reported for yeast hexokinase (23), the ionic species Mg^{2+} and ATP^{4-} have a negligible affinity for the enzyme or the enzyme-glucose complex. ATP exists in a high and nearly constant proportion (about 80%) as $MgATP^{2-}$ in solutions in which total $MgCl_2$ concentration exceeds the total ATP concentration by 1–10 mM. In contrast, the proportion of ATP present as $MgATP^{2-}$ varies greatly if the total $MgCl_2$ and total ATP concentrations are varied in constant proportion (19). The major function of Mg^{2+} is to polarize the phosphoryl bond of ATP in the ternary complex of glucose kinase to facilitate phosphoryl transfer. Apparently, glucose kinase does not have an available $MgATP^{2-}$ binding site; this is formed only after formation of the enzyme-glucose complex (24–26). Similarly, Noat *et al.* (24) have shown

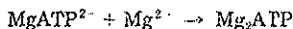
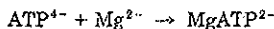
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

75-G

that yeast hexokinase binds glucose, but is practically unable to form a complex with the nucleotide in the absence of hexose.

In addition, the kinetic mechanism was confirmed by using the substrate analogues D-fructose and MgADP⁻. Our results suggest that D-fructose is able to interact with the free enzyme (D-fructose was a competitive inhibitor of D-glucose), but cannot induce the conformational change that leads to the formation of the ATP binding site on the enzyme (D-fructose was also a competitive inhibitor of MgATP²⁻). It is worth mentioning that the presence of this conformational change would result in the formation of an abortive complex enzyme-D-fructose-MgATP²⁻ and a non competitive inhibition of D-fructose against MgATP²⁻. We do not know of another bi substrate mechanism, in addition to the rapid equilibrium ordered mechanism, producing these initial velocity and product inhibition patterns. Three other mechanisms: (a) rapid equilibrium random mechanism, (b) steady-state random mechanism, and (c) the steady-state ordered mechanism would give a family of straight lines intersecting on the left side of the Y-axis and the product inhibition patterns would be different. Thus, we believe that the initial velocity as well as the product inhibition patterns obtained in this work are diagnostic of the rapid equilibrium ordered mechanism.

Magnesium in excess of 10 mM inhibits enzyme activity (not shown). Noat *et al.* (24) suggest that this might be due to formation of ternary chelates of the Mg₂ATP type, according to the reactions:



In addition, it was proposed that if the enzyme does not bind the ternary chelates, the inhibition due to the ionic species Mg²⁺ could be explained simply by a decrease in concentration of the MgATP²⁻ complex (24). However, analyzing the concentrations of Mg₂ATP, MgATP²⁻, and other ionic species in the reaction mixture at pH 7.5 (based on the association constants reported in reference 19), Mg₂ATP concentration is very low (only 4.2% of MgATP²⁻ concentration), and we believe that it is unlikely to have an inhibitory effect on glucose kinase activity. We suggest that glucose kinase is inhibited directly by the Mg²⁺ species, implying the presence of a binding site for Mg²⁺ on the enzyme.

Results of this study will be used for the future evaluation of glucose kinase participation in CCR in this industrially important bacteria and consequently in the genus *Streptomyces*. It will be important to complement these data with the cloning and sequencing of the glucose kinase gene and to elucidate the role of this enzyme in the mechanism of CCR.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Laura Escalante, Beatriz Ruiz, and Blanca Trejo-Aguilar for technical support of this work and to Itzel Ramos for helpful discussions. We thank Marco A. Ortiz for strain preservation studies.

REFERENCES

- Hutchinson, C. R., and Colombo, A. L. (1999) *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23, 647-652.
- Segura, D., Gonzalez, R., Rodriguez, R., Sandoval, I., Escalante, L., and Sanchez, S. (1996) *Asia Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 4, 30-36.
- Angell, S., Schwartz, E., and Bibb, J. M. (1992) *Mol. Microbiol.* 6, 2833-2844.
- Postma, P. W., Lengeler, J. W., and Jacobson, G. R. (1993) *Microbiol. Rev.* 57, 543-594.
- Saier, M. H., Jr., Chauvaux, S., Deutscher, J., Reizer, J., and Ye, J.-J. (1995) *Trends Biochem. Sci.* 20, 267-271.
- Reizer, J., Saier, M. H., Jr., Deutscher, J., Grenier, F., Thompson, J., and Hengstenberg, W. (1988) *Crit. Rev. Microbiol.* 15, 297-338.
- Kwakman, J. H., and Postma, P. W. (1994) *J. Bacteriol.* 176, 2694-2698.
- Hodgson, D. A. (1982) *J. Gen. Microbiol.* 128, 2417-2430.
- Seno, E. P., and Chater, K. F. (1983) *J. Gen. Microbiol.* 129, 1403-1413.
- Angell, S., Lewis, C. G., Buttner, M. J., and Bibb, M. J. (1994) *Mol. Gen. Genet.* 244, 135-143.
- Escalante, L., Ramos, I., Imriskova, I., Langley, E., and Sanchez, S. (1999) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, 572-578.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chemistry* 193, 265-275.
- Harris, H., and Hopkinson, D. A. (1976) *Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics*, American Elsevier, New York.
- Rosenberg, I. M. (1996) *Protein Analysis and Purification: Benchtop Techniques* Birkhäuser, Boston.
- Hedrick, J. L., and Smith, A. J. (1968) *Arch. Biochem. Biophys.* 126, 155-164.
- Jensen, O. N., Jarsen, M. R., and Roepstorff, P. (1993) *Proteins* 2, 74-89.
- Hoving, S., Munchbach, M., Schmid, H., Signor, I., Lehmann, A., Staudenmann, W., and Quadroni, M. J. (2000) *Anal. Chem.* 5, 1006-1014.
- Sechi, S., and Chait, B. T. (2000) *Anal. Chem.* 72, 3374-3378.
- Storer, A. C., and Cornish-Bowden, A. (1976) *Biochem. J.* 159, 1-5.
- Bork, P., Sander, C., and Valencia, A. (1993) *Protein Sci.* 2, 31-40.
- Cárdenas, M. L., Cornish-Bowden, A., and Ureta, T. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* 1401, 242-264.
- Ricard, J., Noat, G., Borel, M., and Got, C. (1972) *Eur. J. Biochem.* 31, 14-24.
- Noat, G., Ricard, J., Borel, M., and Got, C. (1968) *Eur. J. Biochem.* 5, 55-70.
- Noat, G., Ricard, J., Borel, M., and Got, C. (1970) *Eur. J. Biochem.* 13, 347-363.
- Voet, D., and Voet, J. G. (1990) *in Biochemistry* p. 346, Wiley.
- Fersht, A. (1985) *in Enzyme Structure and Mechanism* 2nd ed., p. 115, Freeman.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

75-H

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): likely regulatory role for glucose kinase. *Mol. Gen. Genet* **244**, 135-143
- Arcamone, F., Cassinelli, G., Fantini, G., Grein, A., Orezzi, P.O., C. and Spall, C.** (1969) Adriamicin, 14 -Hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol. Bioeng.* **11**, 1101-1110
- Bork, P., Sander, C., and Valencia, A.** (1993) Convergent evolution of similar enzymatic function on different protein folds: The hexokinase, ribokinase, and galactokinase families of sugar kinases. *Protein Sci.* **2**, 31-40
- Butler M. J., Deurcher, J., Postma, P. W., Wilson, T. J., Galinier, A., and Bibb, M. J.** (1999) Analysis of a *ptsH* homologue from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *FEMS Microbiol Lett* **177**, 279-288
- Cárdenas, M. L., Cornish-Bowden, A., and Ureta, T.** (1998) Evolution and regulatory role of the hexokinases. *Biochim. Biophys. Acta* **1401**, 242-264
- Demain, A. L.** (1999) Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 455-463
- 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
- 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.* **52**, 572-578
- Fersht, A.** (1985) Enzyme Structure and Mechanism, 2nd Ed, p. 115, W.H. Freeman and Company, USA
- Flores, M. E., Ponce, E., Rubio, M., and Huitron, C.** (1993) Glucose and glycerol repression of α -amylase in *Streptomyces kanamyceticus* and isolation of deregulated mutants. *Biotechnol. Lett* **15**, 595-600
- Geourjon, C., and Deleage, G.** (1995) SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Comp. Appl. Biosci.* **11**, 681-684

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

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 (eds). *Butterworths*. USA, **10**, 241-309

Hodgson, D. A. (1980) Carbohydrate utilization in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Norwich: Ph.D Thesis, University of East Anglia,UK

Hodgson, D. A. (1982) Glucose repression of carbon uptake and metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its perturbation in mutants resistant to 2-deoxyglucose. *J. Gen. Microbiol.* **128**, 2417-2430

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

Hodgson, D. A. (2000) Primary Metabolism and its Control in *Streptomyces*: A Most Unusual Group of Bacteria. In: *Advances in Microbial Physiology* Poole R. (ed) Academic Press, **42**, p 51

Hopwood, D. A. (1988) Towards an understanding of gene switching in *Streptomyces*, the basis of sporulation and antibiotic production. *Proc R. Lond. Inglaterra.* **235**, 121-138

Hopwood, D. A. (2001) A Genome Perspective on Life in the Soil. *12th International Symposium on the Biology of Actinomycetes*, Canada

Hoving, S., Munchbach, M., Schmid, H., Signor, L., Lehmann, A., Staudenmann, W., and Quadroni, M. J. (2000) A method for the chemical generation of N-terminal peptide sequence Tags for rapid protein identification. *Anal. Chem.* **5**, 1006-1014

Hutchinson, C. R., and Colombo, A. L. (1999) Genetic Engineering of doxorubicin production in *Streptomyces peuceetius*: a review. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 647-652

Hsieh, P.C., Kowalczyk, T. H., Phillips, N. F. (1996) Kinetic mechanisms of polyphosphate glucokinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* **35**, 9772-9781

Ikeda, H, Seno, E. T., Bruton, C. J., and Chater, K. F. (1984) Genetic mapping,

cloning and physiological aspects of the glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Gen. Genet.* **196**, 501-507

Ingram, C., Delic, I., Westpheling, J. (1995) *ccrA1*: mutation in *Streptomyces coelicolor* that affects the control of catabolite repression. *J. Bacteriol.* **177**, 3579-3586

Ishikawa, H., Maeda, T., Hikita, H. (1987) Initial-rate studies of a thermophilic glucokinase from *Bacillus stearothermophilus*. *Biochem. J.* **248**, 13-20

Jensen, O.N., Larsen M.R. and Roepstorff, P. (1998) Mass spectrometric identification and microcharacterization of proteins from electrophoretic gels: strategies and applications *Proteins* **2**, 74-89

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

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

Lueck, J. D., and Fromm, H. J. (1974) Kinetics, mechanism, and regulation of a rat skeletal muscle hexokinase. *J. Biol. Chem.* **5**, 1341-1347

Mahr, K., van Wezel, G. P., Swensson, C., Kregel, U., Bibb, M.J., and Titgemeyer, F. (2000) Glucose kinase of *Streptomyces coelicolor* A4(2): large scale purification and biochemical analysis. *Antonie van Leeuwenhoek* **78**, 253-261

Mahr, K., Hillen, W., and Titgemeyer, F. (2000) Carbon catabolite repression in *Lactobacillus pentosus*: analysis of *ccpA* region. *Appl Environ. Microbiol.* **66**, 277-283

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

Noat, G., Ricard, J., Borel, M., and Got, C. (1968) Kinetic study of yeast hexokinase. 1. Steady-state kinetics. *Eur. J. Biochem.* **5**, 55-70

Noat, G., Ricard, J., Borel, M., and Got, C. (1970) Kinetic study of yeast hexokinase. Inhibition of the reaction by magnesium and ATP. *Eur. J. Biochem.* **13**, 347-363

Parche S., Schmidt, R., and Titgemeyer, F. (1999) The phosphotransferase system (PTS) of *Streptomyces coelicolor*: identification and biochemical analysis of a histidine phosphocarrier protein HPr encoded by the gene *ptsH*. *Eur. J. Biochem.*

265, 308-317

Parche, S., Nothaft, H., Kamionka, A., and Tigemeyer, F. (2000) Sugar uptake and utilization in *Streptomyces coelicolor*: a PTS view to the genome. *Antonie van Leeuwenhoek* **78**, 243-251

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

Porter, E. V., Chassy, B. M., Hoimlund, C. E. (1982) Purification and kinetic characterization of a specific glucokinase from *Streptococcus mutans* OMZ70 cells. *Biochim. Biophys. Acta* **709**, 178-186

Postma, P. W., Lengeler J. W., and Jacobson, G. R. (1993) Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate Phosphotransferase Systems of Bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**, 543-594

Redshaw, P. A., McCann, P. A., Sankaran, L., and Pogell, B. M. (1976) Control of differentiation in *Streptomyces*: involvement of extrachromosomal deoxyribonucleic acid and glucose repression in aerial mycelia development. *J. Bacteriol.* **125**, 698-705

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

Ricard, J., Noat, G., Borel, M., and Got, C. (1972) The theory of alternative substrates in enzyme kinetics and its application to yeast hexokinase. *Eur. J. Biochem.* **31**, 14-24

Saier, Jr., M. H. (1996) Cyclic AMP-independent catabolite repression in bacteria. *FEMS Microbiol. Lett* **138**, 97-103

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

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

Saitou N. and Nei M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees *Molecular Biology and Evolution*, Vol. 4, No 4, 406-425

Scopes R. K., and Bannon, D. R. (1995) Kinetic analysis of the activation of *Zymomonas mobilis* glucokinase by phosphate. *Biochim Biophys. Acta.* **1249**, 173-179

Sechi S., and Chait B. T. (2000) A method to define the carboxyl terminal of proteins. *Anal. Chem.* **72**, 3374-3378

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

Smith, C. P., and Chater, K. F. (1988a) Cloning and transcriptional analysis of the entire glycerol utilization (*gylABX*) operon of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and identification of a closely associated transcription unit. *Mol. Gen. Genet.* **211**, 129-137

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

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

Storer, A. C., and Cornish-Bowden, A. (1976) Concentration of MgATP²⁻ and other ions in solution. *Biochem. J.* **159**, 1-5

Surowitz K. G., and Pfister, R. M. (1985) Glucose metabolism and pyruvate excretion by *Streptomyces alboniger*. *Can. J. Microbiol.* **31**, 702-706

Rosana-Ani, L., Skarlatos, P. Dahl, M. K. (1999) Putative contribution of glucose kinase from *Bacillus subtilis* to carbon catabolite repression (CCR): a link between enzymatic regulation and CCR? *FEMS Microbiol. Lett.* **171**, 89-96

Rosenberg, I. M. (1996) *Protein Analysis and Purification: benchtop techniques* Birkhäuser Boston, MA

Ramos, A. I. (1999) Aislamiento y caracterización de cepas de *Streptomyces peucetius* var. *caesioides* sensibles a 2-dog, obtenidas a partir de una mutante 2-dog^R insensible a represión catabólica por carbono. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias Bioquímicas. México, D.F. Facultad de Química, UNAM

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

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

The Society for Actinomycetes, Japan. (1997) Atlas of Actinomycetes Asakura Publishing Co., Ltd. Japan

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

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

Voet, D., and Voet, J. G. (1990) Biochemistry, p 346, John Wiley and Sons, USA

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