



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

“CLONACION DEL GEN DE LA GLUCOSA CINASA DE
Streptomyces peucetius var. *caesius*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

NADINE ARELI MASCAREÑAS RUIZ



MEXICO, D.F.

2005

M343943



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente: M. en C. Marisol López López
Vocal: M. en C. Rosa del Carmen Mateos Marcos
Secretario: Dr. Sergio Sánchez Esquivel
1er suplente: M. en C. Ruth Edith Martín Fuentes
2er suplente: QFB Norma Angélica Castellanos Chávez

Asesor: Dr. Sergio Sánchez Esquivel

Supervisora Técnica: M. en C. Beatriz Ruiz Villafán

Sustentante: Nadine Areli Mascareñas Ruiz

Sergio Sánchez Esquivel
Beatriz Ruiz Villafán
Nadine Areli Mascareñas Ruiz

A mi Madre por ser mi ejemplo.

A mi padre por su apoyo y confianza

A mis hermanos Jessica y Eli-xchel por que siempre han estado conmigo, en las buenas y en las malas, por creer en mi.

LOS AMO

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la vida y mi tan amada familia.

Al Dr. Sergio Sánchez por su ayuda e interés durante toda la realización de esta tesis.

Silvia Guzmán, por dedicarme tiempo, paciencia, por tu guía y consejos en la realización de esta tesis.

Laura Escalante, por tu asesoría técnica y amistad

Ruth, por tu amistad y sabios consejos

Beatriz Ruiz, por tu disposición y darle seguimiento a mi trabajo

Rosa del Carmen, por tus valiosas aportaciones

Dra. Romina, por tus aportaciones en el desarrollo experimental de este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio: Larissa, Monse, Daniel, Alonso, Lalo, Gaby, Luz y Adán por su amistad

Dr. Julio Cesar Carrero, por tu asesoría y enseñanza

Dra. María Elena Flores, por su ayuda y disposición

A mis maestros de que han dejado huella:

Ing. Carlos Rodríguez Caldera gracias por su apoyo, por preocuparse por mí, por impulsarme.

QFB Alicia Cervantes y Marisol López porque me enseñaron que la dedicación lleva al éxito.

Karen Pérez y Claudio Garibay, por su gran apoyo en todo momento

J. Güendulaín, por los momentos tan padres y emocionantes que pasamos en la universidad

A mis amigos que son una parte importante en mí: Adriana, Brenda, Orlando, Jimmy, Ale, Berenice, Marco, José Luis G., J.L.Amaro, Gaby A., Víctor O., Fernando, Isaias, Marianita y Paco. Los quiero mucho.

ABREVIATURAS

ADP	Adenosin difosfato
AMPc	AMP cíclico
Ap	Ampicilina
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ATP	Adenosin trifosfato
C	Citosina
CRP	Proteína receptora del catabolito
Da	Daltons
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DNR	Daunorrubicina
DNTP's	Didesoxinucleótidos trifosfato
DOG	2-desoxiglucosa
DXR	Doxorrubicina
EI	Enzima I
EII	Enzima específica para cada carbohidrato
G	Guanina
glk	Gen que codifica para la enzima glucosa cinasa
Glk	Enzima glucosa cinasa
Glucosa 6- P	Glucosa 6 fosfato
HPr	del inglés <i>Heat stable protein</i>
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactopiranosido
Mg	Magnesio
MgCl₂	Cloruro de Magnesio
ORF	del inglés <i>open reading frame</i>
pb	par de base
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

PEP	Fosfoenol piruvato
PTS	Sistema de transporte de fosfotransferasa
RCC	Represión catabólica por carbono
RCG	Represión catabólica por glucosa
RNAr	Ácido ribonucleico ribosomal
ROK	del inglés <i>repressor, orf, kinase</i>
TAE	Amortiguador tris-acetatos-EDTA
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indol- β -galactósido

CLONACIÓN DEL GEN DE LA GLUCOSA CINASA DE
Streptomyces peucetius* var. *caesius

CONTENIDO

ABREVIATURAS

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Características generales del género <i>Streptomyces</i>	1
1.1.1	Importancia del género <i>Streptomyces</i>	4
1.1.2	<i>Streptomyces coelicolor</i>	5
1.1.3	<i>Streptomyces peucetius</i> var. <i>caesius</i>	5
1.2	Mecanismos de regulación metabólica	7
1.2.1	Represión catabólica por carbono (RCC)	8
1.2.2	Mecanismo de represión catabólica por fuente de carbono en <i>Escherichia coli</i>	9
1.2.3	Mecanismo de represión catabólica por fuente de carbono en <i>Bacillus subtilis</i>	12
1.2.4	Mecanismo de RCC en <i>Streptomyces</i>	13
1.3	Cinasas	15
1.3.1	Glucosa cinasa	16
1.3.2	Glucosa cinasa de <i>S. coelicolor</i> y <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i>	18
1.3.3	Papel de la glucosa cinasa en la RCC en <i>Streptomyces</i>	19
2	ANTECEDENTES	23

3 JUSTIFICACIÓN	26
4 OBJETIVO GENERAL	26
4.1 Objetivos particulares	26
5 ESTRATEGIA	27
6 MATERIALES Y MÉTODOS	28
6.1 Microorganismos y condiciones de cultivo	28
6.2 Aislamiento del DNA genómico de <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i> .	29
6.3 Amplificación por PCR del gen <i>glk</i> <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i>	31
6.4 Purificación de bandas de geles de agarosa	33
6.5 Clonación del gen <i>glk</i> en el plásmido pGEM-T easy	34
6.6 Extracción del plásmido en pequeña (MINIPREP) y en gran escala (MAXIPREP)	36
7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
7.1 Purificación del DNA genómico de <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i> y <i>S. coelicolor</i>	39
7.2 Amplificación del gen glucosa cinasa (<i>glk</i>) de <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i> mediante la reacción en cadena de la polimerasa	40
7.3 Determinación de las condiciones óptimas para la amplificación del gen glucosa cinasa (<i>glk</i>) de <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i> por PCR	45
8 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	70
9 APÉNDICES	72
9.1 Apéndice 1	72
9.1.1 Medios de cultivo	72
9.2 Apéndice 2	73

9.2.1	Preservación de <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i> en glicerol al 10%	73
9.2.2	Preparación de células electrocompetentes de <i>E. coli</i> DH5 α	73
9.2.3	Electroporación de células competentes de <i>E. coli</i> DH5 α	74
9.3	Apéndice 3	75
9.3.1	Secuencia del gen <i>glk</i> de <i>S. coelicolor</i> en donde se muestran los sitios de unión a los diferentes oligonucleótidos probados para amplificar el gen <i>glk</i> .	75
9.3.2	Secuencias amino y carboxilo de las proteínas glucosa cinasa (Glc) de <i>S. coelicolor</i> y <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i>	76
9.4	Apéndice 4	77
9.4.1	Secuencia del gen <i>glk</i> de <i>Streptomyces peucetius</i> var. <i>caesius</i> AUTHORS Langley,E., Mascareñas,N.A., Ruiz,B. and Sánchez,S. TITLE Direct Submission JOURNAL Submitted (11-JUN-2004) Molecular Biology and Biotechnology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Escolar s/n, Ciudad Universitaria, D.F. 04510, México	77
10	BIBLIOGRAFÍA	79

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Características generales del género *Streptomyces*

El género *Streptomyces* pertenece a la familia Streptomycetaceae y a la clase Actinobacteria (Figura 1). Son bacterias Gram-positivas de alto contenido de G/C (guanina/citosina) en su genoma, generalmente aerobias estrictas, distribuidas principalmente en suelos. Se caracterizan por ser miceliales y presentar en su ciclo de vida una diferenciación morfo-fisiológica única dentro de los procariontes. A diferencia de la mayoría de las bacterias que son unicelulares y se multiplican por fisión binaria, los *Streptomyces* presentan un crecimiento vegetativo miceliar en el que las hifas crecen por extensión apical para formar un micelio ramificado, que se nutre principalmente de polímeros insolubles como almidón y celulosa presentes en las plantas, mediante la secreción y acción de una variada gama de enzimas hidrolíticas extracelulares (Hodgson, 2000). Una vez que los nutrientes se han agotado, comienza un complejo proceso de diferenciación, que comienza con el surgimiento de hifas aéreas que crecen nutriéndose de la lisis del micelio vegetativo. Posteriormente, las hifas aéreas comienzan a enroscarse y septarse para dar lugar a la formación de esporas que al germinar vuelven a generar micelio vegetativo (Figura 2).

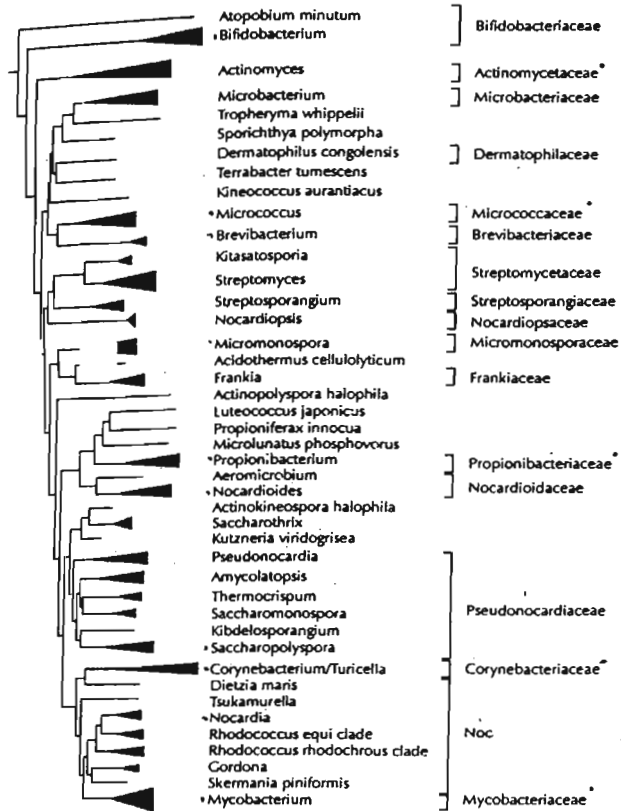


Figura 1 Árbol filogenético del grupo de los Actinomicetos construido con base en los ARNr 16S (Fuente: Hopwood, 2000)

Aunada a la diferenciación morfológica, existe una diferenciación fisiológica, en donde la formación de hifas aéreas coincide comúnmente con la producción de metabolitos secundarios.

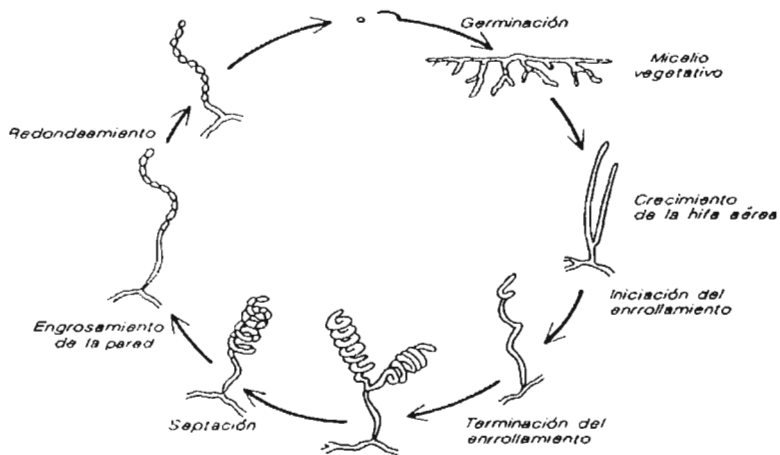


Figura 2 Ciclo de vida de *Streptomyces*
(Fuente: Hopwood, 1989)

1.1.1 Importancia del género *Streptomyces*

Este género es importante debido a que durante la fase estacionaria de crecimiento comienzan a producir una gran variedad de metabolitos secundarios con propiedades biológicas importantes. El metabolito secundario más familiar es la geosmina, que imparte a los suelos su olor característico a “tierra mojada”. Los metabolitos secundarios más importantes producidos por el género *Streptomyces* son los antibióticos; de los 6000 antibióticos producidos por los actinomicetos en los años 90's, 5000 fueron producidos por el género *Streptomyces* (Goodfellow & O'Donnell, 1992). También producen otros compuestos con diferentes actividades biológicas (Tabla 1).

Microorganismo	Naturaleza del metabolito	Ejemplo
<i>S. venezuelae</i>	antibiótico	Cloranfenicol
<i>S. griseus</i>	antibiótico	Estreptomina
<i>S. hygrosopicus</i>	herbicida	Biafalos
<i>S. tsukabensis</i>	inmunosupresor	FK506
<i>S. olivochromogenes</i>	enzima extracelular	Manasas
<i>S. lividans</i>	enzima extracelular	Xilanasas
<i>S. peucetius</i>	antitumoral	Daunorrubicina

Tabla 1. Metabolitos producidos por el género *Streptomyces* (Hopwood, 2000)

Esta gran versatilidad biosintética le confiere a este género gran importancia científica, industrial y biotecnológica.

1.1.2 *Streptomyces coelicolor*

Streptomyces coelicolor A3(2) es el organismo modelo del género *Streptomyces*, debido a la diversidad de metabolitos secundarios que produce y la facilidad de su manipulación genética. Actualmente es el estreptomiceto mejor caracterizado a nivel bioquímico, fisiológico y genético, junto con *Streptomyces avermitilis*. Su genoma está completamente secuenciado (Hopwood, et al. 2001) y su análisis reveló su enorme capacidad codificadora, ya que las 8,667,507 pb que integran al genoma de este microorganismo, codifican para más de 7,500 proteínas, de las cuales una proporción substancial parece estar dedicada al metabolismo secundario (Hopwood, et al. 2001).

1.1.3 *Streptomyces peucetius* var. *caesius*

Streptomyces peucetius var. *caesius* fue obtenido por tratamiento mutagénico con N-nitroso-N-metil uretano a partir de *Streptomyces peucetius*, el microorganismo productor de daunorrubicina (DNR). El primer microorganismo produce doxorubicina (DXR), un antibiótico del grupo de las antraciclinas que posee una importante actividad antitumoral (Arcamore, et al., 1969) (Figura 3). El espectro bactericida de este antibiótico, también conocido como adriamicina, comprende principalmente bacterias Gram-positivas y algunas Gram-negativas (Vanek et al., 1977). La importancia de este compuesto radica en su capacidad antineoplásica (Arcamone, 1981). A pesar de poseer efectos tóxicos colaterales, éste compuesto es

muy importante en la clínica como agente terapéutico para el tratamiento de diversas neoplasias, carcinoma esofágico, cáncer de mama, cáncer gástrico, sarcoma de Kaposi y linfomas (Myers, 1988).

Las antraciclinas actúan intercalándose entre los pares de bases de la doble hebra del DNA, produciendo ruptura de la cadena e impidiendo así la replicación del material genético (Di Marco et al., 1975).

Debido a la producción fermentativa ineficiente de este compuesto, el entendimiento de los mecanismos regulatorios que controlan este proceso es de utilidad para desarrollar cepas sobreproductoras del antitumoral, así como para optimizar el proceso fermentativo, ya que la síntesis química por hidroxilación de la DNR es un proceso muy costoso.

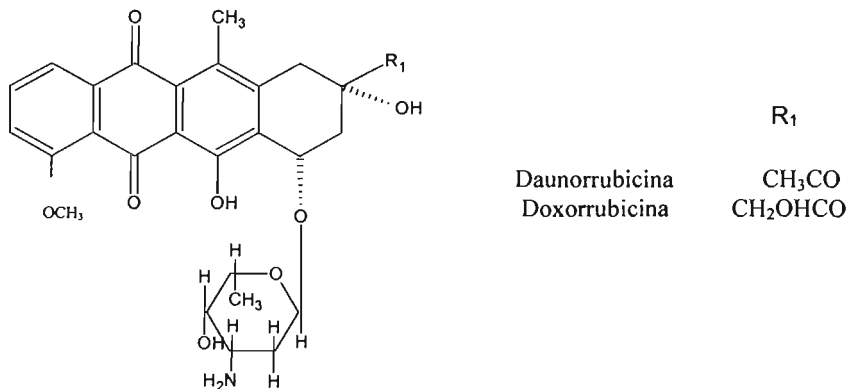


Figura 3 Estructura química de la doxorubicina y la daunorubicina
(Fuente: Hutchinson y Colombo, 1999)

1.2 Mecanismos de regulación metabólica

Todos los procesos fisiológicos están sujetos a una forma de regulación para asegurar niveles adecuados de cada metabolito y evitar gastos innecesarios de energía.

Dentro de los mecanismos que regulan el metabolismo en los microorganismos se encuentran la inducción, la retroregulación y la represión catabólica.

La inducción consiste en la capacidad de los microorganismos para sintetizar un perfil de enzimas determinado, como respuesta a la presencia de sustratos específicos en el medio de cultivo (Santana et al., 1994). La inducción ha sido citada entre otros ejemplos, en el control de la biosíntesis de penicilina G y cefalosporina C por los aminoácidos glutamato y metionina (Lara et al., 1982).

Cuando las vías de biosíntesis de estos metabolitos están sujetas a mecanismos de retroregulación, el exceso del producto en el medio de cultivo, reprime la síntesis "*de novo*" de las sintetasas implicadas, hasta que se presenta un descenso en su concentración. Ejemplo de ello es el efecto que ejerce la L-lisina sobre la enzima homocitrato sintetasa, lo cual se traduce en una disminución en la formación del intermediario α -aminoadipato, precursor inicial de la vía biosintética de la penicilina (Masurekar et al., 1972).

Los microorganismos pueden asimilar una amplia variedad de sustratos orgánicos y/o inorgánicos, muchos de ellos de gran complejidad, sin embargo, la

presencia de sustratos fácilmente asimilables evita el gasto de energía empleada en sintetizar enzimas necesarias para el metabolismo de nutrientes complejos. Este mecanismo regulatorio se conoce como represión catabólica y puede ser ocasionado por el carbono, el nitrógeno o bien por el fósforo, dependiendo del nutriente que la cause.

La presencia de estos mecanismos repercute fuertemente en la producción de los metabolitos, por tanto, el conocerlos puede permitir diseñar técnicas de fermentación o estrategias encaminadas al mejoramiento genético de la producción.

1.2.1 Represión catabólica por carbono

Describe el fenómeno general en los microorganismos donde la presencia de una fuente de carbono en el medio de cultivo, que generalmente es fácilmente metabolizable, es capaz de inhibir la expresión y/o actividad de ciertos genes y operones que están relacionados con la utilización de fuentes de carbono alternativas y la producción de metabolitos secundarios.

En la mayoría de los casos, la fuente de carbono preferida es la glucosa; aunque en otros casos, la glucosa no es la fuente de carbono más fácil de metabolizar. Tal es el caso de *Streptococcus thermophilus*, que utiliza lactosa como principal fuente de carbono, aunque haya glucosa disponible en el medio de cultivo.

La cadena regulatoria responsable de la represión catabólica por carbono (RCC), le sirve a la célula para asegurar la utilización jerárquica y

secuencial de la fuente de carbono cuando más de un carbohidrato se encuentra presente en el medio de cultivo.

Los mecanismos responsables de la RCC son diversos, en los procariontes los más estudiados se han realizado en *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*.

1.2.2 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 (PTS) dependiente de fosfoenol piruvato (PEP).

Este sistema es un complejo enzimático compuesto de dos enzimas generales: 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 (EII). El sistema PTS es el más importante en el transporte y fosforilación de carbohidratos en las bacterias Gram- negativas y en algunas Gram-positivas, en donde el PEP es el donador del grupo fosfato (Stülke J. & Hillen W., 1999).

En el mecanismo de represión catabólica por carbono, el PTS fosforila y regula el transporte de carbohidratos, regula indirectamente la expresión de genes cuyos productos están involucrados en el catabolismo de diferentes azúcares y modula la síntesis de AMP cíclico (AMPc). Los niveles intracelulares de AMPc activan la síntesis de muchas enzimas catabólicas sensibles a represión, al unirse con la proteína receptora de AMPc (CRP) y en esta forma actuar sobre los promotores sensibles a RCC estimulando su transcripción (Botsford and Harman, 1992).

Para que se lleve a cabo la cascada de señalización necesaria para esta regulación, se ha sugerido que la enzima IIA específica para glucosa ($EIIA^{glc}$), parece ser el efector alostérico que controla el mecanismo de RCC al unirse en su forma desfosforilada a algunas permeasas de otros carbohidratos o a algunas otras enzimas catabólicas (por ejemplo la glicerol cinasa).

Para que la $EIIA^{glc}$ sea fosforilada, el fosfoenolpiruvato transfiere su grupo fosfato a la enzima El y ésta a la HPr, esta última enzima fosforila reversiblemente a la $EIIA^{glc}$ en un residuo de histidina. En presencia de glucosa, la enzima $EIIA^{glc}$ se desfosforila transfiriendo el grupo fosfato a la enzima IIBC membranal y posteriormente a la glucosa, produciendo así glucosa-6-P. La $EIIA^{glc}$ desfosforilada inhibe alostéricamente la actividad de permeasas de otros azúcares que no se transportan vía PTS y de otras enzimas catabólicas, además de desactivar la adenilato ciclasa (Figura 4). 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 (Stülke J. & Hillen W., 1999).

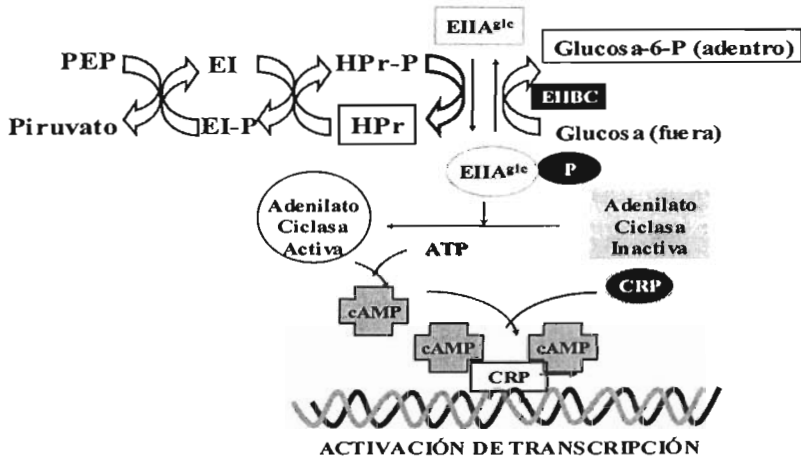


Figura 4 Modelo de represión catabólica en *Escherichia coli* (Basado en Stülke J. & Hillen W., 1999).

Otras bacterias Gram-negativas, como *Rhodobacter*, *Rhodospirillum* y *Azospirillum*, presentan un fenómeno conocido como represión catabólica 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).

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

El metabolismo de carbono en *Bacillus subtilis* también está regulado por el sistema PTS dependiente de PEP, aunque su mecanismo de acción con respecto a *E. coli* es diferente.

En el caso de *B. subtilis*, la glucosa u otra fuente de carbono rápidamente metabolizable genera intermediarios metabólicos, como la fructosa 1,6-bisfosfato (FBF).

Este metabolito activa a una HPr(Ser) cinasa/fosfatasa, y la enzima activada fosforila a HPr en su residuo Ser46. La proteína HPr fosforilada (HPr(Ser-P)) activa a la proteína de control catabólico (CcpA) uniéndose a ella e induciendo una conformación que tiene alta afinidad por 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 RCC, inhibe la iniciación de la transcripción (Figura 5) (Stülke J. & Hillen W., 1999).

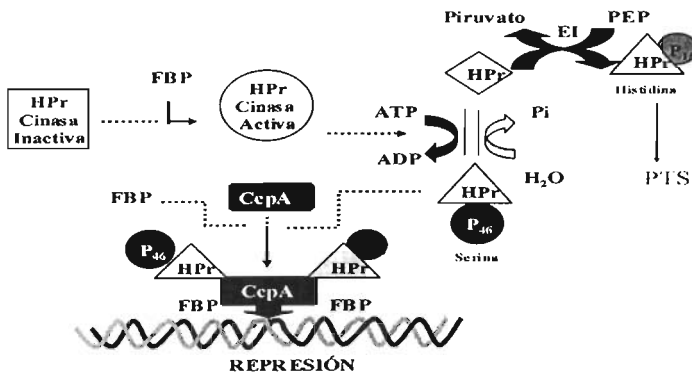


Figura 5 Modelo de represión catabólica en *B. subtilis*
(Basado en Stülke J. & Hillen W., 1999).

1.2.4 Mecanismo de represión catabólica por carbono en el género *Streptomyces*

En el género *Streptomyces*, la utilización de fuentes de carbono, la expresión de genes involucrados en el transporte de carbohidratos, la síntesis de enzimas extracelulares y la de metabolitos secundarios son susceptibles a represión catabólica por carbono (Segura, 1996, Escalante, 1999). El conocer este mecanismo de regulación en *Streptomyces*, tiene implicaciones comerciales, ya que alrededor del 70% de los antibióticos de interés clínico, además de una gran diversidad de compuestos con actividad biológica, son producidos por este género (Demain, 1989).

La detección de nutrientes y la generación de señales como estímulo para producir represión catabólica por carbono está fuertemente ligada a los sistemas de transporte. Mientras que cerca de 20 carbohidratos son transportados a través del PTS (Postma et al., 1993), y se han identificado las enzimas EI, la HPr y la EII específicas para fructosa, éstas no parecen estar involucradas en la regulación por glucosa. Recientemente se ha identificado que la glucosa (el azúcar que causa la represión más fuerte), se transporta en *S. coelicolor* principalmente a través de una glucosa permeasa (GlcP).

Estudios en *S. coelicolor* demostraron que los niveles de AMPc no varían al cambiar la fuente de carbono (Hodgson, 1994); ni tampoco fue identificada una proteína cinasa capaz de fosforilar a la HPr, (Titgemeyer et al., 1995), lo que sugiere que el mecanismo de represión catabólica en este género es diferente al que se lleva a cabo en *E. coli* y *B. subtilis* (Angell et al., 1994).

Varios grupos de investigación han señalado una posible acción reguladora de la enzima glucosa cinasa (GlcK) en el mecanismo de represión catabólica por carbono (Ikeda et al., 1984, Angell et al., 1992., Hodgson, 1992., Kwakman y Postma, 1994., Segura et al., 1996).

1.3 Cinasas

El primer paso en el metabolismo de los azúcares, después de ser transportados al interior de la célula es su fosforilación, la cual es catalizada por cinasas específicas para azúcares. Los azúcares fosforilados quedan listos para posteriores transformaciones químicas, catabólicas ó anabólicas (Bork, 1993).

Las cinasas son enzimas que catalizan la transferencia de un grupo fosfato terminal del ATP a una molécula que actúa como receptor del grupo fosfato, como los lípidos o carbohidratos. Casi todas las cinasas requieren de un catión divalente para funcionar. El magnesio, usualmente activa al ATP para que se lleve a cabo la catálisis, al debilitar el enlace entre el fosfato β y el fosfato γ para orientar a este último y se lleve a cabo la fosfotransferencia (Figura 6). Muchas cinasas participan en la transducción de señales, en el metabolismo de carbohidratos, lípidos, nucleótidos y vitaminas. Algunas cinasas participan en otros procesos, como la regulación génica, la contracción muscular y la resistencia a antibióticos (Cheek, 2002). Estas enzimas se dividen en por lo menos tres familias: las hexocinasas, ribocinasas y galactocinasas. La familia de las hexocinasas incluye hexocinasas y glucocinasas, así como gluco-, ribulo-, xilulo-, glicero-, ramno-, glucono-, glicero-, fructo- y fucocinasas (Bork, 1993). La diferencia entre la hexocinasa y la glucocinasa, es que la primera es una enzima inespecífica que se encuentra en todas las células y cataliza la fosforilación de hexosas, como la D-glucosa y la D-fructosa, mientras que la segunda requiere de un sustrato específico, la glucosa. A pesar de que las cinasas

catalizan esencialmente la misma reacción de transferencia de grupo fosfato, presentan una marcada diversidad en estructura, especificidad de sustrato, así como en el número de rutas metabólicas en las cuales están involucradas.

1.3.1 Glucosa cinasa

La glucosa cinasa (Glc) es la enzima que cataliza la conversión de glucosa a glucosa-6-fosfato dependiente de ATP y Mg^{2+} en el primer paso del metabolismo de la glucosa.

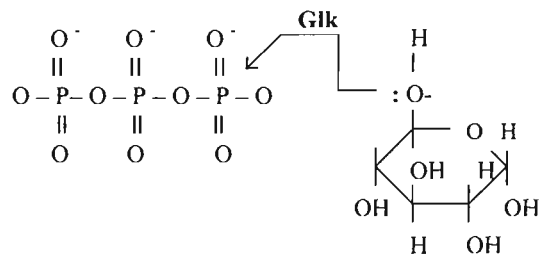


Figura 6 Reacción de fosforilación de la glucosa por la glucosa cinasa
(Fuente: Voet and Voet, 1990)

Esta reacción ocurre tanto en procariontes como en eucariotes. Las glucocinasas bacterianas se pueden dividir en tres familias con base en su secuencia. Las glucocinasas del grupo I son glucocinasas dependientes de ATP y ADP, se

encuentran principalmente en arqueas y recientemente se han identificado en eucariotes (Lunin V., *et al*, 2004). Este es el grupo del cual se obtuvieron las primeras estructuras cristalinas (Lunin V., *et al*, 2004). Las glucocinasas del grupo II son enzimas dependientes de ATP que no poseen el marco de lectura abierto de las proteínas represoras de la familia ROK. El grupo III lo integran las glucocinasas dependientes de ATP que poseen el marco de lectura abierto característico de la familia ROK. Están distribuidas en bacterias y arqueas (Lunin, 2004).

La mayoría de las Glks dependientes de ATP de bacterias y arqueas son enzimas diméricas, aunque existen otras como la de la arquea *Aeropyrum pernix* y la glucocinasa de humano que son monoméricas pero difieren en el tamaño (Tabla 2).

Microorganismo	Peso molecular de subunidad	Número de
	(kDa)	subunidades
<i>Bacillus subtilis</i>	33.5	ND
<i>Bacillus megaterium</i>	33.9	ND
<i>B. stearothermophilus</i>	34.5	2
<i>Brucella abortus</i>	37.6	ND
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	34.2	ND
<i>Escherichia coli</i>	24.5	2
<i>Mycobacterium lepra</i>	34.1	ND
<i>M. tuberculosis</i>	27.5	ND
<i>Propionibacterium shermanii</i>	30.0	2
<i>Streptococcus mutants</i>	24.0	2
<i>Streptococcus pyogenes</i>	33.4	ND
<i>Streptococcus pyogenes</i>	33.4	ND
<i>Streptomyces coelicolor</i>	36.0	4
<i>Zymomonas mobilis</i>	35.4	2
<i>Xylella fastidiosa</i>	36.1	ND
<i>Xylella fastidiosa</i>	36.1	ND

ND: número de subunidades no determinado

Tabla 2 Pesos moleculares de algunas glucosa cinasas bacterianas
(Fuente: Swissprot, <http://expsy.org/sprot>)

1.3.2 Glucosa cinasa de *Streptomyces coelicolor* y *Streptomyces peucetius* var. *caesius*

El análisis de la secuencia de nucleótidos de la Glk de *S. coelicolor*, indica que esta enzima pertenece a la familia ROK, pero a diferencia de las proteínas represoras de esta familia, las cinasas de azúcares no tienen las secuencias de unión a DNA en su región N-terminal (Angell, *et al* 1994).

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

respectivamente. Estas enzimas fueron caracterizadas bioquímicamente, y los zimogramas de actividad revelan la presencia de isoenzimas en ambos microorganismos (Angell *et al.*, 1994; datos no publicados). La glucosa cinasa de *S. coelicolor* parece ser más estable que la de *S. peucetius* var. *caesius*, ya que después de algunas horas de almacenamiento a 4°C, la Glk pura de *S. peucetius* var. *caesius* se encuentra disociada en un 85% a su forma dimérica. La presencia de glucosa en una concentración de 100 mM evita la disociación del tetrámero. Este comportamiento de dimerización no se observa con la glucosa cinasa de *S. coelicolor* (Imriskova *et al.*, 2001).

Hasta septiembre del 2004, se han secuenciado alrededor de 54 Glks de diferentes orígenes, de acuerdo con la base de datos del Swissprot (<http://expasy.org>). Los pesos moleculares de algunas Glks bacterianas reportadas en el Swissprot se muestran en la Tabla 2.

1.3.3 Papel de la glucosa cinasa en la represión catabólica por carbono en el género *Streptomyces*

Las principales evidencias que fundamentan la acción de la Glk en la RCC fueron obtenidas en *S. coelicolor*. Para estudiar este mecanismo en *Streptomyces*, Hodgson (1980, 1982), aisló mutantes resistentes a 2-desoxiglucosa (DOG), un análogo de la glucosa que no es metabolizado por el microorganismo. Estas mutantes (Dog^R), no utilizan glucosa, a pesar de que el transporte de este carbohidrato no está

afectado, presentan afectada la actividad de glucosa cinasa y son insensibles a RCC (Hodgson, 1980, 1982). La insensibilidad de estas mutantes a la RCC fue correlacionada con la pérdida de la Glk, enzima responsable de la fosforilación de glucosa (ATP dependiente), para formar glucosa 6-fosfato.

La complementación de las mutantes Dog^R de *S. coelicolor* con un fragmento de DNA de la cepa silvestre (2.9 kb) que contiene el gen *glkA* de *S. coelicolor* restablece la capacidad de utilizar glucosa, la actividad de Glk y la sensibilidad a DOG y a RCC (Ikeda *et al.*, 1984). La expresión de *glkA* en *E. coli* confirmó que su producto es una proteína que cataliza la fosforilación de la glucosa (Angell *et al.*, 1992). La complementación de mutantes *glkA* de *S. coelicolor* con un gen análogo de glucosa cinasa de *Zymomonas mobilis*, restablece la capacidad de utilizar la glucosa, la actividad de Glk, la sensibilidad a DOG, pero no la sensibilidad a RCC (Angell *et al.*, 1992). Lo anterior, sugiere que la Glk tiene un papel regulatorio en el metabolismo del carbono.

La secuenciación del fragmento *BclI* de 2.9 kb del genoma de *S. coelicolor*, con el gen de *glkA*, demostró la presencia de dos marcos de lectura abiertos completos, *SCO2127* (ORF2) y *glkA* (ORF3), que codifican para proteínas de 20.1 y 33.1 kDa, respectivamente y otro más incompleto (ORF 1). El gen *glkA* se transcribe a partir de dos promotores; de su propio promotor y de otro localizado río arriba de *SCO2127* (Figura 7) (Angell *et al.*, 1992). En mutantes Dog^R de *S. coelicolor*, la complementación con el gen *glkA* restablece la actividad de Glk, la utilización de glucosa y la sensibilidad a DOG, pero son parcialmente sensibles a RCC (60-70%).

Para alcanzar los niveles de sensibilidad a la RCC encontrados en la cepa original, se requiere la complementación de la mutante *Dog^R* de *S. coelicolor* con *SCO2127* y *glkA*, simultáneamente. Las características de *SCO2127* aún no se conocen, ni tampoco la forma en que complementa los niveles de sensibilidad a RCC en la cepa *Dog^R* y además su secuencia no se parece a ninguna de las proteínas regulatorias reportadas en las bases de datos y carece de dominios de unión a DNA (Angell, *et al* 1994).

El análisis de la *glkA* muestra la existencia de secuencias largas de aminoácidos similares a las encontradas en la familia ROK (*repressor, orf, kinase*), que incluye a 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 un dominio de unión a DNA en la región N-terminal, presente en dichas proteínas (Titgemeyer *et al.*, 1994), por lo que no es posible que regule la transcripción. Se especula que la Glk, puede ser una enzima necesaria para promover el flujo glucolítico y con ello facilitar la formación de otros catabolitos que pudieran estar involucrados en la RCC.

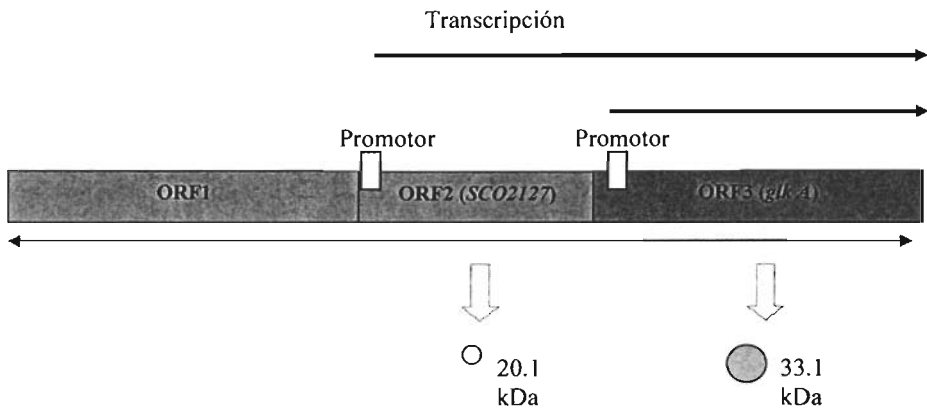


Figura 7 Fragmento *BclI* del genoma de *S. coelicolor* que contiene dos marcos de lectura completos (ORF2 y ORF3) y uno tercero incompleto (ORF1). (Basado en Angell *et al.*, 1992).

2 ANTECEDENTES

Con base en la información mencionada para *S. coelicolor* y con el fin de conocer las bases de la represión catabólica por glucosa (RCG) en este género, en nuestro laboratorio se aislaron mutantes de *S. peucetius* var. *caesius* resistentes a DOG. Al igual que lo reportado para las mutantes Dog^R de *S. coelicolor*, las mutantes obtenidas (Dog^R) presentan baja Glk e insensibilidad a RCC. Adicionalmente, nuestras mutantes presentaron el transporte de glucosa alterado (Ramos et al., 2004).

Por un proceso de enriquecimiento con ampicilina, a partir de una de las cepas Dog^R de *S. peucetius* var. *caesius*, se aislaron mutantes que recuperaron la sensibilidad a DOG (Dog^S). En la tabla 3 se muestra el transporte de glucosa, la Glk y la sensibilidad a RCG de las mutantes Dog y de la cepa original. Como puede verse, la actividad de Glk de las mutantes Dog^S es mayor que la cepa madre (Dog^R), pero menor que la cepa original. No obstante, no se pudo establecer una relación clara entre los niveles de Glk con la sensibilidad a RCG o con el transporte de glucosa. Lo anterior nos permite suponer que además de la Glk, en la sensibilidad a RCG se requiere de un buen transporte de glucosa.

Cepas	Transporte de glucosa	Glk (%)	Represión de Antraciclinas
Original	100	100	S
Dog ^R -21	54	14	R
Dog ^S -2	18	35	R
Dog ^S -11	72	84	R
Dog ^S -53	150	19	S

Tabla 3 Fenotipo de diferentes cepas de *S. peucetius* var. *caesius*

Posteriormente, para conocer el efecto de *glkA* y *SCO2127* (gen que se localiza río arriba de *glkA*) en la mutante Dog^R, se transformó esta mutante con dichas regiones juntas y por separado.

Cepa	Actividad de Glk		Transporte de glucosa		RCG
	U/ mg proteína	%	mmol/mg peso seco	%	
Original	16.75	10	2.2	10	S
Dog ^R	24.53	1	1.1	5	R
<i>SCO2127</i>	188.32	11	2.4	10	S
<i>glk A</i>	155.56	9	1	4	S

Tabla 4 Transformación de mutantes de *S. peucetius* var. *caesius* insensibles a RCC con los genes *glk A* y *SCO2127* de *S. coelicolor*

Al transformar a la mutante con el gen *glkA* se restablece la actividad de Glk de la mutante (casi al 100%), podemos decir que el transporte no se ve modificado de manera significativa.

Al transformar con *SCO2127*, tanto la actividad de Glk como el transporte de glucosa es mucho mayor que aquella que presenta la mutante e incluso sobrepasa los

niveles de de la cepa original; por lo que se especuló que la Glk no actúa sola y probablemente la región *SCO2127* junto con la Glk pudieran tener un papel importante en la RCC.

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 DOG, pero no la sensibilidad del gen *dagA* a la RCC. 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.

3 JUSTIFICACIÓN

Debido a la relevancia que tiene la glucosa cinasa en la represión catabólica por carbono dentro del género *Streptomyces*, es de interés la clonación del gen *glk* de este microorganismo, para secuenciarlo y compararlo con el gen de *S. coelicolor*. La clonación del gen nos permitirá posteriormente utilizarlo en otros estudios relacionados con la RCC

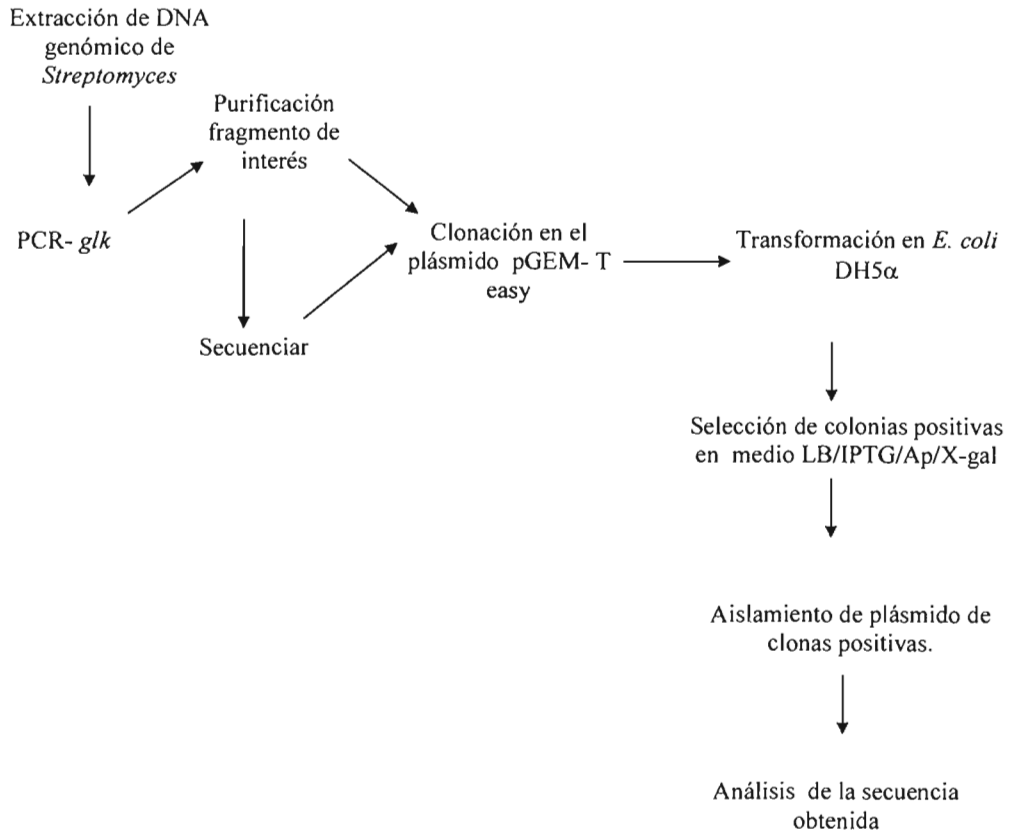
4 OBJETIVO GENERAL

Clonar el gen *glk* de *S. peucetius* var. *caesius*

4.1 Objetivos particulares

- Establecer las condiciones de amplificación del gen *glk* de *S. peucetius* var. *caesius* por PCR
- Clonar el gen *glk* de *S. peucetius* var. *caesius* por PCR con el fin de analizar su secuencia.
- Comparar la secuencia obtenida con las secuencias disponibles en las bases de datos.

5 ESTRATEGIA PARA REALIZAR LA IDENTIFICACIÓN DEL GEN *glk*



6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Microorganismos y condiciones de cultivo

Los microorganismos utilizados en este trabajo fueron: *Streptomyces peucetius* var. *caesius* (cepa depositada y mantenida en la colección de cultivos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, con la clave BM-B-368) y células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α (Invitrogen). Ambas cepas son preservadas en el laboratorio en glicerol al 10% y almacenadas a -70°C (Apéndice 2).

Para aislar el DNA genómico de *S. peucetius* var. *caesius* se creció al estreptomiceto en medio Tripticasa de Soya (TSB) (Difco) suplementado con 0.5% de glicina para debilitar la pared celular del microorganismo y se incubó a 29°C durante 48 h a 200 rpm.

Para purificar el plásmido pGEM-T-easy que contiene al fragmento de interés, la cepa de *E. coli* transformada, se cultivó en medio Luria-Bertani (LB) (Apéndice 1) con ampicilina (Ap) a $100\ \mu\text{g/mL}$ y se incubó a 37°C durante 16 h a 200 rpm.

6.2 Aislamiento del DNA genómico de *S. peucetius* var. *caesius*

Se preparó un preinóculo, adicionando 500 μ L del glicerol de *S. peucetius* var. *caesius* a 25 mL de TSB. Se incubó a 29°C con agitación de 200 rpm durante 48 h, se recuperó el botón por centrifugación a 5000 rpm durante 8 min y se lavó dos veces con solución salina isotónica estéril (SSI). El cultivo se recuperó nuevamente por centrifugación a 5000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente en una centrífuga Beckman J2-MC y un rotor JA20. El micelio se lavó dos veces con 15 mL de SSI y se resuspendió en 6 mL de la misma solución. Posteriormente, dos matraces con 50 mL de TSB mas glicina al 0.5% fueron inoculados con 3 mL de la suspensión anterior e incubados a 29°C con agitación a 200 rpm durante 48 h. El micelio fue recuperado bajo las mismas condiciones, lavado dos veces con 25 mL de sacarosa al 10.3% y resuspendido en 25 mL de amortiguador P (Apéndice 1) suplementado con lisozima 2 mg/mL. Se incubó a 37°C hasta la formación de protoplastos, los cuales fueron recuperados por centrifugación a 3000 rpm durante 10 min y resuspendidos en 50 mL de amortiguador P. Nuevamente los protoplastos fueron recuperados bajo las condiciones anteriores y resuspendidos en 10 mL de sacarosa 10.3% adicionada con 200 μ l de EDTA 0.5 M. La suspensión anterior se distribuye por igual en dos partes y se le adiciona a cada una 1 mL de SDS (dodecil sulfato de sodio) al 20%. Se agitó suavemente y de inmediato se realizó una extracción con fenol saturado con TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM) otra con fenol-cloroformo (1:1), y dos más

con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). A la fase acuosa se le añadió un volumen de isopropanol, recuperándose el DNA con ayuda de una pipeta pasteur estéril.

El DNA se disolvió en un volumen mínimo de agua estéril desionizada y se trató con RNAsa a una concentración final de 50 µg/mL durante 1 h a 50°C. Al finalizar este tiempo, se añadió pronasa a una concentración final de 100 µg/mL y se incubó a 37°C durante 1 h. Se agregaron SDS y NaCl a una concentración final de 0.4% y 100 mM respectivamente. Posteriormente y con el fin limpiar el DNA de las enzimas anteriores, se volvió a realizar una extracción con fenol saturado con TE (1 de fenol y 1 de muestra de DNA), otra con fenol-cloroformo (1:1), y dos más con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) en relación 1:1. Posteriormente el DNA se precipitó agregando a la fase acuosa 1/10 de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto. El DNA se centrifugó (10 000 rpm) durante 10 min y el precipitado se volvió a lavar con etanol al 70% (v/v con agua) y se dejó secar perfectamente para eliminar completamente los residuos del mismo. Finalmente el DNA se disolvió en un volumen mínimo de agua estéril desionizada y se determinó su pureza y concentración mediante la relación de lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm, utilizando un biofotómetro. El estado del DNA fue corroborado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% según los protocolos estándar usando TAE (Amortiguador tris-acetatos-EDTA) 1X como amortiguador de corrida (Sambrook et al, 1989).

6.3 Amplificación por PCR del gen *glk* *S. peucetius* var. *caesius*

El gen *glk* fue amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un termociclador Gene Amp PCR System 2400; usando 250ng/μL de DNA genómico de *S. peucetius* var. *caesius* como templado. Las condiciones de amplificación consistieron en: una exposición inicial a 94°C durante 5 min y treinta ciclos que comprenden: 1 min a 94°C para la desnaturalización, 1 min a 50, 52 o 70 y 72°C (según el experimento) para el alineamiento, 1 min a 72°C para la polimerización. Por último, una exposición final de 5 min a 72°C, para la extensión final.

El sistema de reacción utilizado para amplificar el gen *glk* de *S. peucetius* var. *caesius* consistió de: 8μL de dNTP's 1.25 mM, 5 μL de amortiguador para AmpliTaq de Applied Biosystems, DMSO a una concentración final de 5% ó 10%, MgCl₂ 1mM, 2 mM ó 3 mM; 250 ng de DNA genómico, 1 μL de oligonucleótidos 0.4 μmol/mL, 0.4 unidades de Taq polimerasa de Applied Biosystems y agua grado miliQ para completar un volumen final de 50 μL.

El sistema de reacción utilizado para amplificar el gen *glk* de *Streptomyces coelicolor* (control positivo) fue el siguiente: 8μL de dNTP's 1.25 mM, 5 μL de amortiguador 1x para AmpliTaq de Applied Biosystems, DMSO a una concentración final de 10%, 3 μL MgCl₂ 25 mM, 250 ng de DNA genómico, oligonucleótido (*Tit1* y *Tit2*) 0.4 μmol/mL de cada uno, 0.4 unidades de Taq polimerasa de Applied Biosystems y agua grado miliQ para completar 50 μL.

Se probaron pares de cuatro diferentes oligonucleótidos que se muestran en la Figura 8.

En el apéndice 3 se indica el sitio a donde se unen los oligonucleótidos, tomando como referencia el gen *glk* de *S. coelicolor*.

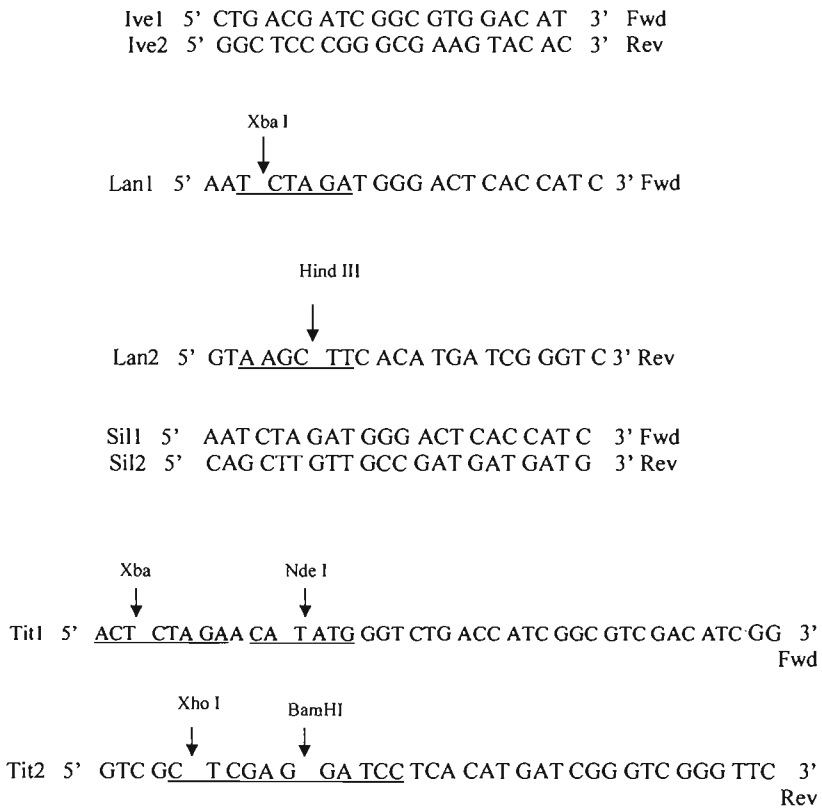


Figura 8 Oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen *glk* de *Sreptomyces peucetius* var. *caesius*. Las flechas indican los sitios de corte de las enzimas de restricción.

6.4 Purificación de bandas de geles de agarosa.

El fragmento de interés que se amplificó por PCR se purificó con el fin de clonarlo y secuenciarlo. Para ello se cortó la banda de interés del gel de agarosa, y se colocó en columnas de fibra de vidrio (Figura 9). Se centrifugó 0.5 min a 3 000 rpm hasta que ya no se recolectó sobrenadante. Se extrajo la fase acuosa dos veces con fenol-cloroformo (1:1), y dos más con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). El DNA se precipitó de la fase acuosa agregando 1/10 de volumen de NaCl 5 M y 2 volúmenes de etanol (EtOH) absoluto, se dejó reposar 20 min y se centrifugó 30 min a 13 000 rpm. El DNA se lavó con EtOH 70%, se dejó secar perfectamente y se resuspendió en 10 μ L de agua.

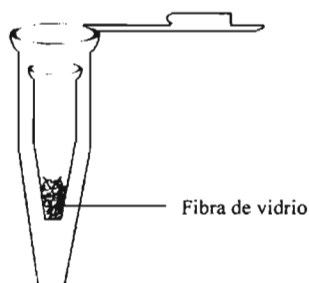


Figura 9 Columnas de fibra de vidrio

6.5 Clonación del gen *glk* en el plásmido pGEM-T easy

El gen *glk* fue clonado en el vector pGEM-T easy con el fin de poder secuenciarlo, empleando los oligonucleótidos del fago M13, que flanquean al sitio múltiple de clonación donde se encuentra insertado el gen.

El pGEM-T easy (Figura 10) es un plásmido de alto número de copias utilizado para clonar productos de PCR. El sitio de inserción del fragmento está flanqueado por una timina que aparea con la adenina que ha sido añadida al fragmento amplificado por la AmpliTaq DNA polimerasa.

El vector posee un sitio múltiple de clonación que está flanqueado por sitios de reconocimiento para diferentes enzimas de restricción, las cuales al corte, permiten liberar al inserto. Dicho vector contiene un gen de resistencia a ampicilina (Ap). El sitio múltiple de clonación se encuentra flanqueado por los promotores T7 y SP6, dentro del gen *lacZ*. También contiene sitios para secuenciación con los oligonucleótidos del fago M13. La inactivación de dicho gen (*lacZ*), causada por la inserción de un fragmento, permite identificar las clonas recombinantes mediante el color que desarrollan en placa.

La reacción de ligación contenía lo siguiente:

Reacción de ligación	
Componentes	Reacción estándar (µL)
Amortiguador de ligación 2x, para T4 DNA ligasa (Promega)	5
pGEM-T Easy vector (50 ng)	1
Producto de PCR	1
DNA ligasa de T4	1
Agua desionizada	2
Volumen final	10

Una vez mezclados los componentes de la reacción de ligación, esta se incubó toda la noche a 4°C para después ser utilizada en la transformación de células electrocompetentes de *E. coli* DH5α (por electroporación) con 1 µL de la mezcla de ligación (Apéndice 2). Las cepas de *E. coli* transformadas, se plaquearon

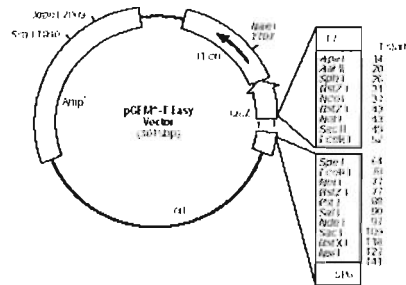


Figura 10 Plásmido pGEM-T-Eeasy

en agar LB suplementado con Ap (100 µg/mL), X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indol-β-galactósido) 20 µg/mL e IPTG (isopropil β-D-tiogalactopiranosido) 10 mM. Las cajas se incubaron a 29°C durante 16 h, las clonas positivas fueron seleccionadas y sembradas en el mismo medio; de aquí, cinco clonas fueron elegidas al azar para extraerles el plásmido.

6.6 Extracción del plásmido en pequeña (MINIPREP) y en gran escala (MAXIPREP)

Para corroborar la presencia del gen amplificado dentro del plásmido pGEM-T-Easy, se aisló al plásmido recombinante en pequeña escala y se realizó un análisis de restricción, como sigue:

Las colonias fueron inoculadas en 3 mL de medio LB con Ap 100 µg/mL, una vez transcurrido el tiempo de incubación, las células se recuperaron por centrifugación a 4°C, 13 000 rpm por 1 min, se resuspendieron en 200 µL de solución A (Apéndice 1) fría (4°C), se agregaron 400 µL de la solución B (Apéndice 1) preparada en fresco y se incubó 5 minutos en hielo. Se adicionaron 300 µL de solución C (Apéndice 1) fría y se centrifugó a 13 000 rpm a 4°C por 20 min. Al sobrenadante se le agregaron 2 volúmenes de isopropanol y el DNA se dejó precipitar durante 25 minutos. La suspensión se centrifugó a 13 000 rpm durante 30 min (4°C) y el botón se lavó con 300 µL de EtOH al 70%, bajo las mismas condiciones de centrifugación. Al eliminar el sobrenadante, el DNA se secó y resuspendió en 20 µL de agua, para después ser incubado por 1 h a 50°C con RNAsa a una concentración 20 µg/mL (soluciones en Apéndice 1).

El análisis de restricción de los plásmidos se realizó con la enzima *EcoRI* de Invitrogen; ya que como se muestra en la figura 11, es de utilidad para liberar al fragmento el cual no tiene sitios de restricción para dicha enzima.

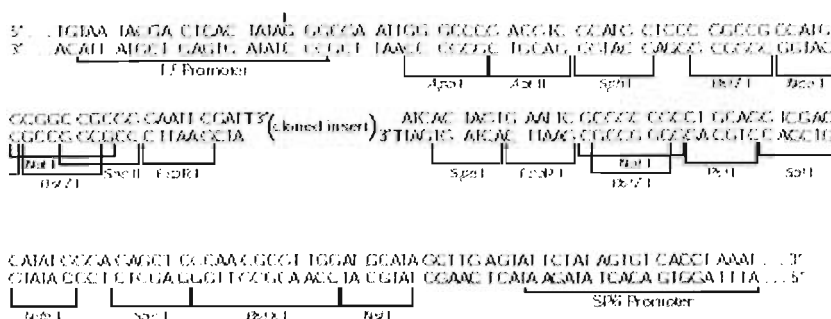


Figura 11 Sitio de inserción del fragmento de interés en el vector pGEM-T-Easy

Una vez que se obtuvo la clona que contiene al plásmido recombinante, se escaló la técnica anterior a un volumen de 100 mL de medio de cultivo (maxiprep). Después de agregar la RNAsa, se añadió proteinasa K a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ y se incubó durante 1h a 37°C. Posteriormente, se realizaron dos extracciones con fenol saturado con TE-Cloroformo (1:1) y dos más con cloroformo-álcool isoamílico (1:1). El DNA se precipitó agregando a la fase acuosa 1/10 NaCl 5M y 1 volumen de isopropanol. Posteriormente el DNA fue lavado con 500 μL de EtOH al 70% bajo las mismas condiciones de centrifugación. Al eliminar el sobrenadante el botón se secó perfectamente para ser resuspendido en 50 μL de agua y nuevamente se realizó el análisis de restricción.

El fragmento de DNA clonado en el plásmido pGEM-T-Easy se envió a secuenciar a los laboratorios Laragen (USA) en ambas direcciones (5' → 3' y 3' → 5') por el método de didesoxiterminación de la cadena, usando los oligonucleótidos provenientes de la secuencia del fago M13 que flanquean el sitio múltiple de clonación de este plásmido.

El análisis de la secuencia obtenida, se realizó con ayuda del programa de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) de Estados Unidos, disponible en la dirección: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Purificación del DNA genómico de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* y *Streptomyces coelicolor*

El primer paso fue obtener puro e íntegro el DNA genómico de *S. peucetius* var. *caesius* y de *S. coelicolor*, así como determinar su concentración. La integridad del DNA genómico se corroboró por electroforesis en gel de agarosa al 1%, lo que nos indicó que no hubo degradación del ácido nucleico durante el proceso de purificación (Figura 12). La pureza del DNA fue buena ya que la relación de absorbancias 260/280 fue mayor a 1.8 para ambos casos, lo que indica una baja cantidad de proteínas.

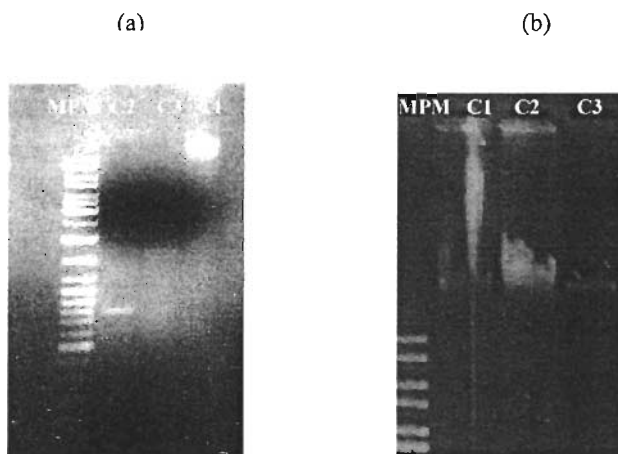


Figura 12 Purificación de DNA genómico de *S. peucetius* var. *caesius* (a) y de *S. coelicolor* (b). La pureza y concentración del DNA se corroboró por electroforesis en gel de agarosa al 1%. MPM= Marcador de peso molecular C1=DNA genómico concentrado, C2= dilución 1:10 del DNA genómico concentrado C3= dilución 1:100 del DNA genómico concentrado.

7.2 Amplificación del gen glucosa cinasa (*glk*) de *S. peucetius* var. *caesius* mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

Para amplificar el gen *glk* de *S. peucetius* var. *caesius*, se diseñaron varios pares de oligonucleótidos con base en la secuencia amino y carboxilo terminal de la proteína glucosa cinasa del mismo microorganismo, purificada anteriormente en el laboratorio (*Ive1* (fwd) e *Ive2* (rev)) (Imvriskova, 2000). Los oligonucleótidos *Lan1*, *Lan2*, *Sil1*, *Sil2*, *Tit1* y *Tit2* fueron diseñados con base en la secuencia de nucleótidos del gen *glkA* de *S. coelicolor* (Angell *et al.*, 1992).

Con base en el tamaño del gen *glk A* de *S. coelicolor*, el sitio de unión de los oligonucleótidos y la relativa similitud que presentan los extremos amino y carboxilo terminal de la Glk de *S. peucetius* var. *caesius* y *S. coelicolor* (Apéndice 9.3.2), se calculó el tamaño del fragmento amplificado (Figura 13).

Como punto de partida se consideraron los componentes y concentraciones que conforman los sistemas de reacción de la PCR utilizados en experimentos previos en el laboratorio (Tabla 5). Esto permitió diseñar la estrategia que aquí se presenta (Figura 14), para determinar las condiciones de amplificación de dicho gen.

Componente	Concentración final
Templado	100 ng
Oligonucleótido 1 (forward)	0.4 μ M
Oligonucleótido 2 (reverse)	0.4 μ M
Amortiguador de reacción 10 X	1x
Magnesio	1.5 mM
Mezcla de dNTP's	0.2 μ M
DMSO	10%
DNA polimerasa	1 Unidad

Tabla 5 Componentes de la reacción de PCR para amplificación de genes de *Streptomyces*

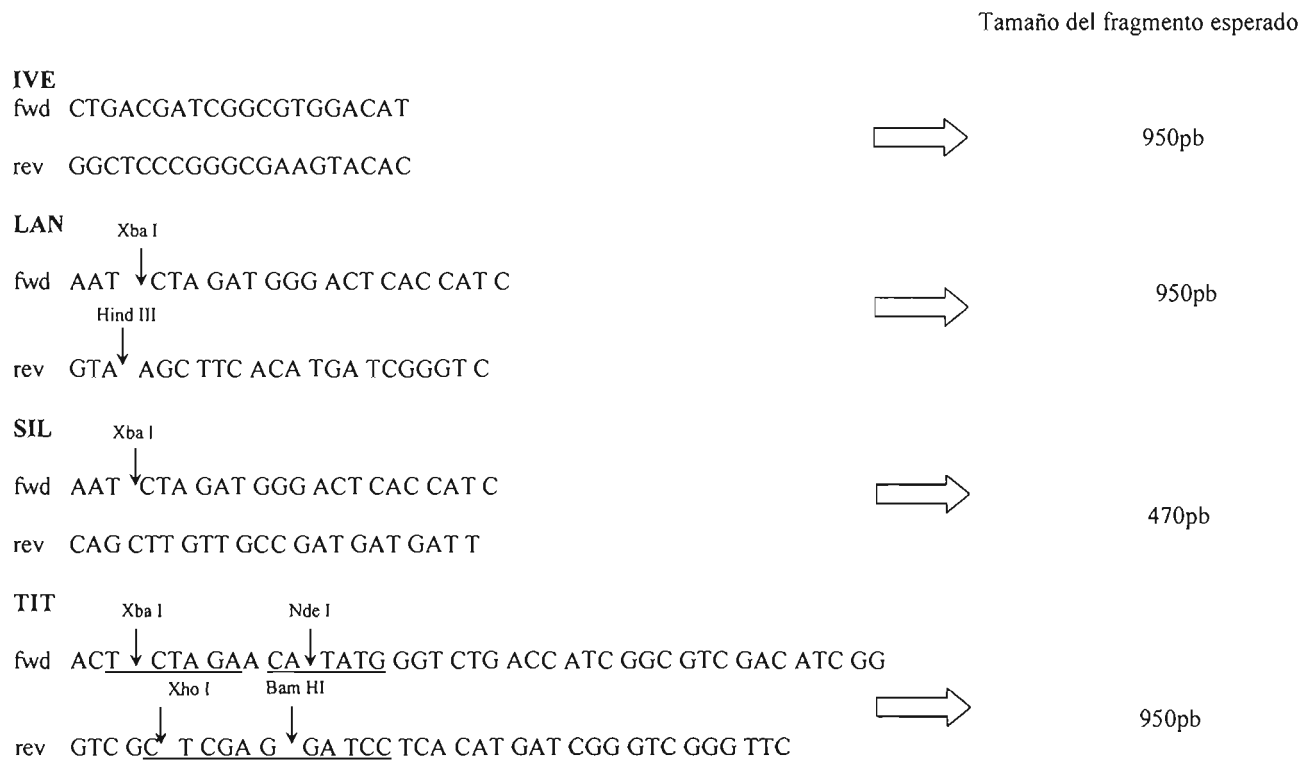


Figura 13 Tamaño de los fragmentos esperados de acuerdo a los oligonucleótidos utilizados

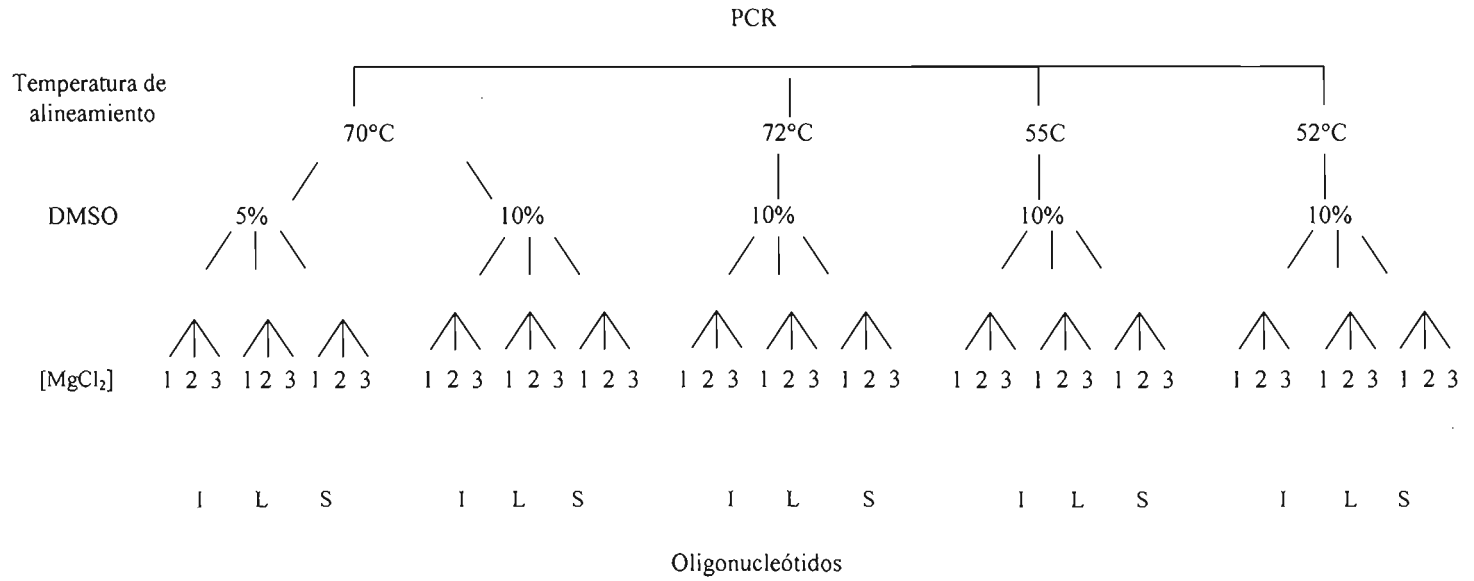


Figura 14 Estrategia de PCR

Para cada una de las temperaturas de alineamiento que se probaron para los oligonucleótidos *Sil*, *Ive*, *Lan* y *Tit*, los sistemas de reacción que se llevaron a cabo se describen a continuación en la Tabla 6:

	Solución madre	Concentración final	1x (µL)
dNTPs	1.25 mM	200 µM	8
amortiguador	10x	1X	5
DMSO	100%	5%	2.5
MgCl ₂	25 mM	1/2/3 mM	2/4/6 µL
DNA genómico <i>S. peuceitius</i> var. <i>caesius</i> 250 ng/µL			1
Fwd	20 µmol/mL	0.4 µmol/mL	1
Rev	21 µmol/mL	0.4 µmol/mL	1
Taq pol.	50U ¹ /mL	0.4	0.4
agua		Para 1/2/3 mM	29.1/27.1/25.1
		Volumen final	50 µL

Control positivo

	Concentración final	1x (µL)
DNA genómico <i>S. coelicolor</i> 150 ng/µL		2.5
MgCl ₂	1.5 mM	3
DMSO	10%	5
	agua	26.6

Oligonucleótidos: *Lan*, *Tit*

¹Una unidad se define como la cantidad de enzima que puede incorporar 10 nmoles de dNTPs (Manual de Applied Biosystems, AmpliTaq DNA polimerasa)

Tabla 6 Sistema de reacción para amplificar el gen *glk* de *S. peuceitius* var. *caesius*

Los sistemas de reacción se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µL. Cada experimento se llevó a cabo por duplicado.

Como control positivo (CL) se utilizó DNA genómico de *S. coelicolor* y los oligonucleótidos *Lan* (CL); posteriormente los oligonucleótidos *Lan* fueron sustituidos por los oligonucleótidos *Tit*, debido a que no se obtuvo la señal esperada con los oligonucleótidos anteriores.

7.3 Determinación de las condiciones óptimas para la amplificación del gen glucosa cinasa (*glk*) de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* por PCR.

Los sistemas de reacción descritos en la tabla 6 se sometieron a las siguientes condiciones de temperatura-tiempo, durante 30 ciclos: un precalentamiento a 94°C durante 5 minutos, 1 minuto para la desnaturalización a 94°C, 1 minuto para el alineamiento a 70°C (Figura 15, 16), 72°C (Figura 17), 55°C (Figura 18), 52°C (Figura 19); 1 minuto para la polimerización a 72°C y 5 minutos a 72°C para la extensión final. Se utilizó DMSO al 5 y 10% como mejorador de la reacción. Concluidos los ciclos, las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1%, obteniéndose los siguientes resultados:

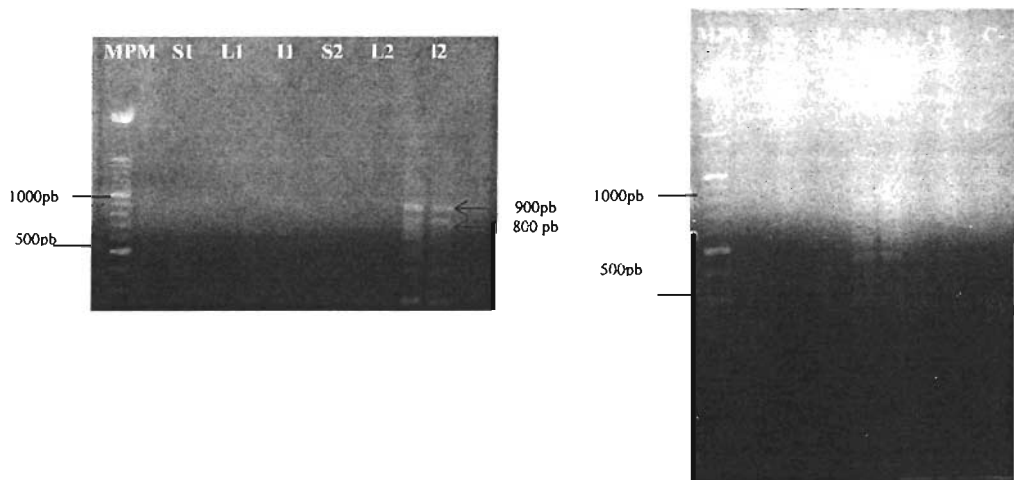


Figura 15 Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos amplificados por PCR a una temperatura de alineamiento de 70°C, utilizando DMSO al 5%. S, I y L corresponden a los oligonucleótidos *Sil*, *Ive* y *Lan*, respectivamente. Los números que acompañan a las letras S, I y L, indican la concentración de cloruro de magnesio utilizado en el experimento correspondiente. MPM= Marcador de peso molecular. CL=Control positivo. C=- Control negativo

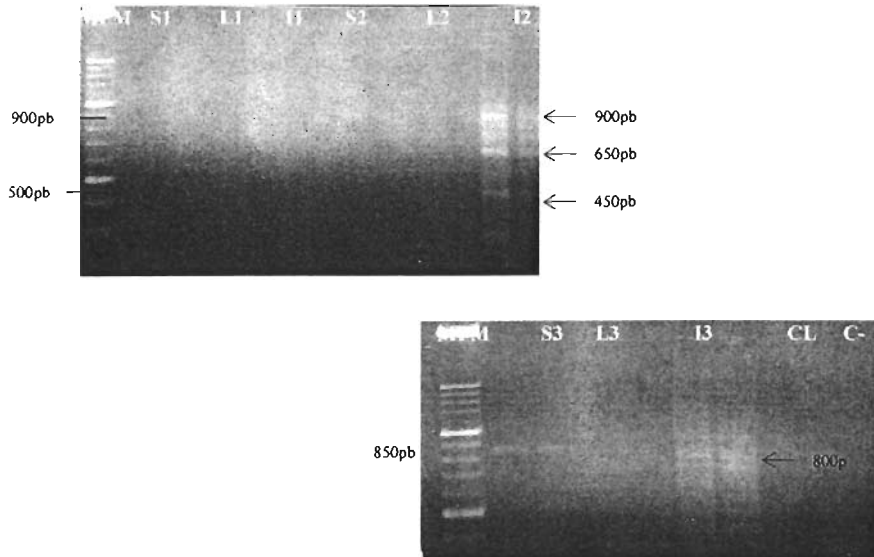


Figura 16 Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos amplificados por PCR a una temperatura de alineamiento de 70°C, utilizando DMSO al 10 %. S, I y L corresponden a los oligonucleótidos *Sil*, *Ive* y *Lan*, respectivamente. Los números que acompañan a las letras S, I y L, indican la concentración de cloruro de magnesio utilizado en el experimento correspondiente. MPM: Marcador de peso molecular. CL= Control positivo. C-= Control negativo

La primera temperatura de alineamiento que se probó fue 70°C, ya que es la temperatura de fusión promedio para los oligonucleótidos que nos proporcionó la casa comercial (Sigma Genosys para los oligonucleótidos *Sil* e *Ive* e Invitrogen para los oligonucleótidos *Lan*, además, ésta es lo suficientemente alta para minimizar las uniones inespecíficas que pudieran darse entre el oligonucleótido y alguna otra región del DNA genómico.

Como puede observarse en la figura 15 y 16, se obtuvieron bandas más definidas al utilizar una concentración final del mejorador (DMSO) al 10% que al 5%; esto puede deberse a que el mejorador esté ayudando a la DNA polimerasa a incorporar los desoxioligonucleótidos en lugares donde pudieran existir estructuras secundarias debido al alto contenido de G/C. A esta temperatura de alineamiento (70°C) y 10% de DMSO, se observa que con 1 mM de magnesio no hay amplificación alguna al utilizar los diferentes oligonucleótidos. Al utilizar los oligonucleótidos *Ive* a una concentración de magnesio de 2 mM, los fragmentos de DNA amplificados son más definidos, tienen pesos moleculares de 900, 650 y 450 pb.

Con los oligonucleótidos *Ive* a una concentración de cloruro de magnesio de 2 mM, se obtiene un fragmento de 900 pb que es de tamaño aproximado al esperado (Figura 13) independientemente del uso de 5 ó 10% de DMSO.

Con los oligonucleótidos *Sil*, 3 mM de magnesio y 10% de DMSO, se obtiene una banda de 850 pb que no corresponde con el tamaño esperado (Figura 13)

ya que el oligo reverso fue diseñado a partir de una secuencia de bases que se encuentra aproximadamente a la mitad del gen de *glk A* de *S. coelicolor*, por lo que se espera un fragmento de aproximadamente 470 pb. La banda de 850 pb indica que el oligo se está pegando a otra región del DNA.

Con el oligonucleótido *Lan* no se obtuvo fragmento alguno bajo las condiciones a las que se sometieron los demás oligonucleótidos.

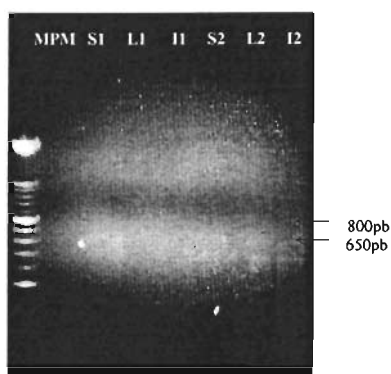


Figura 17 Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos amplificados por PCR a una temperatura de alineamiento de 72°C, utilizando DMSO al 10%. S, I y L corresponden a los oligonucleótidos *Sil*, *Ive* y *Lan*, respectivamente. Los números que acompañan a las letras S, I y L, indican la concentración de cloruro de magnesio utilizado en el experimento correspondiente. MPM: Marcador de peso molecular.

Debido a que se obtuvieron mejores resultados al utilizar 10% de DMSO, se decidió mantener fijo este parámetro para los siguientes experimentos.

Se utilizó una temperatura de alineamiento de 72°C debido a que el contenido de G+C tanto del oligonucleótido como del templado es alto (~72.12%) comparado con el de otros microorganismos.

De acuerdo con los resultados obtenidos, consideramos que esta temperatura de alineamiento es demasiado alta debido ya que no se obtuvo amplificado con ningún oligonucleótido. Casi no se alcanzaron a distinguir las bandas de 800 y 650 pb al utilizar el oligonucleótido *Ive* a una concentración 2 mM de magnesio. Esto puede deberse a que el oligonucleótido se encuentra en los límites de la temperatura de alineamiento. Algunos autores proponen que el rango de temperaturas de alineamiento esté entre 55°C y 70°C.

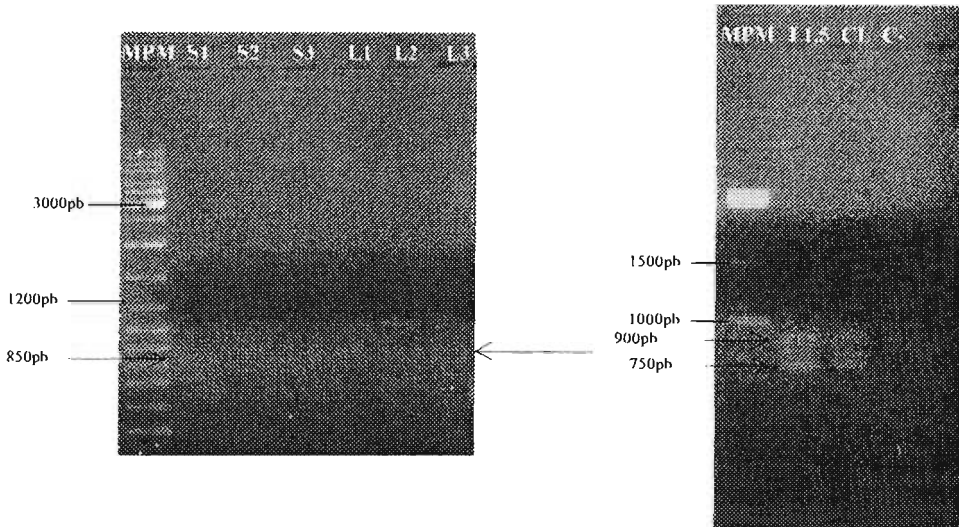


Figura 18 Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos amplificados por PCR a una temperatura de alineamiento de 55°C , utilizando DMSO al 10%. S, I y L corresponden a los oligonucleótidos *Sil*, *Ive* y *Lan*, respectivamente. Los números que acompañan a las letras S, I y L, indican la concentración de cloruro de magnesio utilizado en el experimento correspondiente. MPM: Marcador de peso molecular. CL= Control positivo. C- = Control negativo

Se decidió bajar la temperatura de alineamiento para ver como se comportaba el sistema, ya que en experimentos anteriores se obtuvieron bandas difusas ya sea porque la temperatura de alineamiento utilizada no es la adecuada o bien, por que se

está trabajando con una baja concentración de templado. Se asumió que al bajar esta temperatura, la amplificación fuera más inespecífica y por lo tanto se obtendría un mayor número de bandas, lo que nos hablaría de que se necesita trabajar con concentraciones más altas del templado.

A 55°C de temperatura de alineamiento, se obtuvieron bandas semejantes a las esperadas, una de 850 pb con los oligonucleótidos *Sil* a 1 mM de magnesio, una banda de 900 pb a 1 y 2 mM de magnesio con los oligonucleótidos *Lan* e *Ive* a 1.5 mM de magnesio, además de una banda de 750 pb, con los oligonucleótidos *Ive*.

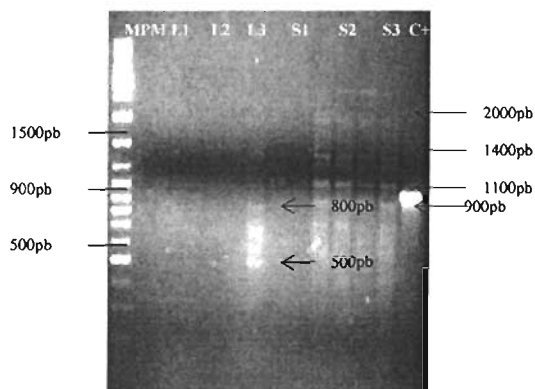


Figura 19 Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos amplificados por PCR a una temperatura de alineamiento de 52°C , utilizando DMSO al 10%. S, I y L corresponden a los oligonucleótidos *Sil*, *Ive* y *Lan*, respectivamente. Los números que acompañan a las letras S, I y L, indican la concentración de cloruro de magnesio utilizado en el experimento correspondiente. MPM: Marcador de peso molecular. CL= Control positivo C-= Control negativo

Al probar una temperatura de alineamiento de 52 °C, observamos que ningún oligonucleótido amplificó el fragmento del tamaño deseado, lo que hace suponer que dichos oligonucleótidos probablemente no se estén uniendo a la región de interés.

Debido a que sólo con los oligonucleótidos *Ive* obtuvimos una banda de tamaño aproximado al esperado al utilizar como templado DNA genómico de *S. peucetius* var. *caesius*, se hizo un PCR a gradiente de temperatura que comprendió de 53.2-68.1°C para determinar la mejor temperatura de amplificación del gen (Figura 20). Se utilizó el mismo sistema de reacción descrito en la tabla 6 y las mismas condiciones de temperatura-tiempo.

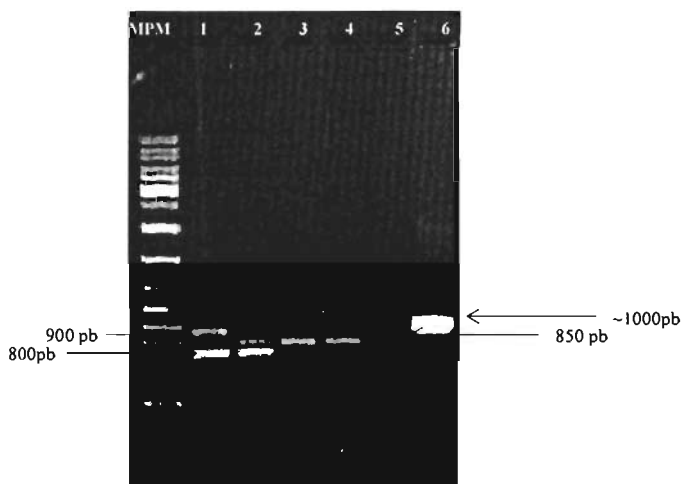


Figura 20 Electroforesis de la amplificación por PCR con gradiente de temperatura de alineamiento de 53.2-68.1°C utilizando los oligonucleótidos *Ive*, 1.5 mM de MgCl₂ y DMSO al 10%. 1)53.2°C, (2)58.1°C, (3)63.5°C, (4)68.1°C, (5)70.5°C, (6) 53.2°C (Control positivo), MPM: Marcador de peso molecular.

La electroforesis anterior nos mostró que se amplificaron dos bandas con pesos moleculares semejantes a los esperados. Un fragmento de 800 pb que apareció constante en el rango de temperatura de alineamiento entre 58.1-70.5°C, y una banda cercana a 850 pb que se amplificó a 68.1 °C. Estos fragmentos se clonaron en el plásmido pGEM-T-easy para su secuenciación, debido a que los oligonucleótidos *Ive* son siempre afines a esta región del DNA, y por ser los fragmentos de tamaño más próximo al esperado (Figura 13).

Para corroborar que el fragmento se encontraba dentro del vector, se llevó a cabo el análisis de restricción con la enzima *Eco RI* (Figura 21 y 23). Los fragmentos fueron secuenciados.

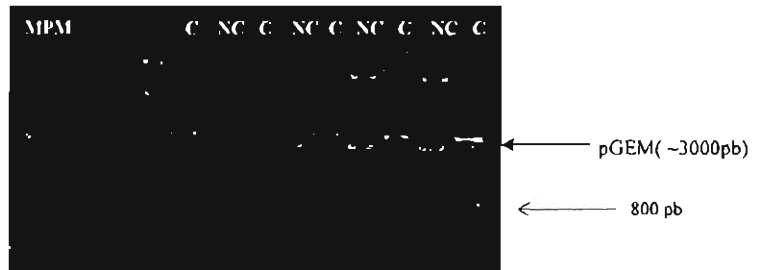


Figura 21. Restricción del plásmido pGEM-T-easy recombinante que contiene el inserto de 800 pb. C = plásmido cortado con *Eco RI*. NC = no cortado

El fragmento que en el gel de agarosa al 1% tenía un tamaño aproximado de 800pb, resultó ser de 846 pb al obtener su secuencia que es la siguiente:

```

ctgacgatcggcgtggacatcctgctcaccacggaactgacccgccgcatcggcaccgacg
D D R R G H P A H H G T D P P H R H R R
gctgacgctcggcgatccatggggcgactaggtgctcacccctcggccgatctcgtggc
A D A R R S M G R L G A H P R P D L A G
ccacacgcgtatcgccgccttcgtcgccgcggccctgctcatcacggtcttctcgtcgc
P H A Y R R L R R R G P A H H G L P A R
gttcgggtacacctcctggggcgtcgcatgctggggccgcccggagagcccggagacggc
V P V H L L G R R D A G R R R E P G D G
cgcgctgatggcgctacggctcggcggtgctcgtcggcgccctgggcccgtgctgacgn
R A D G R T A R A G V A R R L G R G V X
ttcggggcgnatgctnttcggcnctggcccgtggcgggcgnantngccgngtngccgc
F G R X X F G X W P V A G X X X R X X R
cctgttctcgtacggtnttcccccaagccgggntggagcgcgccaantcgtcgcggcg
P V P D G X S P T P G X E R A X S L A A
ctcaaggccttccccgcggatcctgggcggtctcgcactccacgacggagccctgatg
L K A F P A A I L G G L D S T T G A L M
ggcgccctgctcgtggcgctcacggagtccctggcgaccggctaccagagcgaactgacg
G G L L V G V T E S L A T G Y Q S E L S
ttcatggggcggggctcggcgacctggccccctatctcgtgatgacctgatcctgctc
F M G R G L G D L A P Y L V M T V I L L
atccggtccgcccggctgttcggcacgaaggagctcggcccgtgtctgaagcaccgctctc
I R S A G L F G T K E L A R V - S T R L
cgaagcggcgggtctccacggcgtccgctcggccgcccccgctccgcccggccaccaggtt
R S A G L H G V R V R R P R P P A T E V
cgccaccgcacgcgtacgtatggggcgccggcggtctcctcctgttctcctcctgcc
R H P H A Y V R M G R R R S P P V P P A
cttctacctggaccggttctggctccaggcgggctgttcgcgatgtccacgccgatcgt
L L P G P V L A P G G P V R D V H A D R
caga
Q

```

El punto isoeléctrico y el peso molecular teórico de la secuencia obtenida determinadas con el programa Compute pI/Mw disponible en <http://expasy.org>, fue de 11.96 y 30212.74 Da respectivamente.

Al realizar un análisis comparativo de la secuencia anterior, encontramos que posee identidad con proteínas de diversos microorganismos involucrados en el transporte de aminoácidos.

Presenta 65% (58/88 a.a) de identidad y 75% (67/88 a.a) de similitud con segmentos de aminoácidos de una proteína hipotética de 30.3 kDa (296 a.a) de *S. avermitilis* involucrada en el transporte de aminoácidos; y 57% (51/88 a.a) de similitud y 70% (63/88 a.a) de identidad con la proteína homóloga de 30.2 kDa (299 a.a.) de *S. coelicolor*.

En la figura 22 se muestra un alineamiento de las proteínas que presentan mayor homología con respecto a la secuencia obtenida. La región comprendida del aminoácido 128 al 215 de la secuencia de *S. peucetius* var. *caesius*, es la que presenta mayor identidad con otras proteínas homólogas de diferentes estreptomicetos.

Debido a la baja identidad que existe entre la secuencia obtenida para *S. peucetius* var. *caesius*, con respecto a las otras secuencias, no podemos afirmar que se amplificó un gen que codifica para una proteína involucrada en el transporte de aminoácidos.

avermitilis	MSTALDTVLNGLALGSVYALVALGFV I I FKASAVMNF AHGSLLLGGYLTAVLHDLRGFA	60
coelicolor	MTGFLOSLGGLALGSVYALIALGFVT I I FKASGVLS FTHGSLLLGGYLVAVLHDDLGFA	60
peucetius	-----DDRRGHPAHHG---TDPHRRHRAD	22
avermitilis	GALALAVLATAAAAGLI DWLLRRL--DPHAAHVLT I I LTIGVD I I LMTDLTRRIGGDLL	117
coelicolor	GALAVAVLVTAAVAGALDRVLVQRVGGSDPHAAHVQTI VTI IGV D I I LVTDLARRIGGDLL	120
peucetius	ARRSMGRGLGAHPRPDLAGPHAYRRLR--RRGPAHHGLPARVPVHLLGRRDAGRRR-----	75
avermitilis	TLGDPWGSVDVTELGPI TVADSR I ASI LVSLVVI AAVFAVFRFTSWGLSLRAAAEDHEAAA	177
coelicolor	PLGDPWGSAVTDLGPVTVADSR I AAI LVSAVA I GGA FALFRYTPWGLSLRAAAEDREAAA	180
peucetius	-----EPGDGRADG-----RTARAGVARRLGR-----	97
avermitilis	LMG IRLAR I RTLAWCLAG-ALAA LA AVFLAAFPAPGLERTTGQ I ALKAFPAAILGGMASP	236
coelicolor	LMGVRLTRVRTAAWCLAG-ALAA LA AVFLVAFPAPGLERTTGQ I ALKAFPAAILGGMTSP	239
peucetius	--GVXFGRXXFGXWPVAGXXXRXXRPVDPGXSP TPGXERAXSLAALKAFPAAILGGLDST	155
	128	
avermitilis	PGALAGSLLIGVTEALAGYQSELSALGEGFGDVPVYAVMVLVLLVLRPAGLFGTREAARV	296
coelicolor	VGALVGSMLIGLTEAFVAGYQSDLHVLGEGFGDVPVYAVMVLVLLVLRPAGLFAAKGAARV	299
peucetius	TGALMGGLLVGVTESLATGYQSELSFMGRGLGDLAPYL VMTVILLRSAGLFGTKELARV	215
avermitilis	-----	
coelicolor	-----	
peucetius	-STR LRSAGLHGVRVRRRPPATEVRH PHAYVRMGRRRSPVPPALLPGPV LAPGGPVRD	274
avermitilis	-----	
coelicolor	-----	
peucetius	VHADRQ	280

Figura 22 Alineamiento de diferentes proteínas hipotéticas del género *Streptomyces* involucradas en el transporte de aminoácidos. En negritas se muestran los aminoácidos de mayor homología.

Por otra parte, el análisis de restricción del plásmido recombinante que contiene al fragmento que en el gel de agarosa parece tener un tamaño de 850 pb, se muestra en la Figura 23 y la secuencia obtenida es la siguiente:

SSGRHGGRGNSILTIGVDIADATLIVGRTADARTGK LK PCLFIVPRDTPGFERRQI
 DMELHGAEKQFELTDDVVRVPADALVGDEDAGLLQLFAGLNPERVMTAAFAI
 GMGRYALSKALAYARERTVWREPIGTHQAI AHPLAQAHIDLELARLMTXKAA
 HLYDAGDDVXCRGGRXHG

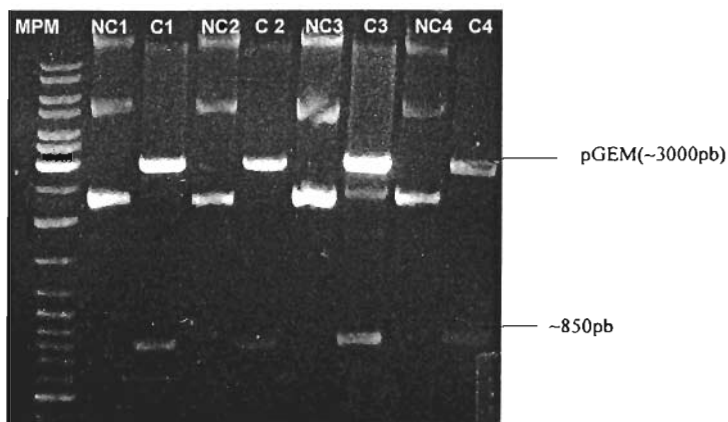


Figura 23 Restricción del plásmido pGem-T-easy recombinante que contiene el fragmento de 850 pb obtenido por PCR con los oligonucleótidos *Ive*. MPM = Marcador de peso molecular C= plásmido cortado con *Eco RI*. NC= plásmido no cortado.

Esta secuencia presenta identidad con la acil CoA deshidrogenasa (una enzima involucrada en la oxidación de ácidos grasos) de *S. avermitilis*, *S. coelicolor*, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* y *Alcaligenes bronchisepticus*.

El punto isoeléctrico y el peso molecular teórico de la secuencia obtenida fue de 6.36 y 19262.22 Da, respectivamente.

La secuencia anterior presenta mayor homología con la secuencia de dicha proteína de *S. avermitilis* y *S.coelicolor*. Al hacer un análisis por comparación de la secuencia de aminoácidos obtenida, revela un 84% (136/161 a.a) de identidad y un 91% (148/161 a.a) de similitud con una región de la proteína acil CoA

deshidrogenasa de 41.4 kDa (386 a.a) de *S. avermitilis* (clave de acceso en ExPasy Q82GN2) y 85% de identidad y 88% de similitud con la acil CoA deshidrogenasa de *S. coelicolor* de 41kDa (382 a.a) con clave de acceso en ExPasy Q9K3W2 (Figura 24).

<i>S. avermitilis</i>	MTRVIETEEHQALRSVAVALGKRYGREYLTRVVAEGDYPDELWSETAKLGYLGVNLPEAY	60
<i>S. coelicolor</i>	MTALIESEDHKS LRAAVSAFAQHP-----HTLDAEDSKRLWQDAAKLYIGVNLPEAY	54
<i>S. peucetius</i>	-----	
<i>S. avermitilis</i>	GGGGGGIAELSLVLEELGAAGCPLLMLVVS PAICGTVIARFGTEAQKQWLPGFADGSR	120
<i>S. coelicolor</i>	GGGGAGITELSLVLEELGAAGNPLMMIVSPAICGTVIARFGTEEQKREWLPPADGTRL	114
<i>S. peucetius</i>	-----	
<i>S. avermitilis</i>	MAFGITEPDAGSNHRITTTARRDGT--DWILSGRKVFISGVDIADATLVVGRTEADARTG	178
<i>S. coelicolor</i>	MAFGITEPDAGSNHRITTTARRDAATGDWILTGRKVFVSGVDIADATLVVGRTEADARTG	174
<i>S. peucetius</i>	-----SSGRHGGR-----GNSILTIQVDIADATLVVGRTEADARTG	35
<i>S. avermitilis</i>	RLKPCFLFIVPRDTDGFGRRPIDMELHGAEKQFELTDDVRLPADALVGDEDAGLLQLFAG	238
<i>S. coelicolor</i>	KLKPCFLFIVPRDAEGFERRPIDMELNAVERQFELTDDVRLPADALVGDEDAGLLQLFAG	234
<i>S. peucetius</i>	KLKPCFLFIVPRDTPGFERRQIDMELHGAEKQFELTDDVVRVPADALVGDEDAGLLQLFAG	95
<i>S. avermitilis</i>	LNPERVMTAAFAIQMGRFALSRAVEYARDSVWKQPIGAHQAIAPLAQAHIDLELARIM	298
<i>S. coelicolor</i>	LNPERVMTAAFGIQMGRYALSRAVDYARERTVWKTPIGAHQAIAPLAQAHIDLELARIM	294
<i>S. peucetius</i>	LNPERVMTAAFAIQMGRYALSALAYARERTVWREPIGTHQAIAPLAQAHIDLELARIM	155
<i>S. avermitilis</i>	MQKAAHLYDSGDDVAAGEAANMAKYAAGEACVKAVDQAVHTLGGNGLTREFGLASLITAS	358
<i>S. coelicolor</i>	MQKAAHLYDAGDDVAGEAANMAKYAAGEACVKAVDQAVHTLGGNGLTREYGLARLITAS	354
<i>S. peucetius</i>	TXKAAHLYDAGDDVX-----CRGG-----RXHG-----	178
<i>S. avermitilis</i>	RVARIAPVSREMILNYVSHQTLGLPKSY	386
<i>S. coelicolor</i>	RVARIAPVSREMILNYVSHQTLGLPKSY	382
<i>S. peucetius</i>	-----	

Figura 24 Alineamiento de la secuencia obtenida con diferentes acil-CoA deshidrogenasas de algunos *Streptomyces*. En negritas se muestran los aminoácidos que comparte la secuencia con otras proteínas homólogas de diferentes estreptomicetos.

En la literatura se encontró la secuencia de otros oligonucleótidos (*Tit*) que se utilizaron para amplificar el gen *glk A* de *S. coelicolor* y *S. lividans* (Marh, K et al, 2000). Estos se mandaron sintetizar para probar si lográbamos amplificar el gen homólogo en *S. peucetius* var. *caesius*.

El sistema de reacción y las condiciones de reacción fueron las mismas que se describen al principio de la sección 7.3. La temperatura de alineamiento fue de 70°C. Como control positivo se utilizó DNA genómico de *S. coelicolor*, ya que la literatura señala que con estos oligonucleótidos se obtiene una banda de 981 pb que corresponde al gen *glk A* (Marh, et al, 2000).

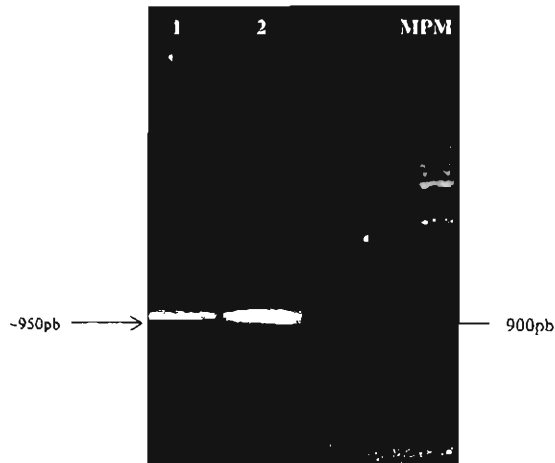


Figura 25 Electroforesis en gel de agarosa al 1% que muestra la amplificación del gen *glk* de *S. peucetius* var. *caesius* (carril 1) y *S. coelicolor* (carril 2) con los oligonucleótidos *Tit* a una temperatura de alineamiento de 70°C, utilizando DMSO al 10%. MPM= Marcador de peso molecular.

Bajo estas condiciones se amplificó un fragmento cercano a 1000 pb que corresponde al tamaño esperado (Figura 13) y fue del mismo peso molecular que el control positivo, sólo que la banda resultó un poco menos intensa, probablemente porque la reacción requiere de más templado para que mejore el rendimiento o porque no es tan específico. Una vez obtenido el fragmento de interés, éste se purificó y se secuenció. El fragmento de DNA consta de 945 pb que corresponden a 314 a.a, la secuencia se muestra en la figura 26. Posteriormente el fragmento amplificado se clonó en el plásmido pGEM-T-easy y se llevó a cabo un análisis de restricción para corroborar que las clonas tuvieran al plásmido recombinante (Figura 27).

accatcggcgctcgacatcggcggcacgaagatcgcggccgggggtggtcgacgaggaaggc
 T I G V D I G G T K I A A G V V D E E G
 aacatcctctcgaccttcaaggtgccgactccgaccaagccgcaggcgatcgtaggacggg
 N I L S T F K V P T P T T P Q A I V D A
 atcgcccgggcgcgtaggggtgccagggccgggacagagatcgtagggcgtgggcatcggt
 I A A A V E G A R A G H E I V G V G I G
 gccgccgatacgtcaaccggcagcgtccacggtctatctcgccgaacatcgactgg
 A A G Y V N R Q R S T V Y F A P N I D W
 cggcaggagcctctcaaggaagaggtcgaggccccgggtgggctgccggtcgtaggtagg
 R Q E P L K E E V E A R V G L P V V V E
 aacgacgcgaacgcggctgcctggggcagtagacaagttcggcggggcaagggccaccgc
 N D A N A A A W G E Y K F G A G K G H R
 aacgccatctgcatcacgctgggtacgggctggggcgggcatcatcatcggcaacaag
 N A I C I T L G T G L G G G I I I G N K
 ctgcccggggcacttcggggctgccgcccaggttcgggacacatccggatgggtccggac
 L R R G H F G V A A E F G H I R M V P D
 gggctgctgtagcgtcggttcccagggtgctgggagcagtagcgcgtccggtagcggg
 G L L C G C G S Q G C W E Q Y A S G R A
 ctcgtagcggtagcgaagcagcgggccaacgcgacccccggagaacgcggacatcctgctc
 L V R Y A K Q R A N A T P E N A D I L L
 tcactgggtgacggcaccgacggcatcgagggaagcacatcctcgatggccgtagcggg
 S L G D G T P D G I E G K H I S M A A R
 cagggggacccggtcgcggtggactcgtaccgcgagctggccccgctggggggggccggt
 Q G D P V A V D S Y R E L A R W A G A G
 ctcgcccagcctggcctctctcttcgacccccctccgcttcacatcgtaggggggggctctcg
 L A D L A S L F D P S A F I V G G G L S
 gacgagggggagttggtcctcgaccgatccgcaagtcgtacaagcggtaggctgtagcga
 D E G E L V L D P I R K S Y K R W L V G
 gggaaactggcgtcccgtcgccgacgtgatcgctgcgaggctgggcaacgacgaggcctg
 G N W R P V A D V I A A R L G N D A G L
 gtaggagcggccgacctggctcgagaacccgacccgatcatgtga
 V G A A D L A R E P D P I M -

Figura 26 Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del fragmento de aproximadamente 1000 pb que corresponde a glucosa cinasa de *S. peuceletius* var. *caesus*.

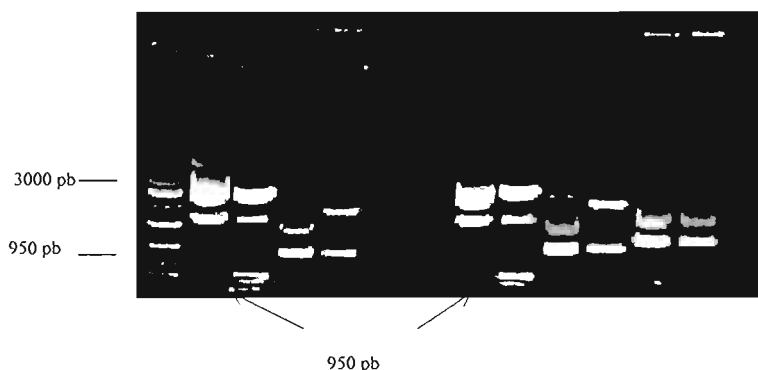


Figura 27 Análisis de restricción del plásmido pGem-T-easy recombinante que contiene la banda de 950 pb obtenida por PCR con los oligonucleótidos *Tit*

El punto isoeléctrico y el peso molecular teórico de la secuencia obtenida, calculada con el programa Compute pI/Mw fue de 5.34 y 32745.07 Da, respectivamente. Mientras que el punto isoeléctrico y peso molecular de la Glk purificada por Imriskova fue de 8.4 y 30961.4 ± 1.5 Da. La diferencia en el pI puede deberse a la diferencia metodológica para determinar los parámetros. Imriskova determinó el pI con el equipo Phastsystem (Pharmacia), utilizando placas de isoelectroenfoque con un gradiente de pH 3-9 y el peso molecular lo determinó por espectrometría de masas. Por otro lado, el programa Compute pI/Mw, calcula el pI utilizando los valores de pK de los aminoácidos, los cuales son definidos examinando la migración del polipéptido en un gradiente de pH entre 4.5-7.3 con urea de 9.2-9.8M entre 15-25°C.

El peso molecular es calculado por el promedio de las masas isotópicas de los aminoácidos de la proteína y el promedio de la masa isotópica de una molécula de agua.

Un análisis comparativo entre la secuencia de nucleótidos anterior con la base de datos del Centro de Información Biotecnológica (NCBI), mostró un 90% de identidad con el gen de la glucosa cinasa (*glk*) de *S. avermitilis*, y 87% de identidad con el gen *glk* de *S. lividans* y 87% de identidad con el gen *glk A* de *S. coelicolor*.

Este gen presenta un contenido de G/C del 70%, lo cual es típico para el género *Streptomyces*.

La comparación de la secuencia de aminoácidos con la base de datos del NCBI muestra un 84% de identidad y un 86% de similitud con la *glk* de *S. avermitilis*; 82% de identidad y 86% de similitud con la *glk* de *S. coelicolor* y 41% de identidad y 61% de similitud con la *glk* de *S. griseus*.

19

S. coelicolor -----MGLTIGVDIGGTKIAAGVVDEEGNILS 27
S. avermitilis -----MGLTIGVDIGGTKIAAGVVDEEGNILS 27
S. peucetius -----TIGVDIGGTKIAAGVVDEEGNILS 24
S. griseus MSTYRDFAHRSARATVLKTVGTERRSHLTAPRVPTVGIDIGGTKVMAGVVADGNILE 60

S. coelicolor THKVPTP---TTPEAIVDAIASAVEGARVG---HEIVAVGIGAAGYVNRQRSTVYFAPN 80
S. avermitilis TFKVPTP---TTPQAIVDIAAAVEGARAG---HEIVGVGIGAAGYVNRQRSTVYFAPN 80
S. peucetius TFKVPTP---TTPQAIVDIAAAVEGARAG---HEIVGVGIGAAGYVNRQRSTVYFAPN 77
S. griseus QLRTEPTDKSKSPKVVEDTIVELVLDLSDR---HDVHALGIGAAGVWDADRSKVLFAPH116

S. coelicolor IDWR-QEPLKEKVEARVGLPVVVENDANAAAAGGEYKFGGGKGRNVICITLGTGLGGGII 139
S. avermitilis IHWR-QEPLKDEVEARVGLPVVVENDANAAAAGGEYKFGAGKGRNVICITLGTGLGGGII 139
S. peucetius IDWR-QEPLKEEVEARVGLPVVVENDANAAAAGGEYKFGAGKGRNNAICITLGTGLGGGII 136
S. griseus LAWR-DEPLRDAIASRLVVPVMVDNDANTAANAWEWRFGAGRGEDHLVMITLGTGIGGAIL 175

S. coelicolor IGNKLRRGHFGVAAEFGHIRMVPD-GLLCGCGSQGCWEQYASGRALVRYAKQRANATPER 198
S. avermitilis IGNKLRRGHFGVAAEFGHIRMVPD-GLLCGCGSQGCWEQYASGRALVRYAKQRANATPEN 198
S. peucetius IGNKLRRGHFGVAAEFGHIRMVPD-GLLCGCGSQGCWEQYASGRALVRYAKQRANATPEN 195
S. griseus EDGQVKRGKYGVAGEFGHMVQVPS-GHRCPCGNRGCWEQYSSGNALVREARELAAADSPV 234

S. coelicolor AEVLLALGDGTPDGIIEGKHISVAARQGPCVAVDSYRELARWAGAGLADLASLFDPSAFIV 258
S. avermitilis AEVLLALNGTDPDGIIEGKHI SVAARQGDPAVAVDSYRELARWAGAGLADLASLFDPSAFIV 258
S. peucetius ADILLSLGDGTPDGIIEGKHISMAARQGDPAVAVDSYRELARWAGAGLADLASLFDPSAFIV 255
S. griseus AHYLLDRVKGNAVADITGPLITELAREGDAMCIELLQDIGNQWLGIGIANLAAALDPSCFVI 294

307

S. coelicolor GGGLSDEGLVLDPIRKS YKRWL VGGNWRPVADVIAAQLGNKAGLVGAADLAREPDPIM- 317
S. avermitilis GGGLSDEGLVLDPIRKS YKRWL VGGNWRPVADVIAAQLGNKAGLVGAADLAREPDPIM- 317
S. peucetius GGGLSDEGLVLDPIRKS YKRWL VGGNWRPVADVIAARLGNAGLVGAADLAREPDPIM- 314
S. griseus GGGVSAADDLLINPARDAFKRHLTGRGRPEARIAKAQLGPEAGMVGAADLARLVARRFR 354

S. coelicolor -----
S. avermitilis -----
S. peucetius -----
S. griseus RANRRRVERYERYAQIYDQAASTIRNTRSTRAD 388

Figura 28 Alineamiento de diferentes glucosa cinasas de diferentes *Streptomyces*. En negritas se muestra el sitio de unión a ATP.

El polipéptido muestra dominios conservados similares a la proteína Nag C de *E. coli* que forma parte de una familia de proteínas, conocida como la familia ROK (*represor, orf, kinase*) que incluye diversas fructosa/glucosa-cinasas y reguladores transcripcionales. (Plumbridge, J., 2001)

A diferencia de la secuencia amino terminal de la Glk de *S. peucetius* var. *caesius* reportada anteriormente (Imriskova, et al., 2001), la secuencia obtenida en este trabajo contiene completa la secuencia de unión al ATP (DIGGT) (Figura 29).

			19
<i>S. peucetius</i> var <i>caesius</i> (a):	-NH ₂	MGLTIGVDIG	---AAGVPD
<i>S. coelicolor</i> (c):	-NH ₂	MGLTIGVDIGG	KIAAGVVD
<i>S. peucetius</i> var <i>caesius</i> (b):	-NH ₂	TIGVDIGG	KIAAGVVD
<i>S. peucetius</i> var <i>caesius</i> (a):	-COOH	VYFA	REPPIM
<i>S. coelicolor</i> (c):	-COOH	ADLA	REPPIM
<i>S. peucetius</i> var <i>caesius</i> (b):	-COOH	ADLA	REPPIM

Figura 29 Comparación de la secuencia de aminoácidos del extremo amino y carboxilo terminal de la glucosa cinasa obtenida por Imriskova (a), Mascareñas (b) para *S. peucetius* var. *caesius*, comparándola con la de *S.coelicolor* (c).

Las secuencias NH₂ y COOH terminal para *S. peucetius* var. *caesius* obtenidas en este trabajo no fueron idénticas a las reportadas (Imvriskova, et al., 2001). Existe diferencia en una Valina (V) en el extremo NH₂-terminal, en la posición 19. Y en el extremo COOH-terminal, hay un cambio de los aminoácidos

Valina, Tirosina y Fenilalanina en las posiciones 307 a 309 por, Alanina, Asparagina y Leucina.

En la Figura 28 se muestran los alineamientos de las secuencias de aminoácidos de la glucosa cinasa de algunas especies representativas del género *Streptomyces*, en donde se observan los aminoácidos que se conservan en las posiciones antes señaladas.

La diferencia en los aminoácidos en las posiciones señaladas, así como los diferencias en punto isoeléctrico y peso molecular, podrían hacernos pensar la existencia de otra glucosa cinasa para *S. peucetius* var. *caesius*; más aún si consideramos el reciente descubrimiento de isoformas de esta enzima (datos no publicados).

Para determinar la temperatura de alineamiento óptima para amplificar el gen *glk* de *S. peucetius* var. *caesius* con los oligonucleótidos *Tit*, se llevó a cabo un PCR a gradiente de temperatura de alineamiento que comprende de 53.2-70.5°C. Se utilizó el mismo sistema de reacción descrito en la tabla 6 y las mismas condiciones de temperatura-tiempo. Como control positivo se utilizó DNA genómico de *S. coelicolor* (carril 1).

Según se puede apreciar en la figura 30, la temperatura de alineamiento óptima para amplificar el gen *glk* de *S. peucetius* var. *caesius* fue a 68.1°C, debido a que esta temperatura la banda de ~1000 pb resultó más intensa y los fragmentos de menor tamaño, no fueron tan evidentes.

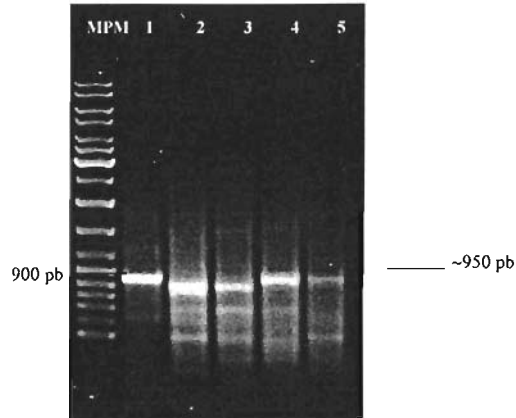


Figura 30 Electroforesis de los productos amplificados por PCR con los oligonucleótidos *Tit* a diferentes temperaturas de alineamiento utilizando DMSO al 10%. (1) 53.1°C (CL) (2) 53.1°C (3) 63.5°C (4) 68.1°C (5)

En la tabla 7 se resume el tamaño de las bandas obtenidas bajo las diferentes condiciones de acuerdo a la estrategia planteada.

5% DMSO

Oligonucleótido	Sil (S)			Lan (L)			Ive (I)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Mg ₂ Cl (mM)	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Ta=70°C	-	-	-	-	-	-	-	~900, ~ 800 pb	~450 pb

10% DMSO

Oligonucleótido	Sil (S)			Lan (L)			Ive (I)			Tit (T)
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	2
Mg ₂ Cl (mM)	1	2	3	1	2	3	1	2	3	2
Ta=70°C	-	-	~850 pb	-	-	-	-	~900 pb, ~650 pb, ~450 pb	~800 pb	~1000 pb
Ta=72°C	-	-	-	-	-	-	-	~800pb, ~650pb	-	
Ta=55°C	~850 pb	-	-	~900 pb	~900 pb					
Ta=52°C	-	~2000 pb, ~1400 pb, ~1100 pb, ~ 900 pb	2000 pb, 1400 pb, 1100 pb, 900 pb	-	-	~800pb, ~300 pb				

Ta= Temperatura de alineamiento

Tabla 7. Tamaño de las bandas obtenidas bajo las diferentes condiciones de amplificación.

8 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

1. El gen donde se encuentra codificada la enzima glucosa cinasa de *S. peucetius* var. *caesius* se logró amplificar al utilizar los oligonucleótidos "Tit", DMSO al 10%, 2mM de MgCl₂ y 250 ng de DNA genómico, al completarse 30 ciclos de 94°C-1 min/70°C-1min/72°C-1min con un precalentamiento a 94°C por 5 minutos y una extensión final a 72°C durante 5 minutos.

2. Se amplificó un fragmento de 945 pb que corresponden a 314 a.a. El punto isoeléctrico y el peso molecular teórico de la secuencia obtenida fue de 5.34 y 32745.07 Da, respectivamente.

3. La secuencia presenta un 90% de identidad con el gen de la glucosa cinasa (*glk*) de *S. avermitilis*, 87% de identidad con el gen *glk* de *Streptomyces lividans* y 87% de identidad con el gen *glk A* de *S. coelicolor*.

4. La secuencia de aminoácidos muestra un 84% de identidad y un 86% de similitud con la *glk* de *S. avermitilis*; 82% de identidad y 86% de similitud con la *glk* de *S. coelicolor* y 41% de identidad y 61% de similitud con la *glk* de *S. griseus*.

5. A diferencia de la secuencia amino terminal de la Glk de *S. peucetius* var. *caesius* que reportaron Imriskova y colaboradores (Imriskova, et al., 2001), la secuencia obtenida en este trabajo contiene completa la secuencia de unión al ATP (DIGGT).

Como perspectivas se propone:

- Interrumpir el gen *glk* de *S. peucetius* var. *caesius* para obtener cepas recombinantes *glk*⁻.
- Evaluar el efecto de la interrupción del gen *glk* en la represión catabólica por carbono, así como su papel en la sensibilidad a la represión por glucosa en *S. peucetius* var. *caesius*
- Evaluar el efecto de la sobreexpresión del gen *glk*
- Determinar como influye la región *SCO2127* sobre el gen *glk*

9 Apéndices

9.1 Apéndice 1

9.1.1 Medios de cultivo y soluciones

Medio Luria Bertani

	g/L
Triptona	10.0
Extracto de levadura	5.0
Cloruro de Sodio	5.0
Agar	7.5
pH	7.0

Medio YMG

	g/L
Extracto de levadura	4.0
Extracto de malta	10.0
Glucosa	4.0
pH	7.2

Solución de elementos traza

	g/L
Sulfato de Zinc	1.0
Sulfato ferroso	1.0
Cloruro de manganeso	1.0
Cloruro de calcio anhidro	1.0

Amortiguador P

	g/L
Sacarosa	1.0300
Sulfato de potasio	0.0025
Cloruro de Magnesio	0.0202
mL de elementos traza	0.0200 mL

Solución A

	Concentración
Glucosa	50mM
Tris-ácido clorhídrico	25mM
EDTA pH 8	10mM

Solución B

	Concentración
Hidróxido de sodio	0.2 M
SDS	1%

Solución C

Acetato de potasio 3 M pH 4.8

9.2 Apéndice 2

9.2.1 Preservación de *S. peucetius* var. *caesius* en glicerol al 10%

De la cepa por preservar, se inocularon 200 μ L en medio YMG con glicerol al 10% (40 mL) y el cultivo se incubó durante 48 h a 30°C y agitación de 200 rpm. Las células fueron recuperadas por centrifugación a 10 000 rpm durante 10 min, lavadas dos veces con solución salina isotónica (SSI) y resuspendidas en 10 mL de esta solución.

Del cultivo anterior, se utilizó 1 mL para inocular 40 mL de medio YMG contenido en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. El cultivo fue incubado a 30°C con agitación de 200 rpm durante 48 h. De nuevo, las células fueron recuperadas por centrifugación a 10 000 rpm durante 10 min, lavadas dos veces con SSI y resuspendidas en 6 mL de SSI adicionales y 4 mL de glicerol 100%. Se hacen alícuotas de 1 mL y se congelan a -70°C.

9.2.2 Preparación de células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α

Dos matraces con 500 mL de medio LB se inocularon en proporción 1/100 (cultivo/volumen de medio), con un cultivo de *E. coli* DH5 α crecido durante toda la noche. Las células se incubaron a 37°C y 200 rpm hasta tener una absorbancia a 600 nm entre 0.5 y 0.7. Una vez alcanzada esta densidad óptica el cultivo se conservó en hielo entre 15-30 min, se centrifugó a 10 000 rpm por 15 min, en un rotor previamente enfriado. Se removió el sobrenadante completamente y se

resuspendieron los botones en un volumen final de 1 L de agua miliQ fría. El paso anterior se repitió dos veces, sólo que en la primera ocasión, el botón fue resuspendido en 0.5 L de agua miliQ fría y en la segunda ocasión, en 20 mL de glicerol al 10% frío. Esta suspensión se centrifugó bajo las mismas condiciones, el sobrenadante fue removido y el botón resuspendido en un volumen final de 2-3 mL de glicerol al 10%. De la suspensión anterior se prepararon alícuotas de 50 μ L y se conservaron a -70°C .

Se electroporaron 50 μ L de estas células con un plásmido de concentración conocida, se plaquearon 1, 10 y 100 μ L en medio LB y se incubaron a 29°C por 16 h. Se calcula que la eficiencia de transformación fue mayor de 1×10^9 UFC/mL/ μ g de DNA.

9.2.3 Electroporación de células competentes de *E. coli* DH5 α

Se colocaron 2 μ L de la reacción de ligación más 50 μ L de células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α en una celda fría de 0.1 mm. La celda se colocó en la ranura del electroporador y se le dió una descarga de 1250 V, inmediatamente después se le adicionó 1mL de medio LB más glucosa al 1% , las células transformadas se incubaron a 37°C por 1 h a 200 rpm. Posteriormente, de la suspensión celular se plaquearon, 1, 5 y 10 μ L en medio LB y se incubaron a 29°C por 16 h.

9.3 Apéndice 3

9.3.1 Secuencia del gen *glk* de *S. coelicolor* en donde se muestran los sitios de unión de los diferentes oligonucleótidos probados para amplificar el gen *glk*.

	Sil	Lan	Tit	Ivc
	<u>atgggactcaccatcggcgctcgacatcgg</u>			
	M G L T I G V D I G G T K I A A G V V D			
	gaggaaggcaacatcctctcgacccacaagtgccgacccccaccacacccgaggccatc			120
	E E G N I L S T H K V P T P T T P E A I			
	gtggacgccatcgcctccgcggtcgaggggcgcgagtggggacagagatcgctcgagtg			180
	V D A I A S A V E G A R V G H E I V A V			
	ggcatcggcgccgcggaatcgtcaaccgacgctccacggctactctcgcgcccaac			240
	G I G A A G Y V N R Q R S T V Y F A P N			
	atcgactggcgccaggagccgctcaaggagaaggtcgaggcccgctcgccctcccggtc			300
	I D W R Q E P L K E K V E A R V G L P V			
	gtcgtggagaacgacgccaacgcccggcctggggcgagtagaactcggccacatcggcag			360
	V V E N D A N A A A W G E Y K F G G G K			
	ggccaccgcaacgtcatctgcatcaccctcggcaccggcctcggcgggcgcatcatcatc			420
	G H R N V I C I T L G T G L G G I I I			
	<u>ggcaacaagctgvcgcccggcactcggcgctggcggagttcggccacatcggcatg</u>			480
	G N K L R R G H F G V A A E F G H I R M			
	gtgccggacggcctgctgtgctggctcggcctcgcagggtgctgggagcagtagcgcgctg			540
	V P D G L L C G C G S Q G C W E Q Y A S			
	ggcgggcgctggtaggtagcgaagcagcgcccaacgcccaacccccgagcgcgccgag			600
	G R A L V R Y A K Q R A N A T P E R A E			
	gtgctgctcgccctcggcgacggcaccgccagcgcatcgagggcaagcacatctcggtc			660
	V L L A L G D G T P D G I E G K H I S V			
	gccgcccagggctgccgggtcggcgtcgactcctaccgggagctggcccgtggcc			720
	A A R Q G C P V A V D S Y R E L A R W A			
	ggggccggtctcggcgacctggcctcgtctctcgacccgctccgcttcatcgtcgggcg			780
	G A G L A D L A S L F D P S A F I V G G			
	ggcctctcggacgagggcactggctcctcgaccgatcggcaagtcctacaagcgctgg			840
	G L S D E G D L V L D P I R K S Y K R W			
	ctggtcggcgcaactggcgccggctcgccgacgtgatcgccgccaactcggcaacaag			900
	L V G G N W R P V A D V I A A Q L G N K			
	gccggcctggtcggcgccgacctggcgagagaccggaaccgatcactgtagc			960
	A G L V G A A D L A R E P D P I M - R S			

Los oligonucleótidos *Lan1*, *Lan2*, *Sil1*, *Sil2*, *Tit1* y *Tit2* fueron diseñados con base en la secuencia de nucleótidos del gen *glk* de *S. coelicolor*.

Los oligonucleótidos *Ive1* e *Ive2* fueron diseñados según la secuencia amino y carboxilo terminal de la proteína de *S. peucetius* var. *caesius* que se purificó en el laboratorio. El oligonucleótido *Ive1* se diseñó con base en la secuencia que comparte con *S. coelicolor*, y el oligonucleótido *Ive2* se diseñó con base en la secuencia que no comparte con este microorganismo.

9.3.2 Secuencias amino y carboxilo de las proteínas glucosa cinasa (Glc) de *S. coelicolor* y *S. peucetius* var. *caesius*

S. coelicolor

-NH₂ M G L T I G V D I G G T K I A A

S. peucetius var. *caesius*

-NH₂ M G L T I G V D I G A A G V P D

S. coelicolor

-COOH A D L A R E P D P I M

S. peucetius var. *caesius*

-COOH V Y F A R E P D P I M

9.4 Apéndice 4

9.4.1 Secuencia del gen *glk* de *Streptomyces peucetius* var. *caesius*

[Limits](#) [Preview/Index](#) [History](#) [Clipboard](#) [Details](#)

 Range: from to Reverse complemented strand
 Features: SNP CDD MGC

1: [AY651851](#). Reports *Streptomyces* peuc...[gi:50263005] [Links](#)
 LOCUS AY651851 954 bp DNA linear BCT 19-JUL-2004
 DEFINITION *Streptomyces peucetius* subsp. *caesius* glucose kinase (*glk*) gene, complete cds.
 ACCESSION AY651851
 VERSION AY651851.1 GI:50263005
 KEYWORDS .
 SOURCE *Streptomyces peucetius* subsp. *Caesius*

 ORGANISM *Streptomyces peucetius* subsp. *caesius*
 Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales;
 Streptomycineae; Streptomycetaceae; *Streptomyces*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 954)
 AUTHORS Ramos, I., Guzman, S., Escalante, L., Imriskova, I.,
 Rodriguez-Sanoja, R., Sanchez, S. and Langley, E.
 TITLE Glucose kinase alone cannot be responsible for carbon source
 regulation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*
 JOURNAL Res. Microbiol. 155 (4), 267-274 (2004)
 PUBMED 15142624
 REFERENCE 2 (bases 1 to 954)
 AUTHORS Langley, E., Mascarenas, N.A., Ruiz, B. and Sanchez, S.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (11-JUN-2004) Molecular Biology and Biotechnology,
 Instituto de Investigaciones Biomedicas, Universidad Nacional
 Autonoma de Mexico, Circuito Escolar s/n, Ciudad Universitaria,
 DF 04510, Mexico

 FEATURES Location/Qualifiers

```

source          1..954
                 /organism="Streptomyces peucetius subsp. caesius"
                 /mol_type="genomic DNA"
                 /sub_species="caesius"
                 /db_xref="taxon:55158"
gene            1..954
                 /gene="glk"
CDS             1..954
                 /gene="glk"
                 /note="Glk"
                 /codon_start=1
                 /transl_table=11
                 /product="glucose kinase"
                 /protein_id="AAT72898.1"
                 /db_xref="GI:50263006"

/translation="MGLTIGVDIGGTKIAAGVVDEEGNILSTFKVPTPTTPQAIVDAI
AAVEGARAGHEIVGVGIGAAGYVNRQRSTVYFAPNIDWRQEPLEEVEARVGLPVVV
  ENDANAAAWGEYKFGAGKGRNVICITLGTGLGGGIIIGNKLRRGHFGVAAEFGHIRM
  VPDGLLCCGCSQGCWEQYASGRALVRYAKQRANATPENADILLSLDGTPDGI EGKHS
  MAARQGDVPVAVDSYRELARWAGLADLASLFDPSAFIVGGGLSDEGELVLDPIRKS
  YKRWLVGGNWRPVADVIAARLGNDAGLVGAADLAREPDPIM"

ORIGIN
1  atgggactca ccatcggcgt cgacatcggc ggcacgaaga tcgcgccgg ggtggtcgac
61  gaggaaggca acatcctctc gaccttcaag gtgccgactc cgaccacgcc gcaggcgatc
121  gtggacgcga tcgccgcggc cgtcgagggt gccagggccg ggcacgagat cgtcggcggt
181  ggcatecggg cgcgccgata cgtcaaccgg cagcgctcca cggctctatt cgcgccgaac
241  atcgactggc ggcaggagcc tctcaaggaa gaggtcgagg cccgggtggg cctgccggtc
301  gtggtcgaga acgacgcgaa cgcgctgcc tggggcgagt acaagttcgg cgcgggcaag
361  ggccaccgca acgtcatctg catcacgctg ggtacgggcc tggggcgggc catcatcatc
421  ggcaacaagc tgcgccggg gcacttcggg gtcgccggc agttcgggca catccggatg
481  gttccggacg ggctgctgtg cggctgcggt tcccagggt gctgggagca gtacgcgtcc
541  ggtcgccgcg tcgtccggtg cgcgaagcag cgggccaacg cgaccccgga gaacgcggac
601  atcctgctct cactgggtga cggcacgcc gacggcatcg agggcaagca catctcgatg
661  gccgcgcggc agggggaccc ggtcgcggtg gactcgtacc gcgagctggc ccgctggggc
721  ggggccggtc tcgccgacct ggctctctc ttcgaccctt ccgcttcat cgtcggcggg
781  gggctctcgg acgaggggga gttggtctc gaccgatcc gcaagtcgta caagcgggtg
841  ctggtcggag ggaactggc tcccgtgcc gacgtgatcg ctgcgcggct gggcaacgac
901  gcggccctgg taggagcggc cgacctggct cgagagccc acccgatcat gtga

```


10 BIBLIOGRAFÍA

- (1) Angell, S., Schwartz, E., and Bibb, JM.(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.
- (2) Angell, S., Lewis, C. G., Buttner, M. J. and Bibb, JM.(1994) . Glucose repression in *Streptomyces coelicolor* A3(2): likely regulatory role for glucose kinase. *Mol. Gen. Genet.* **244**:35-143.
- (3) Arcamore, F., G. Cassinelli, G. Fantini, A. Grein, P. Orezzi, C. Pol and C. Spalla. (1969). Adriamycin, 14-Hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol. Bioeng.* **11**:1101-1110.
- (4) Arcamone, F. (Ed). (1981). Doxorubicin: Anticancer Antibiotics. Academic Press. New York. pp 2-47.
- (5) Bentley, S., et al. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **47**:141-147.
- (6) Bertram, R., Schicht M., Mahr, K., Nothaft H., Saier M. H., Titgemeyer F. (2004). In Silico and Transcriptional analysis of Carbohydrate Uptake Systems of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol.* **186** (5):1362-73.
- (7) Bork, P., Sander, C. & 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.

- (8) Botsford, J. L. and J. G. Harman. (1992). Cyclic AMP in procaryotes. *Microbiol.* **56**:100-122.
- (9) Butler M. J., Deurcher, J., Postma, P. W., Wilson, T. J., Galinier, A., and Bibb, M. J. (1999) Analysis of a *pts H* homologue from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *FEMS Microbiol. Lett.* **177**:279-288.
- (10) Cheek, S., Zhang, H. and Grishin N. V. (2002) Sequence and Structure Classification of Kinases. *J. Mol. Biol.* **320**:855-881.
- (11) Demain, AL. (1989). Carbon source regulation of idiolite biosynthesis. En: Regulation of secondary metabolism in *Streptomyces*. Shapiro S (Ed). CRC Press, Boca Ratón, FL. pp124-134.
- (12) Di Marco, A., F. Arcamone and F. Zunino. (1975). Daunomycin (daunorubicin) and adriamycin and structural analogs: biochemical activity and mechanism of action. J. W. Corcoran, F. E. Hanh (Eds.), *Antibiotics*, Vol. 3. Springer Verlag, New York. pp. 101-128.
- (13) 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
- (14) Goodfellow, M. and O'Donnell, A.G. (1992) Search and discovery of industrially-significant actinomycetes. In: *Microbial Products: New Approaches* (S. Baumberg, I.S. Hunter and P. M. Rhodes, eds) pp.343-383. Cambridge University Press, Cambridge.

- (15) Hodgson, D. A. (1980) Carbohydrate utilization in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Norwich: PH D. Thesis, University of East Anglia, UK.
- (16) Hodgson, D. A. (1982) Glucose repression of carbon source uptake and metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its perturbation in mutants resistant to 2-deoxyglucose. J. Gen. Microbiol. **128**:2417-2430.
- (17) 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.
- (18) Hodgson, D. A. (2000). Primary metabolism and its control in *Streptomyces*: A most Unusual Group of Bacteria. In *Advantage in Microbial Physiology*. Poole R. (Ed) Academic Press, **42**, p.51.
- (19) Hopwood, D. A. (1988). The Leeuwenhoek Lecture, 1987. Towards an understanding of gene switching in *Streptomyces*, the basis of sporulation and antibiotic production. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1988 Nov **22**:235 (1279): 21-38.
- (20) Hopwood, D. A. (2000). *Practical Streptomyces Genetics I*, p.3 Printed by Crowes, Norwich.
- (21) Hutchinson, C. R. and Colombo, A. L. (1999) Genetic Engineering of doxorubicin production in *Streptomyces peucetius*: a Review. J. Ind Microbiol. Biotechnol. **23**: 647-652.

- (22) Ikeda, H., Seno ET, Bruton, CJ y Chater, KF. (1984). Genetic mapping, cloning and physiological aspects of the glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor*. Mol. Gen. Genet **196**:501-507.
- (23) Imvriskova, I. (2000) Purificación y caracterización de la glucosa cinasa de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* y de *Streptomyces coelicolor*. Tesis para obtener el grado de Doctor. México D.F. Facultad de Química, UNAM.
- (24) Imvriskova, I., et al. (2001). Rapid Purification and Biochemical Characterization of Glucose Kinase from *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. Archives of Biochemistry and Biophysics. **394**:137-144.
- (25) Kwakman, JHJM y Postma, P. W. (1994). Glucose kinase has a regulatory role in carbon catabolite repression in *Streptomyces coelicolor*. J. Bacteriol. **176**:2694-2698.
- (26) Lara, F.; R.C. Mateos; G. Vázquez & S. Sánchez (1982). Induction of penicillin biosynthesis by L-glutamate in *Penicillium chrysogenum*. Biochem. Biophys. Res Commun. **105**:172-175.
- (27) Lunin, V., Li Y., Schrag, J. D., Iannuzzi, P., Cygler M., Matte, A. (2004) Crystal Structures of *Escherichia coli* ATP-Dependent Glucokinase and its Complex with Glucose. J. Bacteriol. **186**(20):6915-27.
- (28) Marh, K et al.(2000). *Streptomyces coelicolor* A3(2): large-scale purification. Antonie van Leeuwenhoek **78**:253-261.
- (29) Masurekar P. & A. L. Demain. (1972). Lysine control of penicillin biosynthesis. Can J. Microbiol. **18**:1045-1048.

- (30) Metzker & Caskey (2001). Polymerase Chain Reaction (PCR). Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group / www.els.net
- (31) Myers, CE., Mimnaugh, EG., Yeh GC. Y Sinha, BK. (1988) Biochemical mechanism of tumor cell kill by anthracyclines. En: Anthracyclines and anthracenedione-based anti-cancer agents. Lown J.W. (Ed.). Elsevier, Amsterdam. pp. 527-569.
- (32) Nothaft, H., Parche, S., Kamionka A., Titgemeyer, F. (2003). In vivo analysis of HPr reveals a fructose-specific phosphotransferase systems that confers high-affinity uptake in streptomyces coelicolor. J. Bacteriol. **185**:929-937.
- (33) 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.
- (34) Parche, S., Nothaft, H., Kamionka, A., and Titgemeyer, F. (2000) Sugar uptake and utilization in *Streptomyces coelicolor* : a PTS view to the genome. Antonie van Leeuwenhoek **78**:243-251.
- (35) Plumbridge, J. (2001). DNA binding sites for the Mlc and NagC proteins: regulation of *nagE*, encoding the N-acetylglucosamine-specific transporter in *Escherichia coli*. Nucleic Acids Res. **29**(2):506-14.
- (36) Postma, P. W., Lengeler J. W., and Jacobson, G. R. (1993) Phosphoenolpyruvate; Carbohydrate Phosphotransferase Systems in Bacteria. Microbiol. Rev. **57**:543-594.

- (37) Saier, Jr., M. H. (1996) Cyclic AMP-independent catabolite repression in bacteria. *FEMS Microbiol. Lett* **138**:197-103.
- (38) Santana, C.; D. Segura & S. Sánchez. (1994). Síntesis, función y origen evolutivo de los metabolitos secundarios producidos por microorganismos. *Lat- Amer. Microbiol.* **36**:139-158.
- (39) Segura, D., González, R., Rodríguez, R., Sandoval, T., Escalante L., and Sánchez S. (1996) *Streptomyces mutants* insensitive to glucose repression showed deregulation of primary and secondary metabolism. *Asia Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* **4**:30-36.
- (40) Stülke, J. & Hillen W. (1999). Carbon catabolite repression in bacteria. *Current Opinion in Microbiology.* **2**:195-201.
- (41) Titgemeyer, F., Jonathan, R., Aiala, R. and Saier Jr., M.H. (1994) Evolutionary relationships between sugar kinases and transcriptional repressors in bacteria. *Microbiol.* **140**:2349-2354.
- (42) 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.
- (43) Vaněk, Z., J. Tax, I. Komersova, P. Sedmera and J. Vokoun. (1977). Anthracyclines. *Folia Microbiol.* **22**:139-159.
- (44) Voet, D. and Voet J. G. 1990. *Biochemistry*. Chapter 16 Glicolysis. Ed. Omega Barcelona España. pp. 81 424-460.

- (45) White, B.A. (1997) *Methods in molecular Biology . PCR cloning Protocols.*
Humana Press Totowa, New Jersey. pp.9.