

00591



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO **UNAM** POSGRADO 

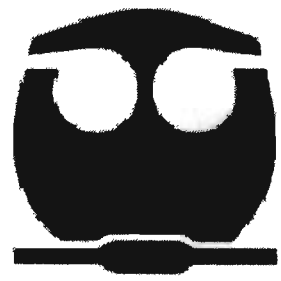
FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

EFFECTO PLEIOTRÓPICO DEL GEN *SCO2127* EN LA INCORPORACIÓN DE GLUCOSA, ACTIVIDAD DE GLUCOSA CINASA Y EN LA REPRESIÓN CATABÓLICA POR GLUCOSA EN *Streptomyces peucetius* var. *caesius*.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)
P R E S E N T A :
SILVIA GUZMÁN BELTRÁN

Tutor: DR. SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL



MÉXICO, D. F.

2005

m346431



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.

EFFECTO PLEIOTRÓPICO DEL GEN *SCO2127* EN LA INCORPORACIÓN DE GLUCOSA, ACTIVIDAD DE GLUCOSA CINASA Y EN LA REPRESIÓN CATABÓLICA POR GLUCOSA EN *Streptomyces peucetius* var. *caesius*.

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección del Dr. Sergio Sánchez Esquivel en el laboratorio de Microbiología Industrial, en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se reconoce al comité tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis, el cual estuvo constituido por:

Dra. Maricarmen Quirasco Baruch	Instituto de Química
Dr. Luís Servín González	Instituto de Investigaciones Biomédicas
Dr. Sergio Sánchez Esquivel	Instituto de Investigaciones Biomédicas

Se reconoce al jurado de examen doctoral por la revisión y comentarios a este trabajo, el cual estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Francisco Bolívar Zapata	Instituto de Biotecnología, UNAM.
Vocal	Dr. Luís Servín González	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
Vocal	Dr. Guillermo Aguilar Osorio	Instituto de Química, UNAM.
Vocal	Dra. Guadalupe Espín Ocampo	Instituto de Biotecnología, UNAM.
Secretario	Dra. Elizabeth Langley M ^c Carron	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
Suplente	Dra. Amelia Farrés González-Saravia	Instituto de Química, UNAM.
Suplente	Ma. Del Carmen Wachter Rodarte	Instituto de Química, UNAM.

RECONOCIMIENTOS

Al Dr. Sergio Sánchez Esquivel por el apoyo incondicional durante mis estudios de Doctorado.

A la Dra. Elizabeth Langley M^cCarron del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del IIB, por su asesoría durante la realización de este trabajo.

A la Biol. Laura Escalante Dávila del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del IIB por su colaboración técnica durante la realización de este proyecto.

A la Dra. Ruth López de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Campeche por su colaboración técnica durante la realización de este proyecto.

A la Dra. Ma. Elena Flores Carrasco del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del IIB por su colaboración y asesoría técnica durante la realización de este trabajo.

A Beatriz Vera Cano y Esther Alvarez Manzano, secretarias del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del IIB, por su colaboración en la impresión de la tesis.

A Leticia García por el apoyo durante mis estudios de doctorado.

El proyecto fue apoyado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (IN 202903) de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Durante los estudios de doctorado goce de una beca otorgada por CONACYT y DGEP-UNAM para la realización de la presente tesis.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: Silvia Guzman Beltrán
FECHA: 6/Julio/2005
FIRMA: Silvia Guzman Beltrán

Agradecimientos:

A mi familia por su apoyo incondicional y por que son las personas que más me aman en este mundo.

A mis padres:

Este sueño realizado les pertenece a ustedes también, ya que esta basado en sus sacrificios y esfuerzos para hacer de mí lo que soy.

Magui eres la mujer más amorosa y valiente que he conocido, gracias por apoyarme y saber que tu amor esta siempre conmigo, te adoro.

Jesús (To) por ser valiente, te amo sobre todas las cosas y sabes que no importa que, te amo desde mí ser al tuyo.

A mis hermanos:

Paty eres una mujer extraordinaria, gracias por tu entrega total, se que cuento con tu amor y apoyo para seguir mi camino.

Marco eres un hombre poderoso y valiente que admiro y amo profundamente, gracias por tu apoyo y sobre todo por la enorme dicha de ser tu hermana.

A mis chiquitines:

Ángel, Luis y Yael por inyectar amor, ternura y diversión a mi vida a cada instante, los amo.

A los no tan nuevos integrantes de la familia:

Martín y Viridiana por ser como mis hermanos y apoyarme a alcanzar mis sueños, los quiero mucho.

A mis amigas incondicionales, porque siempre están ahí...

Paty eres una mujer soñadora y apasionada, te agradezco tu apoyo y que me compartas tantos sentimientos en tus poemas que llegan hasta mi alma.

Olíva eres una mujer intensa, que sabe donde va y siempre te haces presente en mi vida a pesar de la distancia, gracias por mostrarme lo maravilloso de la vida desde tus ojos.

Ma. Elena Flores, gracias por escucharme siempre y más aún por tu apoyo en los días que parecían grises, me enseñaste que la vida es tan hermosa como yo quiera, además de darme la oportunidad de conocer a la gran mujer que eres.

A mi amigo Beny, aunque pareces lejos estás siempre cerca para apoyarme.

A Laura y a Ruth por escucharme y compartir sus aventuras conmigo.

Al Merol: Susana, Monse, Blanca, Larissa, Alonso, Alfredo, Adán y Eduardo por apoyarme, quererme y compartir su vida conmigo.

A mis compañeros del laboratorio por sus sugerencias y comentarios a lo largo de mi formación en el doctorado.

A mi GAP por darme la oportunidad de reconocer nuestro SER juntos. No solo saber que se puede, sino hacer que se pueda... porque con valentía, honestidad y amor, transformaremos sueños en realidades.



Índice

	Página
1 Resumen-Abstract.	1
2 Abreviaturas.	3
3 Antecedentes.	4
3.1 Características generales de <i>Streptomyces</i> .	4
3.1.1 Ciclo de vida.	4
3.1.2 Genética.	5
3.1.3 Ecología.	7
3.1.4 Condiciones de crecimiento.	7
3.1.5 Importancia económica.	7
3.1.6 <i>Streptomyces peucetius</i> var. <i>caesius</i> .	8
3.2 Represión catabólica por carbono.	9
3.2.1 Sistema de fosfotransferasa dependiente de fosfoenol piruvato (PTS).	9
3.2.2 Mecanismo de represión catabólica por carbono en <i>Escherichia coli</i> .	10
3.2.3 Represión catabólica por carbono en bacterias Gram Positivas de bajo contenido de G-C.	12
3.2.4 Represión catabólica por carbono en el género <i>Streptomyces</i> .	14
3.2.4.1 Sistemas de transporte de carbohidratos en <i>Streptomyces</i> .	15
3.2.4.2 Papel de la glucosa cinasa en la represión catabólica por carbono.	16
3.2.4.3 Mutantes <i>ccrA1</i> de <i>Streptomyces coelicolor</i> insensibles a represión catabólica por carbono.	19
3.2.4.4 Mutantes <i>bld</i> insensibles a represión catabólica por carbono.	20
3.2.4.5 Represores específicos involucrados en la regulación por carbono en <i>Streptomyces</i> .	20
4 Justificación.	22
5 Hipótesis.	23
6 Objetivos.	24
6.1 Objetivos particulares.	24
7 Material y métodos.	25

7.1 Cepas bacterianas y plásmidos.	25
7.2 Aislamiento de DNA total de <i>Streptomyces</i> .	26
7.3 Análisis de hibridación tipo Southern blot.	26
7.3.1 Generación de las sondas de los genes <i>glkA</i> y <i>SCO2127</i> de <i>S. coelicolor</i> .	26
7.3.2 Preparación del DNA total de <i>Streptomyces</i> .	27
7.3.3 Transferencia e hibridación.	28
7.4 Subclonación de los genes <i>SCO2127</i> y <i>glkA</i> de <i>S. coelicolor</i> M145.	28
7.4.1 Amplificación de los genes <i>SCO2127</i> y <i>glkA</i> de <i>S. coelicolor</i> M145 por reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR).	28
7.4.2 Obtención de recombinantes de <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i> .	29
7.4.2.1 Obtención de protoplastos.	29
7.4.2.2 Transformación y regeneración de protoplastos.	30
7.5 Determinación de la sensibilidad a represión catabólica por carbono.	30
7.5.1 Sensibilidad a represión catabólica por glucosa sobre la producción de antraciclinas.	30
7.5.2 Sensibilidad a represión catabólica por glucosa sobre la actividad de β -galactosidasa.	31
7.6 Determinación de proteína por el método de Lowry.	31
7.7 Determinación de la actividad de Glk.	31
7.8 Transporte de azúcares.	32
7.9 Análisis de hibridación tipo dot blot de RNA total.	33
7.9.1 Preparación de células para el aislamiento de RNA total.	33
7.9.2 Preparación de polvos de acetona.	34
7.9.3 Extracción de RNA total.	34
7.9.4 Hibridación tipo dot blot de RNA total.	35
7.10 Reproducibilidad de los resultados.	35
8 Resultados.	36
8.1 Amplificación por PCR de los fragmentos de los genes <i>glkA</i> y <i>SCO2127</i> de <i>S. coelicolor</i> utilizados como sondas.	36
8.2 Presencia de posibles genes homólogos a <i>glkA</i> y a <i>SCO2127</i> de <i>S. coelicolor</i> en <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i> y su organización genética.	36
8.3 Clonación de los genes <i>glkA</i> y <i>SCO2127</i> de <i>S. coelicolor</i> M145.	38

8.4 Transformación de las mutantes Dog de <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i> insensibles a RCC.	38
8.5 Caracterización de las mutantes Dog transformadas con los genes <i>SCO2127</i> y <i>glkA</i> .	39
8.5.1 Sensibilidad a la represión por glucosa.	39
8.5.1.1 Producción de antraciclinas de las cepas de <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i> .	39
8.5.1.2 Determinación de la actividad de β -galactosidasa.	40
8.5.2 Transporte de glucosa.	42
8.5.3 Determinación de la actividad de la glucosa cinasa.	43
8.5.4 Efecto del gen <i>SCO2127</i> sobre la utilización de galactosa.	44
8.5.5 Efecto del gen <i>SCO2127</i> sobre la expresión del gen <i>glk</i> a diferentes concentraciones de glucosa.	46
9 Discusión.	48
10 Conclusión.	53
11 Perspectivas.	54
12 Referencias.	55
13 Anexos	62
13.1 S. Guzmán, A. Carmona, L. Escalante, I. Imriskova, R. López, R. Rodríguez-Sanoja, B. Ruiz, L. Servín-González, S. Sánchez y E. Langley. 2005. Pleiotropic effect of the <i>SCO2127</i> gene on the glucose uptake, glucose kinase activity and carbon catabolite repression in <i>Streptomyces peucetius</i> var. <i>caesius</i> . <i>Microbiology</i> . May; 151(5), 1717-1723.	63
13.2 S. Guzmán, I. Ramos, E. Moreno, B. Ruiz, R. Rodríguez-Sanoja, L. Escalante, E. Langley y S. Sánchez. 2005. Sugar uptake and sensitivity to carbon catabolite repression in <i>Streptomyces peucetius</i> var. <i>caesius</i> . <i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> Abril, 6; En prensa.	70

1 Resumen

Los genes *SCO2127* y *SCO2126 (glkA)* se localizan de manera adyacente en el genoma de *Streptomyces coelicolor*. El gen *glkA* codifica para la enzima glucosa cinasa (Glc), la cual ha sido implicada en la represión catabólica por fuente de carbono (RCC) en el género *Streptomyces*. En este trabajo los genes *glkA* y *SCO2127* de *S. coelicolor*, se clonaron juntos y por separado y se transformaron en tres mutantes de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* resistentes a RCC. Estas mutantes presentan disminución en los niveles de Glc y deficiencias en el transporte de glucosa. Al transformar estas cepas con el plásmido que contiene la secuencia *SCO2127*, la incorporación de glucosa y la actividad de Glc, se incrementa a niveles similares de la cepa original e inclusive a niveles mas altos y todas las cepas transformadas recuperaron la sensibilidad a RCC. Estos resultados son sorprendentes, al considerar que la secuencia *SCO2127* no parece codificar para una permeasa de glucosa o una glucosa cinasa. En concordancia con estos resultados, se observo un incremento en el RNA mensajero de la *glkA* en una mutante insensible a RCC transformada con el gen *SCO2127*, comparada con la cepa original y con la cepa no transformada. Como se esperaba las recombinantes con la secuencia *glkA* recuperaron la actividad de Glc a valores similares de la cepa original, pero no así la incorporación de glucosa. Los datos sugieren que el producto del gen *SCO2127* estimula la transcripción de ambos genes y apoya los resultados obtenidos anteriormente sobre la participación de este gen en especies de *Streptomyces*. Como consecuencia fisiológica del efecto del gen *SCO2127*, se incrementan los catabólitos derivados de la glucosa, los cuales podrían ser responsables de ejercer la RCC en este género.

Abstract

SCO2127 and *SCO2126* (*glkA*) are adjacent regions located in *Streptomyces coelicolor* DNA. *glkA* encodes glucose kinase (Glc), which has been implicated in carbon catabolite repression (CCR) in the genus *Streptomyces*. In this work, the *glkA* and *SCO2127* genes from *S. coelicolor* were used, either individually or together, to transform three mutants of *Streptomyces peucetius* var. *caesius* resistant to CCR. These mutants present decreased levels of Glc, and deficiency in glucose transport. When the mutants were transformed with a plasmid containing the *SCO2127* sequence, glucose uptake and Glc activity values were increased to levels similar to or higher than those of the original strain, and each strain regained sensitivity to CCR. This result was surprising considering that the putative *SCO2127* amino acid sequence does not seem to encode a glucose permease or a Glc. In agreement with these results, an increase in *glkA* mRNA levels was observed in a CCR-resistant mutant transformed with *SCO2127* compared with those of the original strain and the CCR-resistant mutant itself. As expected, recombinants containing the *glkA* sequence reverted Glc to normal activity values, but glucose uptake remained deficient. The data suggest that the *SCO2127* gene product enhances transcription of both genes, and support the first specific role for this region in *Streptomyces* species. The physiological consequence of this effect is an increase in the glucose catabolites that may be involved in eliciting CCR in this genus.

2 Abreviaturas

ABC	Proteínas de unión a ATP
ADP	Difosfato de adenina
AMPc	Adenin monofosfato cíclico
ATP	Trifosfato de adenina
CAP	Proteína activadora catabólica
CcpA	Proteína de control catabólico
Cra	Proteína represora /activadora
Cya	Adenilato ciclasa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNR	Daunorrubicina
DOG	2-Desoxiglucosa
DXR	Doxorrubicina
FBF	Fructosa 1,6-fosfato
G-6P	Glucosa 6-fosfato
G-6PDH	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
Gk	Glicerol cinasa
Glk	Glucosa cinasa
HPr	Proteína que contiene una histidina como transportadora de fosfato
HPrK/P	HPr cinasa/fosfatasa
MOPS	Ácido 3-[N-Morfolino] propansulfónico
NADP	Nicotin adenin dinucleótido fosfato
ORF	Marco de lectura abierto
ONPG	<i>o</i> -nitrofenil- β -galactopiranosido
<i>oriC</i>	Origen de replicación
PEP	Fosfoenol piruvato
PRD	Dominios susceptibles a regulación por el sistema PTS
PTS	Sistema de fosfotransferasa dependiente de fosfoenol piruvato
RC	Represión catabólica
RCC	Represión catabólica por fuente de carbono
RNA	Ácido ribonucleico
TIR	Secuencias invertidas repetidas
TPs	Proteínas de unión a las secuencias invertidas repetidas

3 Antecedentes

3.1 Características generales de *Streptomyces*

Este género pertenece al orden Actinomycetales, el cual está constituido por bacterias Gram positivas con alto contenido de G-C. Además este grupo es de gran interés científico y biotecnológico, ya que presenta en su ciclo de vida diferenciación morfológica única en bacterias, además produce una gran gama de compuestos bioactivos de interés en la medicina (Hodgson, 2000).

3.1.1 Ciclo de vida

Son bacterias miceliales que presentan una diferenciación morfológica única en los procariontes (Hirsch *et al.*, 1985). Su ciclo de vida inicia cuando las esporas germinan para formar micelio vegetativo, las hifas cenocíticas, crecen por extensión apical para formar micelio vegetativo ramificado, el cual, se nutre de compuestos insolubles presentes en el suelo, mediante la producción de una variada gama de enzimas hidrolíticas extracelulares. Una vez que los nutrientes se han agotado, comienza el proceso de diferenciación, es decir el surgimiento de hifas aéreas que crecen nutriéndose de la lisis del micelio vegetativo. Posteriormente las hifas aéreas comienzan a enroscarse y a septarse para dar lugar a la formación de esporas, que generalmente adquieren pigmentación al madurar. Las esporas constituyen la única etapa unicelular en el ciclo de vida, ya que éstas al germinar, vuelven a generar micelio vegetativo multicelular (ver figura 1) (Chater, 1998).

En la naturaleza, los estreptomicetos permanecen gran parte de su ciclo de vida en forma de espora. Éstas pueden germinar esporádicamente y vivir por cortos periodos de tiempo en forma micelial, cuando existe alta concentración de materia orgánica (Murray *et al.*, 1985).

El tamaño del cromosoma de *Streptomyces* es de aproximadamente 9.0 Mb, cabe mencionar que es el genoma mas grande que se ha secuenciado en bacterias. Las fracciones terminales de este cromosoma son secuencias invertidas repetidas (TIR) o regiones teloméricas. Las regiones TIR, son variables en secuencia y tamaño, que van del rango de 20 a 500 kb. Además, estas secuencias están protegidas por proteínas terminales (TPs), las cuales se encuentran covalentemente unidas a las regiones TIR (Yang *et al.*, 2002). En la tabla 1 se muestran las características más importantes del genoma de ambas especies.

En el centro del cromosoma de *Streptomyces*, se localiza el origen de replicación (*oriC*), indicando que el proceso de replicación es bidireccional hacia la región telomérica. Este mecanismo de replicación puede dejar espacios de cadena sencilla en el extremo terminal de la cadena 3', los cuales son unidos por un mecanismo desconocido que probablemente involucra a las proteínas unidas en los extremos del cromosoma (Huang *et al.*, 1998).

Características	<i>S. coelicolor</i>	<i>S. avermitilis</i>
Tamaño del genoma	8,667,507 pb	9,025,608 bp
Porcentaje de G-C	72.12%	70.7%
Secuencias codificantes (ORFs)	7,825	7,574
Densidad codificante	88.9%	86.2%
Tamaño Promedio de los genes	991 pb	1034 pb
RNA		
RNAr (16s, 23s y 5s)	6 genes	6 genes
RNAt	63 genes	68 genes

Análisis *in silico* muestra una gran densidad génica y en ambas especies se ha predicho que existen aproximadamente 7,500 genes, que corresponde al doble de regiones codificantes que en otras bacterias, por ejemplo se estiman 4,289 en *Escherichia coli*, 4,099 en *Bacillus subtilis* y 6,232 en eucariontes inferiores como *Saccharomyces cerevisiae*. Ésto indica que el género *Streptomyces* posee una gran diversidad metabólica que le permite sobrevivir en diferentes tipos de ambientes. De hecho, la mayor parte de las familias proteicas de estas bacterias están involucradas en la regulación, transporte y degradación de nutrientes extracelulares (Bentley *et al.*, 2001). Por otro lado, recientemente se determinó la secuencia del genoma de *Streptomyces peuceetii* ATCC27952, aunque no está disponible la información, se sabe que es de 8.7 Mb (Parajuli *et al.*, 2004).

3.1.3 Ecología

El género *Streptomyces* está ampliamente distribuido en ambientes terrestres y acuáticos. Aunque es más abundante en el suelo, usualmente se encuentra en un rango de 10^4 a 10^7 unidades formadoras de colonia por gramo de peso seco de tierra. Los estreptomicetos participan activamente en el reciclaje del carbono degradando la materia orgánica derivada de plantas y animales, ya que producen una gran gama de enzimas extracelulares que actúan sobre polímeros insolubles como el almidón, xilano, celulosa, quitina, etc., para generar productos solubles que pueden ser absorbidos y utilizados para su desarrollo (Hodgson, 2000).

A pesar de que la mayoría son saprofitos estrictos, existen algunas asociaciones parásitas con animales y plantas. Por ejemplo *Streptomyces somaliensis* ha sido asociado con actinomicetomas de animales e inclusive en el hombre. *Streptomyces scabies* es patógeno de plantas, ya que es causante de descamaciones de la raíz debido a que penetra en la superficie y causa proliferación verrugosa en la dermis (Hodgson, 2000). Además este género también forma simbiosis con otras plantas, por su capacidad de crecer ampliamente en la rizosfera, puede proteger las raíces de diversas plantas del ataque de hongos, ya que puede inhibir su crecimiento por la producción de antifúngicos, contribuyendo al control de hongos patógenos (Murray *et al.*, 1985).

3.1.4 Condiciones de crecimiento

Los estreptomicetos son bacterias aerobias estrictas, aunque pueden crecer en concentraciones bajas de oxígeno. Sin embargo su crecimiento se inhibe por la presencia de concentraciones altas de CO_2 en el ambiente ($>10\%$). Las esporas resisten bajas concentraciones de agua y son tolerantes a ambientes salinos.

A pesar de que los estreptomicetos son mesófilos, pueden crecer en un rango de temperatura de 27 a 45 °C aproximadamente, por ejemplo *Streptomyces albus* puede crecer a 45 °C.

Los miembros de este género pueden crecer en rangos amplios de pH (3.5 a 7.5), aunque el óptimo de crecimiento es de 5.5 (Murray *et al.*, 1985).

3.1.5 Importancia económica

Los estreptomicetos son productores de una gran variedad de compuestos bioactivos útiles en la industria. Este género produce diversas enzimas extracelulares como: celulasas, xilanasas, pectinasas, amilasas, etc. Además producen una gran gama de metabolitos secundarios con actividad antibiótica como: cloranfenicol producido por *Streptomyces venezuelae*, estreptomicina

producido por *Streptomyces griseus*, así como inhibidores de β -lactamasas como el ácido clavulánico producido por *Streptomyces achromogenes* var. *streptozoticus*. Herbicidas como bialafos, producido por *Streptomyces hygroscopicus*. Agentes inmunosupresores como Fk506 producido por *Streptomyces tsukabensis*. Antiparásitarios como avermectina producida por *Streptomyces avermitilis* y compuestos con actividad anticancerígena como: daunorrubicina y doxorubicina (DXR) producida por *Streptomyces peucetius* y *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, respectivamente (Hodgson, 2000).

3.1.6 *Streptomyces peucetius* var. *caesius*

S. peucetius var. *caesius* fue obtenido por tratamiento mutagénico (Arcamone *et al.*, 1969) a partir de *S. peucetius* (aislado de Peucetia, Italia en 1957 y posteriormente descrito por Grein en 1963). Como ya se ha mencionado esta mutante produce DXR un antibiótico policétido del grupo de las antraciclinas, cuya fórmula es $C_{27}H_{29}NO_{11} \cdot HCl$, su peso molecular corresponde a 579.99 g/mol. Este antibiótico tiene actividad contra diversos tipos de cáncer como el de: mama, ovario, estómago, tiroides, sarcoma de Kaposi, algunas leucemias y linfomas (Vandamme, 1984; Grein, 1987; Hershberger *et al.*, 1989).

Se ha demostrado que la DXR se une al DNA de cadena doble por interacciones electrostáticas. Esta acción intercalante, es responsable de la inhibición de la síntesis de DNA y RNA (Di Marco *et al.*, 1975). También se ha reportado que induce rompimientos en el DNA y que puede inhibir a la topoisomerasa II (Simpkins *et al.*, 1984; White & Stroshane, 1984). Es posible la existencia de un mecanismo adicional, ya que este compuesto es citotóxico para las células de leucemia sin necesidad de entrar a éstas (Tritton & Yee, 1982).

En *S. peucetius* var. *caesius*, la producción de este anticancerígeno, se lleva a cabo en presencia de diversas fuentes de carbono como: glucosa, manosa, celobiosa, lactosa, fructosa, maltosa y almidón, siendo la primera, la más empleada en la producción de antibióticos (Dekleva *et al.*, 1985). Sin embargo, la síntesis de DXR, así como la de otros metabolitos secundarios, se encuentra controlada negativamente por glucosa. A este mecanismo de regulación negativa, ejercida por la presencia de algunas fuentes de carbono se le conoce como represión catabólica por fuente de carbono (RCC) (Demain, 1989; Hodgson, 1982; Segura *et al.*, 1996).

3.2 Represión catabólica por carbono

La RCC es un sistema de regulación global controlado por la presencia de diversos carbohidratos, que generalmente son los que más fácilmente se metabolizan. Este mecanismo involucra el control a nivel transcripcional y actividad proteica (Titgemeyer y Brückner, 2002). Gracias a la RCC, la célula coordina el metabolismo de carbono y energía, asegurando la utilización organizada y secuencial, cuando más de una fuente de carbono se encuentra presente en el medio de manera simultánea (Stülke & Hillen, 1999). Esto asegura niveles adecuados de cada metabolito y evita gastos de energía innecesarios.

Las bacterias han desarrollado múltiples estrategias de regulación para censar las condiciones nutricionales del ambiente y ajustar su metabolismo como respuesta. De estos sistemas de regulación depende la sobrevivencia de los microorganismos en la naturaleza.

Los mecanismos responsables de la RCC son diversos y muy complejos y aunque las consecuencias fisiológicas son las mismas probablemente existen varios sistemas de control en un solo organismo (Angell *et al.*, 1994).

A pesar de que este fenómeno regulatorio fue descubierto en el año 1901 (Saier y Reizer, 1992), hasta la fecha son pocos los procesos que han sido elucidados completamente a nivel molecular. En los procariontes, se ha encontrado que existen diversos mecanismos de RCC. Sin embargo el más común es el sistema de fosfotransferasa dependiente de fosfoenol piruvato (PTS).

3.2.1 Sistema de fosfotransferasa dependiente de fosfoenol piruvato (PTS).

El PTS es un mecanismo de transporte de azúcares y regulador negativo de otros sistemas de incorporación de carbohidratos alternativos. Es un complejo multienzimático, el cual, está constituido por dos fosfotransferasas generales: Enzima I (EI) y HPr (proteína que contiene una histidina transportadora de fosfato) y un grupo de proteínas transportadoras membranales específicas para cada carbohidrato, llamadas Enzimas II (EIIA, EIIB y EIIC). La transferencia de fosfato procede de fosfoenol piruvato (PEP) vía EI, HPr, EIIABC hasta el azúcar (ver figura 2) (Potsma *et al.*, 1993).

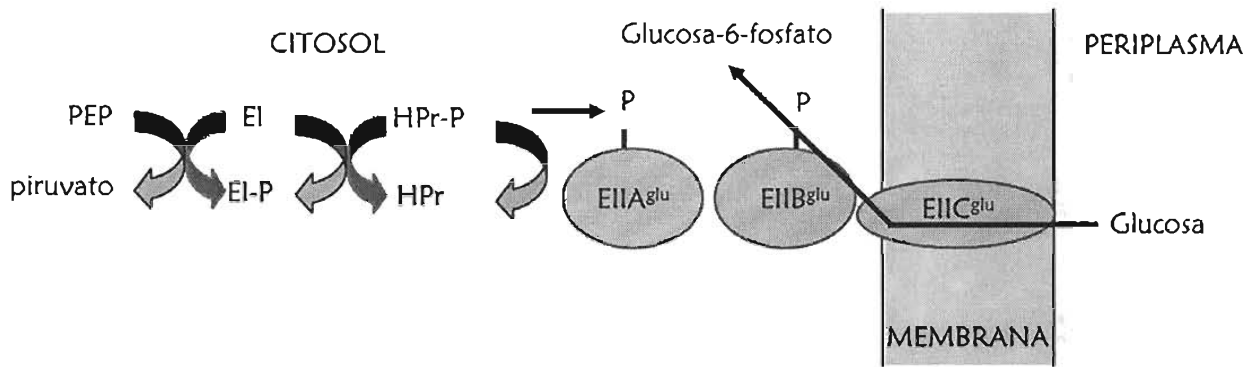


Figura 2. Cadena de fosforilación del sistema PTS, desde el fosfoenol piruvato (PEP) vía EI, HPr, EIIABC hasta la glucosa (Modificado de Postma *et al.*, 1993).

3.2.2 Mecanismo de represión catabólica por carbono en *Escherichia coli*.

La enzima EIIA del PTS tiene un papel central en la regulación por fuente de carbono, ya que transmite señales vía fosforilación a varios blancos celulares. Durante el transporte de azúcares mediado por el PTS, el grupo fosfato es transferido del PEP hasta el azúcar. Cuando otras fuentes de carbono son importadas, la EIIA^{glu} está en su forma no fosforilada. En investigaciones recientes se ha demostrado que durante la RCC ejercida por otros azúcares represores, que no son transportados vía PTS, también se modula el estado de fosforilación de EIIA^{glu}. Durante el crecimiento de *E. coli* en lactosa o glucosa 6-fosfato, cambia el estado de fosforilación de EIIA^{glu}, probablemente controlado por la relación PEP/Piruvato. Los niveles de EIIA^{glu}/EIIA^{glu}-P reflejan el estado fisiológico de la célula y permiten transmitir las señales de control global (Titgemeyer y Hillen, 2002).

En el control transcripcional global, la enzima EIIA^{glu} fosforilada estimula a la adenilato ciclasa (Cya) produciendo adenin monofosfato cíclico (AMPc), el cual es requerido por la proteína de control catabólico (CAP) para formar un complejo (CAP-AMPc) y así activar genes sensibles a regulación. Además CAP está involucrada en la regulación de otros procesos celulares como la activación de factores sigma y biosíntesis del flagelo. Hasta el momento se conoce que CAP controla más de 100 genes en *E. coli* (Titgemeyer y Hillen, 2002).

Por otro lado EIIA^{Glu} no fosforilada, por un mecanismo de exclusión del inductor, bloquea permeasas específicas para incorporar: lactosa, maltosa, melibiosa y rafinosa, evitando la formación de los inductores y también la activación de los genes necesarios para su utilización. Inhibe alostéricamente varias proteínas citoplásmicas como la glicerol cinasa, previniendo la formación del inductor (glicerol-3-fosfato) (Titgemeyer y Hillen, 2002).

Otros factores que actúan pleiotrópicamente son Cra y Mlc. Cra es el represor del operón de fructosa y además es activador de la gluconeogénesis, el ciclo de Krebs y el ciclo del glioxilato. Cra contribuye a la regulación de *malT* que codifica al activador del regulón de maltosa y a los genes que codifican para las PTS-permeasas de glucosa y manosa. Por su parte Mlc regula la expresión del operón *ptsHlcr* (codifican para HPr, EI y EIIA^{Glu}) (Saier *et al.*, 1996; Plumbridge, 2001).

Elementos que se conocen que están involucrados en la regulación por carbono son: BglG, Hpr y EI. BglG es una proteína antiterminadora que regula la expresión de genes necesarios para la utilización de β -glucósidos. Contiene dominios de regulación por el sistema PTS (PRD), que pueden ser fosforilados por HPr o la enzima EI específica (Stülke *et al.*, 1998; Görke y Rak, 1999). BglG es inactivo en ausencia de β -glucósidos o en la presencia de sustratos PTS preferenciales. HPr regula a la glucógeno fosforilasa, coordinando el consumo o almacenaje de glucosa (Seok *et al.*, 2001). La enzima EI-PTS no fosforilada evita la activación de CheA al prevenir su fosforilación. Así controla negativamente la respuesta quimiotáctica para el movimiento del flagelo (Lux *et al.*, 1995) (ver la figura 3).

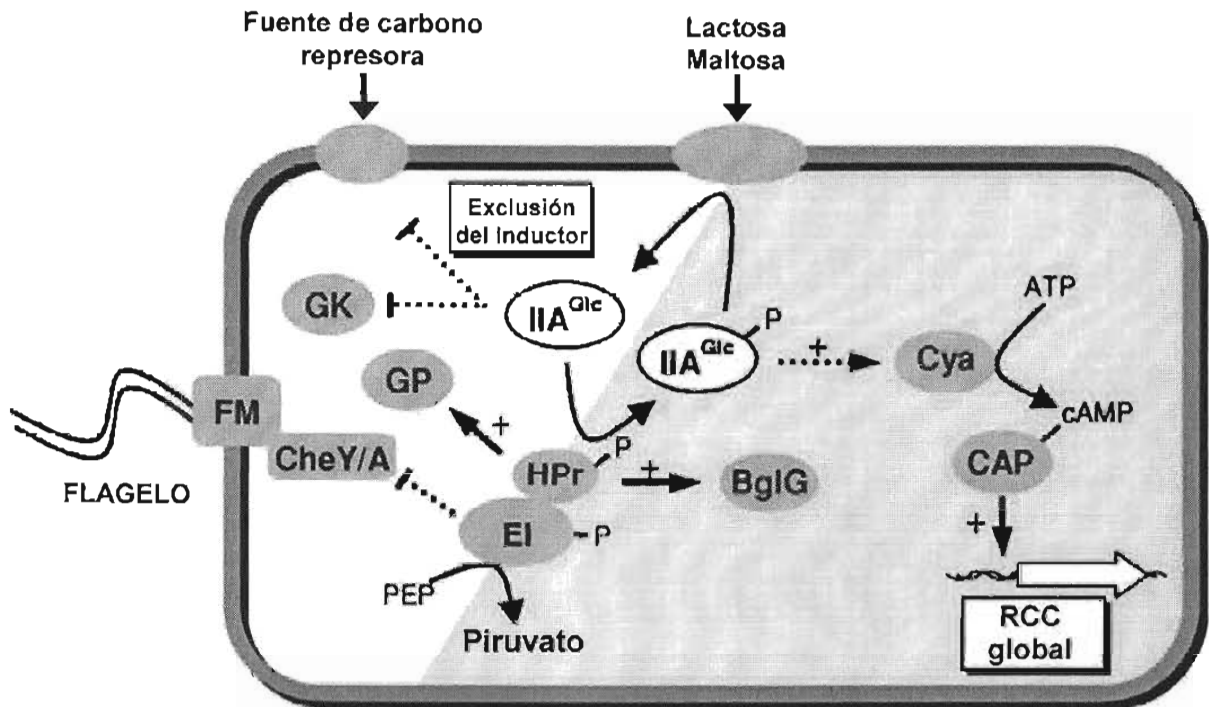


Figura 3. Represión catabólica por carbono en *E. coli*. El modelo muestra a las células en dos condiciones: en presencia de la fuente de carbono represora (región blanca) y en ausencia de la fuente de carbono represora (región gris). Los eventos sujetos a fosforilación se indican con líneas sólidas y otro tipo de interacciones se señalan en líneas discontinuas, además se muestran los procesos que son activados (+) y reprimidos (\leftarrow). El estado de fosforilación de EIIA^{Glc} es esencial para ejercer la RCC. En condiciones represoras EIIA^{Glc} se encuentra desfosforilada y media la exclusión del inductor. En condiciones no represoras EIIA^{Glc} estimula la síntesis de AMPc vía Cya e indirectamente activa a los genes sensibles a regulación por carbono, gracias al complejo AMPc-CAP. Abreviaturas: BglG, proteína antiterminadora del operón para la utilización de β -glucosidos; CAP, proteína activadora catabólica; CheY/A, proteínas quimiotácticas; Cya, adenilato ciclasa; EI, Enzima I del PTS; FM, motor flagelar; GK, glicerol cinasa; GP, glucogeno fosforilasa; HPr, proteína que contiene una histidina como transportadora de fosfato del sistema PTS (fuente: Titgemeyer y Hillen, 2002).

3.2.3 Represión catabólica por carbono en bacterias Gram Positivas de bajo contenido de G-C.

Este grupo de bacterias tiene mecanismos totalmente diferentes para llevar a cabo su regulación por carbono. En estas bacterias las enzimas: HPr, la HPr cinasa/fosfatasa (HPrK/P) y la enzima de control catabólico (CcpA), son las que censan el estado fisiológico de la célula y regulan el consumo de carbono. La proteína HPr por su estado de fosforilación refleja el estado nutricional de la célula. En presencia de la fuente de carbono represora, la HPr es fosforilada en un sitio de regulación específico (serina 46) exclusivamente por HPrK/P. El balance entre HPr-his-P y HPr-ser-P se determina por el sistema PTS dependiente de PEP, el cual, produce HPr-his-P, que es necesaria para mediar el transporte de diversas fuentes de carbono. Por ejemplo en *Bacillus subtilis* existen 15 sistemas dependientes de PTS, 9 en *Lactococcus lactis* y 8 en *Streptococcus pneumoniae* (Reizer *et al.*, 1999; Bolotin *et al.*, 2001; Hoskins *et al.*, 2001).

La enzima HPr-his-P tiene un papel muy importante en la regulación transcripcional por carbono y en la exclusión del inductor. La HPr-his-P regula positivamente la actividad de enzima glicerol cinasa, coordinando la utilización de glicerol. Además HPr-his-P controla la actividad de diversos reguladores sensibles a la presencia de fuentes de carbono represoras vía dominios PRD como GlcT de *B. subtilis*, la cual regula el operón *ptsGHI* (EII, Hpr y EI) y SacT el regulador del PTS para sacarosa (Stülke y Hillen, 2000).

Cuando los azúcares dependientes de PTS son metabolizados, los niveles de intermediarios glucolíticos como FBP (fructosa-1,6-fosfato) aumentan. FBP estimula a la enzima HPrK/P generando mayores niveles de HPr-ser-P. de esta manera puede estimular a factores transcripcionales formando complejos represores que regulan genes sensibles a RCC. Cuando la velocidad de consumo de azúcares dependientes del PTS es menor, los niveles de los intermediarios metabólicos disminuyen y los niveles de fosfato inorgánico aumentan, la HPrK/P cataliza la reacción reversa y desfosforila a la HPr-P, aumentando los niveles de HPr, lo cual permite el incremento del transporte de los azúcares PTS dependientes.

Otra enzima que tiene un papel esencial en el control transcripcional global es la CcpA. En un análisis del genoma de *B. subtilis*, se ha estimado que regula aproximadamente 300 genes. CcpA tiene actividad de represor/activador. La activación de CcpA requiere su unión al correpresor HPr-ser-P, juntos se unen al operador *cre* (elementos de respuesta catabólica) de genes sensibles a regulación por carbono. Además se han detectado otras proteínas como CcpB y CcpC que también participan en la RCC en *B. subtilis* (Brückner y Titgemeyer, 2002).

La enzima EI-PTS también participa en la RCC, en presencia de glucosa regula negativamente las señales quimiotácticas por interacción de EI-P con CheA (ver figura 4) (Garrity *et al.*, 1998).

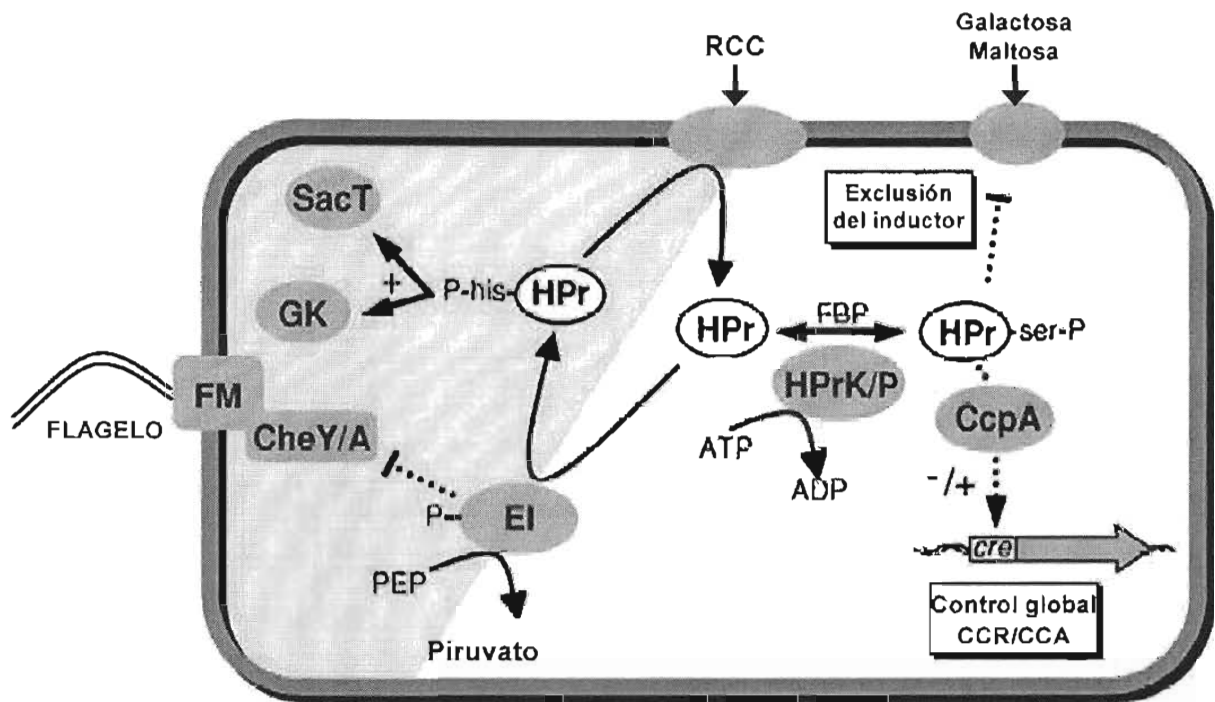


Figura 4. Represión catabólica en bacterias Gram positivas de bajo contenido de G-C. El modelo muestra a las células en dos condiciones: en presencia de la fuente de carbono represora (región blanca) y en ausencia de la fuente de carbono represora (región gris). Los eventos sujetos a fosforilación se indican con líneas sólidas y otro tipo de interacciones se señalan en líneas discontinuas, además se muestran los procesos que son activados (+) y reprimidos (⊖). El estado de fosforilación de HPr es esencial para ejercer la RCC. Dentro de condiciones represoras se encuentra al HPr fosforilado en la serina (HPr-ser-P) mediando la exclusión del inductor y regulando a CcpA (activadora/represora) que participa en la regulación global por carbono. En condiciones no represoras la HPr-his-P predomina y puede activar al transporte de diversos azúcares vía PTS. HPr-his-P activa a la glicerol cinasa (GK) y a reguladores específicos como SacT. Abreviaturas: CcpA, proteína de control catabólico; CheY/A, proteínas quimiotácticas; *cre*, elementos de respuesta catabólica; EI, Enzima I del PTS; FM, motor flagelar; FBP, Fructosa 1,6-fosfato; GK, glicerol cinasa; HPr, proteína que contiene una histidina como transportadora de fosfato; HPrK/P, HPr cinasa/fosfatasa; Sac T, antiterminador del operón para la utilización de sacarosa (fuente: Titgemeyer y Hillen, 2002).

3.2.4 Represión catabólica por carbono en el género *Streptomyces*

En este género, la RCC controla la expresión de muchos genes del metabolismo primario como por ejemplo genes involucrados en el transporte y en la utilización de fuentes de carbono alternas, así como la síntesis de enzimas extracelulares y genes del metabolismo secundario (Hodgson, 2000). La RCC en *Streptomyces* aún no se entiende completamente. A pesar de que se ha identificado el PTS en tres especies de estreptomicetos, se ha evidenciado que éste no está involucrado en la RC por glucosa (Sabater *et al.*, 1972; Novotná y Hostálek, 1985; Titgemeyer *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2002). Tampoco se han reportado fluctuaciones en los niveles de AMPc al cambio de fuente de carbono (Hodgson, 1994). Finalmente, no se ha detectado actividad de cinasa/fosfatasa (HPrK/P), tal y como ocurre en *B. subtilis* (Gersh *et al.*, 1980; Chatterjee y Vining,

1982). Estos resultados sugieren que el mecanismo de RCC es considerablemente diferente al que existe en *E. coli* y en otras bacterias Gram positivas de bajo contenido de G-C (Postma *et al.*, 1993; Postma *et al.*, 1996). Se sabe que la detección de los nutrientes y la generación de las señales como estímulo para producir la RCC, está fuertemente ligada a los respectivos sistemas de transporte y a su posterior metabolismo.

3.2.4.1 Sistemas de transporte de carbohidratos en *Streptomyces*

En *S. coelicolor* recientemente se realizó un análisis “*in silico*”, en el cual, se predijo la existencia de diversos mecanismos para la incorporación de carbohidratos como: el PTS, los sistemas de transporte ABC dependientes de ATP (ABC del inglés ATP Binding Cassette), el simporte y el transporte facilitado. Esta gran diversidad de mecanismos para la incorporación de carbohidratos refleja la capacidad tan alta de los estreptomicetos, para utilizar un sinnúmero de polisacáridos presentes en la materia orgánica (Bertram *et al.*, 2004). Dentro de estos sistemas, el PTS permite la incorporación de fructosa y N-acetil-glucosamina, pero se ha observado que este no participa en la RCC. Los sistemas ABC son utilizados para la incorporación de maltodextrinas, xilósidos, glucósidos, quitobiosa, lactosa, ribosa, etc. El transporte facilitado para la incorporación de galactosa y glicerol y el simporte para glucosa. En la figura 5 se esquematiza los sistemas antes descritos (Bertram *et al.*, 2004).

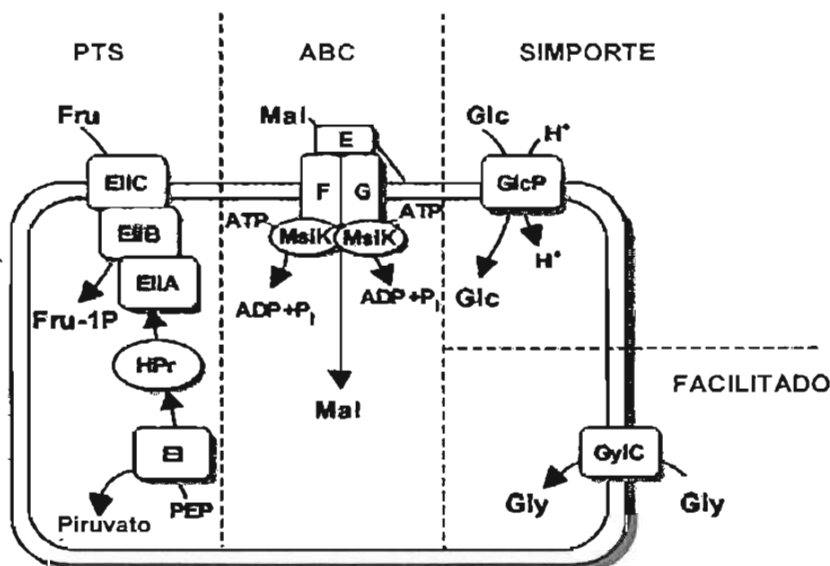


Figura 5. Esquema de los sistemas representativos de incorporación de carbohidratos en *S. coelicolor*. PTS para fructosa (Fru), ABC para maltosa (Mal). Simporte para glucosa (Glc) y difusión facilitada para glicerol (Gly). Abreviaturas: E, MalE; F, MalF; G, MalG; EIIA, enzima IIA; EIIB, enzima IIB; EIIC, enzima IIC; PEP, fosfoenol piruvato (Fuente: Bertram *et al.*, 2004).

Por lo que respecta al transporte de glucosa, que es la fuente de carbono que mayor efecto represor ejerce, se sabe que el sistema de transporte es inducido por glucosa (Ramos *et al.*, 2004; Bertram *et al.*, 2004; Guzmán *et al.*, 2005). En estudios "in silico" se ha detectado que el sistema de incorporación, esta codificado por los genes *glcP1* (SCO5578) y *glcP2* (SCO7153). Ambos genes presentan un 99% de identidad y codifican un producto idéntico (Wezel *et al.*, 2005). El gen *glcP1* se localiza en la parte central del genoma mientras que el gen *glcP2* se localiza en el brazo derecho del genoma, lo que corresponde a la región variable, aparentemente este último, se originó por duplicación del gen *glcP1*. Cabe mencionar que en *S. avermitilis* existe un gen homólogo a *glcP1* (SAV2657) con 68% de identidad en la secuencia de aminoácidos. En estudios recientes de expresión en *E. coli*, se corroboró que los genes *glcP1* y *glcP2* codifican para proteínas simportadoras dependientes de H⁺ (Wezel *et al.*, 2005).

3.2.4.2 Papel de la glucosa cinasa en la represión catabólica por carbono

La glucosa cinasa (Glc) cataliza el primer paso de la glucólisis, la fosforilación de la D-glucosa dependiente de ATP, según la reacción:



La Glk de *S. coelicolor* y de *S. peucetius* var. *caesius* fueron caracterizadas bioquímicamente. Son enzimas citosólicas, homotetraméricas, con un peso molecular aproximado de cada monómero de 31 y 32 kDa, respectivamente. La Glk 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 esta última se disocia en un 85% a su forma dimérica. La presencia de 100 mM de glucosa evita su dimerización. Este comportamiento no se observa en la glucosa cinasa de *S. coelicolor* (Imriskova *et al.*, 2005). Recientemente se ha reportado la secuencia del gen que codifica para la Glk de *S. peucetius* var. *caesius* en un banco de genes (gi:50263005 de NCBI). Al analizar su secuencia, se observa que posee un 98% de identidad con el gen de *S. avermitilis* y un 87% con el de *S. lividans* y el de *S. coelicolor* (Langley *et al.*, 2004).

Como ya se ha mencionado, la detección de la fuente de carbono represora y la generación de las señales para producir la RCC, están fuertemente ligadas con el transporte de glucosa, la activación de la glucosa por fosforilación y su posterior metabolismo. Con el fin de estudiar dicho mecanismo de regulación en *S. coelicolor*, se aislaron mutantes (Dog^R) por su capacidad de crecer

en presencia de la 2-desoxiglucosa (DOG), un análogo de la glucosa no metabolizable. Las mutantes Dog^R presentan pérdida total o parcial de la actividad de la glucosa cinasa (Glc) e insensibilidad a RC por glucosa. Además, este tipo de mutantes son incapaces de utilizar glucosa (Glu), aún cuando aparentemente el transporte de glucosa no está afectado (Hodgson, 1982).

Resultados similares se obtuvieron al aislar mutantes resistentes a DOG en *S. peucetius* var. *caesius* (Segura *et al.*, 1996). Estas últimas (Dog^R) también se caracterizaron por ser insensibles a RCC, pero a diferencia de las mutantes de *S. coelicolor*, las de *S. peucetius* var. *caesius* aún pueden crecer en glucosa como única fuente de carbono, a pesar de presentar afectado el transporte de glucosa parcialmente (Escalante *et al.*, 1999). A partir de una cepa Dog^R se aislaron una nueva serie de mutantes ahora por su sensibilidad a DOG, en la tabla 2 se muestran las características de algunas mutantes Dog^S obtenidas (Ramos *et al.*, 2004). Éstas, al igual que la cepa parental, mostraron resistencia a RC por glucosa, con deficiencias en la incorporación de glucosa y en la actividad de Glc, con estos resultados se pudo determinar que no hay una correlación directa entre la actividad de Glc y la sensibilidad DOG y la RCC como en las mutantes de *S. coelicolor* (Hodgson, 1984). Con base en lo anterior se sugirió que probablemente existen otros elementos que pudieran estar involucrados en dicha regulación transcripcional en *S. peucetius* var. *caesius*.

Cepa	Sensibilidad A DOG.	Transporte de glucosa %	Actividad de Glc %	Sensibilidad a RCC
Original	S	100	100	S
Dog ^R	R	51	15	R
Dog ^S -2	S	18	37	R
Dog ^S -11	S	71	84	R

Resultados tomados de Ramos *et al.* (2004). ^aGlc: 100% (170 U/mg proteína), incorporación de glucosa 100% (2.21 μ mol/mg de peso seco de micelio). ^bLa sensibilidad a represión por carbono se determinó por la formación de pigmento rojo (antraciclina) formado en presencia de D-glucosa 500 mM. Las cepas resistentes (R) no producen pigmento y las sensibles (S) si lo hacen. ^cDOG: las cepas sensibles (S) no crecen en presencia de 2-desoxiglucosa más lactosa 55 mM y las resistentes (R) si crecen.

Por otro lado, las mutantes Dog^R de *S. coelicolor* (Glu, Glc) complementaron su deficiencia con un fragmento *Bcl* de 2.9 kb que contiene el gen que codifica para la Glc, es decir, recuperaron la capacidad para utilizar glucosa, su actividad de Glc y la sensibilidad a RCC (Ikeda *et al.*, 1984).

Posteriormente, en un análisis de secuencia, se pudo elucidar que el fragmento que complementa la función posee tres marcos de lectura abiertos (ORFs). El ORF1 está incompleto, aunque en estudios recientes de secuenciación (Bentley *et al.*, 2001) se ha reportado que ORF1 (gen *SCO2128*) podría codificar para una proteína de 44.7 kDa (<http://streptomyces.org.uk>). ORF2 (gen *SCO2127*) posiblemente codifica para una proteína de 20.1 kDa con función aún no determinada (Angell *et al.*, 1992). Por su parte ORF3 codifica para la Glk (*glkA* o *SCO2126*) de un tamaño aproximado de 33.1 kDa (Angell *et al.*, 1992). En la figura siguiente se muestra el fragmento de 2.9 kb que complementa la función de la mutante de *S. coelicolor* (Ikeda *et al.*, 1984).

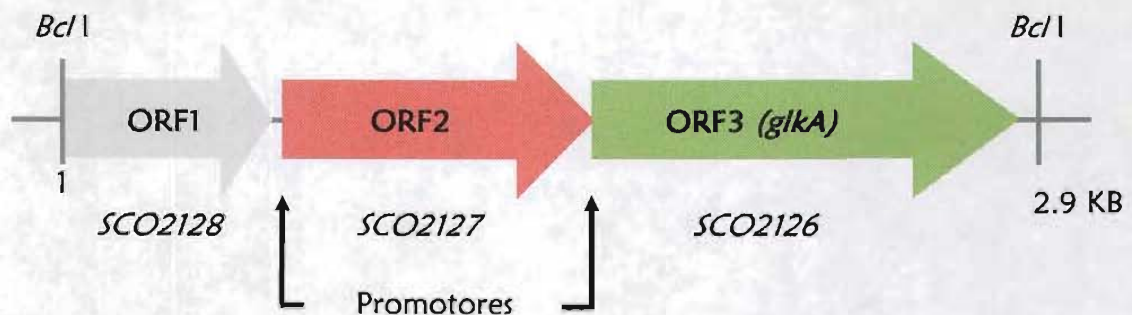


Figura 6. Fragmento *Bcl I* del genoma de *S. coelicolor* que contiene tres marcos de lectura, el ORF1 que está incompleto y dos completos ORF2 (*SCO2127*) y ORF3 (*glkA*) (reportado por Angell *et al.*, 1992).

Como se describe en la figura 6, los genes *SCO2127* y *glkA* poseen su propio promotor, están separados por 51 nucleótidos y cada uno está precedido por un posible sitio de unión al ribosoma. No hay una región aparente que determine el término de la transcripción entre ambos genes, por ello se cree que *SCO2127* y *glkA* se co-transcriben como un operón, además el gen *glkA* puede transcribirse desde su propio promotor. Al respecto los autores sugieren que ambos productos pudieran tener una interacción entre ellos o funciones correlacionadas sujetas a expresión coordinada. Proponen que el gen *SCO2127* pudiera codificar para una proteína de transporte o estar involucrada en el metabolismo de la glucosa. Sin embargo no muestran evidencia acerca de esta posibilidad (Angell *et al.*, 1992; 1994)

En análisis posteriores de complementación, solamente con el gen *glkA*, se pudo evidenciar que se restablece la capacidad de utilizar glucosa y la actividad de la Glk, pero solo parcialmente la sensibilidad a RCC para el control del gen *dagA* (agarasa). Por lo tanto se requiere de los genes *glkA* y *SCO2127* para restablecer la sensibilidad a RCC a niveles similares de la cepa silvestre (Angell *et al.*, 1992).

Por otro lado hay evidencias que soportan el papel regulatorio de la Glk en la RCC, ya que al complementar mutantes *Glu⁻*, *Glk⁻* de *S. coelicolor* con un gen análogo a la Glk (*Zimomonas mobilis*) se restablece la capacidad de utilizar glucosa y la actividad de la enzima, pero no la sensibilidad a RCC (Angell *et al.*, 1994). Otro dato que apoya la participación de Glk en este mecanismo, consiste en que la sensibilidad a la RC ejercida por diversas fuentes de carbono como arabinosa, galactosa, citrato y glutamato, sobre la expresión de la glicerol cinasa y la agarasa, se pierde en mutantes de *S. coelicolor* con deleciones en el gen *glkA*, aún y cuando estas fuentes no sean metabolizadas vía glucosa cinasa (Kwakman & Postma, 1994). En mutantes *Dog^R* de *S. peuceitius var. caesi* insensibles a RC por glucosa, se han observado resultados similares para la producción de antraciclinas y β -galactosidasa, en presencia de otras fuentes de carbono represoras como glutamato y arabinosa (Segura *et al.*, 1996).

De acuerdo a estas evidencias, varios autores correlacionan la actividad de Glk con la RCC en *Streptomyces*. Sin embargo, no hay pruebas contundentes de su participación como represora en tal mecanismo de regulación. En análisis comparativo con otras proteínas regulatorias como *nagC*, *xylR* de *B. subtilis* y *xylR* de *L. pentosus*, se ha detectado que posee 52%, 55% y 52% de similitud en su secuencia de aminoácidos, respectivamente. Además estas proteínas tienen secuencias de unión a DNA en la región N-terminal de 84, 78 y 82 aminoácidos, respectivamente, que no posee la Glk (Angell *et al.*, 1992). A pesar de ello, se ha sugerido que esta proteína tiene un papel determinante en la represión por glucosa. Más que solo permitir el flujo de glucosa o la simple fosforilación del carbohidrato, se piensa que pudiera estar actuando como una proteína reguladora en la RCC, ya sea sola y/o formando un complejo con proteínas represoras y este complejo unirse a genes sensibles a represión por carbono, evitando su transcripción (Postma *et al.*, 1993; Angell *et al.*, 1994; Mahr *et al.*, 2000).

3.2.4.3 Mutantes *ccrA1* de *Streptomyces coelicolor* insensibles a represión catabólica por carbono
Ingram y colaboradores (1995) aislaron y caracterizaron una mutante de *S. coelicolor*, *ccrA1*, la cual afecta la expresión de varios promotores de operones regulados catabólicamente como: *galP1* (galactosa), *gyl* (glicerol) y *chi63* (quitina) sensibles a glucosa. Fenotípicamente, la mutante (en el locus *ccrA1*), difiere con las mutantes en *glkA*, ya que éstas pueden utilizar glucosa como única fuente de carbono y no son resistentes a DOG. Esta mutante muestra alteraciones en la expresión de estos promotores, sin embargo no tienen efecto sobre los promotores insensibles a RCC como el promotor *galP2*. También se observó en estas cepas, que la transcripción de *galP1* y

gyl, aumenta aproximadamente 4-5 veces en condiciones de represión o no represión. La expresión de *chi63* es muy baja en la cepa silvestre, sin embargo en presencia de la mutación *ccrA1* aumentó considerablemente, aunque *chi63* aún está sujeta a RCC (Ingram y Westpheling, 1995). Estos resultados sugieren que la mutación *ccrA1* afecta un gen cuyo producto puede estar involucrado en el mecanismo general de regulación por carbono en *S. coelicolor*. Sin embargo, no se sabe nada de esta mutación a nivel molecular, ni de su papel en la RCC.

3.2.4.4 Mutantes *bld* insensibles a represión catabólica por carbono

Mutantes de *S. coelicolor* incapaces de producir hifas aéreas, son conocidas como *bld* (calvas del inglés "bald"), en las cuales se han reportado al menos 10 loci involucrados (*bldA*, *bldB*, *bldC*, *bldD*, *bldF*, *bldG*, *bldH*, *bldI*, *bldK* y *bld261*). Además, algunas mutantes *bld* también pierden la capacidad de producir antibióticos y sensibilidad a RCC (Champness, 1988; Pope *et al.*, 1996). Existe especial interés en las mutantes *bldB*, porque su fenotipo es el más pleiotrópico, ya que estas cepas presentan insensibilidad a RC en operones involucrados en la utilización de galactosa, glicerol y agar. La complementación con *bldB* restaura la formación de hifas aéreas, la formación de esporas, la producción de antibióticos y la represión por glucosa (Pope *et al.*, 1996).

3.2.4.5 Represores específicos involucrados en la regulación por carbono en *Streptomyces*

En el género *Streptomyces*, se han evidenciado elementos proteicos que participan directamente en la RCC. En *S. lividans* se ha identificado un gen regulador, *regI*, que está involucrado en la represión de la α -amilasa. Este gen codifica para una proteína de 345 aminoácidos (RegI), la cual contiene motivos de unión a ADN (hélice-vuelta-hélice) en la región N-terminal. RegI muestra similitud con la familia de proteínas represoras LacI/GalR. Además muestra un 95% de identidad con MalR (represor de *malE* en *S. coelicolor*), y 31% de identidad con CcpA de *B. subtilis* (Nguyen *et al.*, 1997).

MalR de *S. coelicolor* A3(2), codifica para una proteína represora homóloga a la familia LacI/GalR. La transcripción de *malE* (gen requerido para la utilización de maltosa) es inducida por maltosa y reprimida por glucosa. La interrupción o delección del *malR* provoca una expresión constitutiva e insensibilidad a glucosa de *malE* (Wezel *et al.*, 1997). La proteína MalR parece ser un regulador de la inducción por sustrato y de la represión por glucosa en el metabolismo de la maltosa (Wezel *et al.*, 1997).

GylR es un represor transcripcional del operón *gyl* (para la utilización de glicerol) el cual, esta sujeto a RC. GylR contiene sitios de unión a DNA y tiene similitud con represores transcripcionales (Hindle y Smith, 1994). Cabe mencionar que otras mutaciones como *glkA*, *ccrA1* y *bld* afectan la RC del operón *gyl*. Parece que la regulación de dicho operón requiere de diversos reguladores tanto específicos como generales (Hindle y Smith, 1994). En la figura 7 se ilustran los diferentes elementos que se relacionan con la RCC en el género *Streptomyces*.

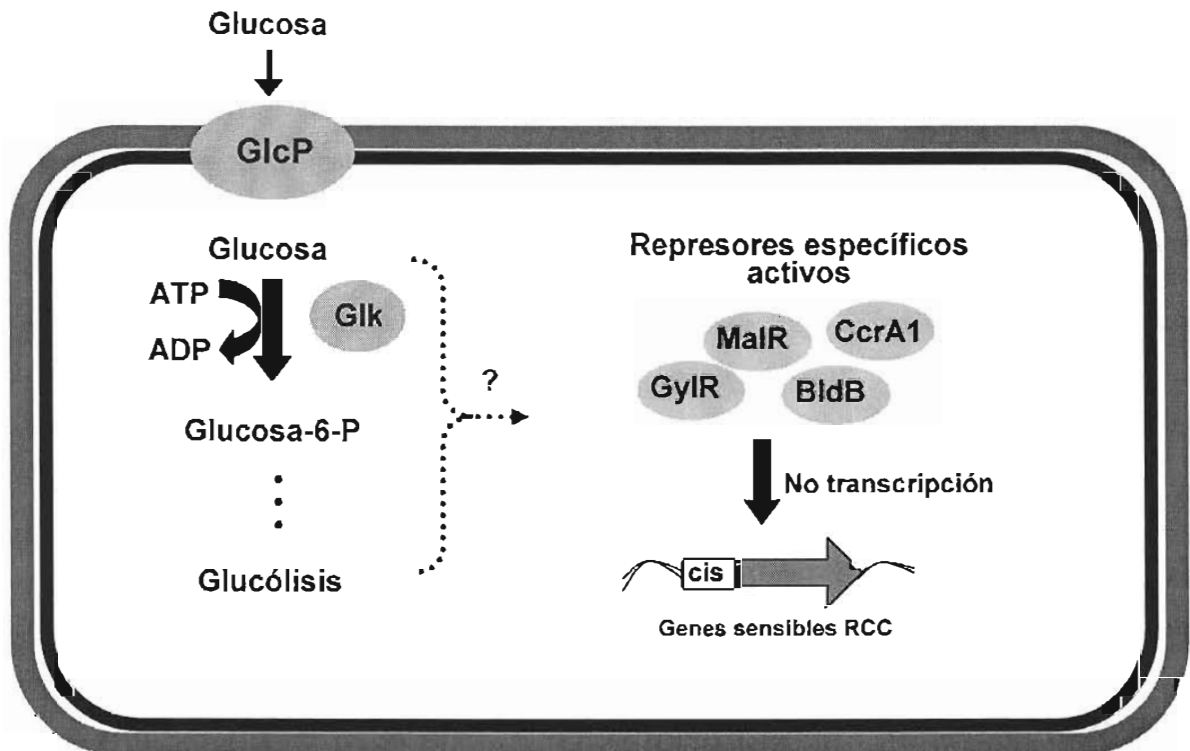


Figura 7. Represión catabólica por carbono en el género *Streptomyces*. El modelo muestra a las células en condiciones represoras por glucosa. Las líneas discontinuas indican que en ese proceso se tiene evidencia que en altas concentraciones de glucosa se generan señales, aún no determinadas (?) que probablemente activen a represores generales y específicos como MaIR, GylR, BldB, CcrA1, los cuales se unen a promotores sensibles a RCC (secuencias *cis*) evitando su expresión. Abreviaturas: GlcP, proteína transportadora de glucosa de tipo simporte H⁺; Glk, glucosa cinasa; MaIR, represor del operón *mat*; GylR, represor del operón *gyl*; BldB, regulador de la diferenciación morfo-fisiológica; CcrA1 regulador general de RC por glucosa.

4 Justificación

Poco se conoce de la represión catabólica por fuente de carbono en el género *Streptomyces*. Se ha sugerido la participación de diversos genes y sus correspondientes proteínas en la RCC, pero no ha sido posible conocer el papel de cada una de ellas. Actualmente, no existe un modelo que explique el mecanismo general de RCC en las bacterias Gram positivas de alto G-C. Mutantes (Dog^R) de *S. coelicolor*, aisladas por su capacidad de crecer en DOG (un análogo de la glucosa no metabolizable) presentan deficiencias en la actividad de Glk y en la sensibilidad a RCC. Cuando estas cepas Dog^R se complementan con el gen de *glkA*, se restablece la actividad de Glk, pero solo parcialmente la RCC. El restablecimiento completo de la RCC, se obtiene cuando se complementan con los genes *glkA* y *SCO2127* simultáneamente. Se ha propuesto que el gen *SCO2127* pudiera codificar para una proteína de transporte o una enzima involucrada en el metabolismo de glucosa, pero no hay evidencias que apoyen este hecho.

Por otro lado, en nuestro laboratorio se han aislado mutantes Dog^R de *S. peucetius* var. *caesius* que poseen un fenotipo similar a las mutantes de *S. coelicolor*. Sin embargo, nuestras mutantes son también deficientes en la incorporación de glucosa. En mutantes revertantes (Dog^S), aisladas a partir de una mutante Dog^R de *S. peucetius* var. *caesius*, se incrementa la actividad de Glk, comparada con la cepa parental. Además no se observa una correlación directa entre los niveles de la actividad de Glk y la RCC, ya que estas cepas aun son insensibles a RCC. Creemos que posiblemente existe otro elemento esencial para el restablecimiento de la sensibilidad a RC por glucosa en estas mutantes.

En *S. coelicolor*, se ha postulado que los genes *glkA* y *SCO2127* participan en la RC por glucosa, pero no se tiene evidencia del papel del gen *SCO2127*. Por ello, se considera de gran importancia, conocer el efecto de este gen en la RCC y determinar su posible interacción con *glkA* en la RCC. Se requiere de evidencia experimental que permita proponer un modelo que pueda explicar el posible papel de ambos genes en el fenómeno y de esta manera, contribuir al entendimiento de la RCC en el género *Streptomyces*.

5 Hipótesis

La Glk no es la única responsable de la RCC en *S. peucetius* var. *caesius*. La complementación de mutantes insensibles a RCC de este microorganismo, sólo se da cuando están presentes los productos génicos de *glkA* y *SCO2127* de *S. coelicolor*. El gen *SCO2127* no codifica para una permeasa de glucosa, por lo tanto, proponemos que *SCO2127* codifica para un regulador que es determinante en el mecanismo de RCC en *Streptomyces*.

6 Objetivo general

Evaluar el efecto de los genes *glkA* y *SCO2127* de *S. coelicolor* en la RCC en mutantes de *S. peucetius* var. *caesius* insensibles a RCC con deficiencias en el transporte de glucosa y en la actividad de Glk.

6.1 Objetivos Particulares

1. Determinar en *S. peucetius* var. *caesius* la existencia de posibles genes homólogos a *glkA* y a *SCO2127* de *S. coelicolor* y conocer si la organización genética de los mismos es similar en ambas especies.
2. Evaluar el efecto de los genes *glkA* y *SCO2127* de *S. coelicolor* en la RCC al determinar su papel en el transporte y en la actividad de Glk en mutantes de *S. peucetius* var. *caesius*.

7 Materiales y Métodos

7.1 Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas y los plásmidos utilizados en esta investigación están descritos en la tabla 3. Éstos, son mantenidos en la colección de cultivos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Tabla 3. Generalidades de las cepas y plásmidos utilizados		
<i>Cepas</i>	<i>Características</i>	<i>Referencia</i>
<i>S. coelicolor</i> M145	Cepa silvestre (Hopwood <i>et al.</i> , 1985)	L. Servín-González
<i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i> NRRL B-5337	Cepa original derivada de <i>S. peucetius</i>	Arcamone <i>et al.</i> , 1969
Dog ^R	Cepa resistente a DOG derivada de <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i> NRRL B-5337	Segura <i>et al.</i> , 1996
SDR-1	Dog ^R con el plásmido pSG200	Este trabajo
SDR-2	Dog ^R con el plásmido pSG210	Este trabajo
SDR-3	Dog ^R con el plásmido pIJ513	Este trabajo
Dog ^S -2	Cepa sensible a DOG derivada de la cepa Dog ^R	Ramos <i>et al.</i> , 2004
SDS-1	Dog ^S con el plásmido pSG200	Este trabajo
SDS-2	Dog ^S con el plásmido pSG210	Este trabajo
SDS-3	Dog ^S con el plásmido pIJ513	Este trabajo
Dog ^S -11	Cepa sensible a DOG derivada de la cepa Dog ^R	Ramos <i>et al.</i> , 2004
SDS-11	Dog ^S con el plásmido pSG200	Este trabajo
SDS-12	Dog ^S con el plásmido pSG210	Este trabajo
SDS-13	Dog ^S con el plásmido pIJ513	Este trabajo
<i>Plásmidos</i>	<i>Origen y características</i>	<i>Fuente</i>
pIJ513	Derivado de pIJ922 con un fragmento de 3.5 kb que contiene los genes <i>SCO2127</i> y <i>glkA</i> de <i>S. coelicolor</i> M145 (Ikeda <i>et al.</i> , 1984; Angell <i>et al.</i> , 1992)	L. Servín-González
pIJ486	Plásmido de alto número de copias (Kieser <i>et al.</i> , 2000).	L. Servín-González
pSG200	pIJ486 con el gen <i>glkA</i> de <i>S. coelicolor</i>	Este trabajo
pSG210	pIJ486 con el gen de <i>SCO2127</i> de <i>S. coelicolor</i>	Este trabajo

La obtención de esporas de las cepas de *Streptomyces* se realizó según Segura *et al.* (1996). El cultivo utilizado como inóculo para las diferentes determinaciones, se creció en 25 ml de medio YM complementado con glucosa al 0.4% (extracto de levadura, 0.4% y extracto de malta, 1.0% a pH 7.2) en matraces Erlenmeyer de 125 ml, inoculado con aproximadamente 10^8 esporas. Los cultivos se incubaron durante 72 h con agitación y temperatura constantes (180 rpm y 29° C). El micelio obtenido se lavó dos veces con solución salina isotónica al 0.85% (SSI) y se resuspendió en 5 ml de la misma solución (cultivo semilla). Todos los cultivos se inocularon con 5.0% (v/v) del cultivo semilla y se crecieron a 29° C con agitación constante (180 rpm).

7.2 Aislamiento de DNA total de *Streptomyces*

Para el aislamiento de DNA total de *S. peucetius* var. *caesius* y de *S. coelicolor* M145 se utilizó micelio cultivado en medio YEME (extracto de levadura, 0.3%; extracto de malta, 0.3%; glucosa, 1.0% y sacarosa, 34%) complementado con $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.1% y crecido durante 48 h. La obtención del DNA se realizó según el protocolo descrito por Kieser *et al.* (2000). Posteriormente se hizo un análisis de electroforesis para verificar la calidad del DNA total (Sambrook *et al.*, 1989).

7.3 Análisis de hibridación tipo Southern blot

Para determinar la existencia de posibles genes homólogos a *glkA* y a *SCO2127* de *S. coelicolor* M145 en *S. peucetius* var. *caesius* (conocer si la organización genética de dichos genes es similar en ambas cepas), se realizó un análisis de hibridación tipo Southern blot, utilizando como sondas los genes de *S. coelicolor* M145.

7.3.1 Generación de las sondas de los genes *glkA* y *SCO2127* de *S. coelicolor*.

Los fragmentos de los genes *SCO2127* y *glkA* utilizados como sondas para el análisis tipo Southern blot, se amplificaron por PCR usando como templado DNA total de *S. coelicolor* M145. Los cebadores utilizados se diseñaron con base en la secuencia de *SCO2127* y *glkA* reportada para *S. coelicolor* M145 (Angell *et al.*, 1992), los cuales cubren la región codificante del gen. Los oligonucleótidos para amplificar la sonda que corresponde a *SCO2127* fueron: Forward (5'-AGGAGTCCGTCTAGAGCGAAG-3') y Reverse (5'-GGCAAGCTTACCCGAGGC-3'). Para la sonda de la *glkA* fueron: Forward (5'-AATCTAGATGGGACTCACCATC-3') y Reverse (5'-GTAAGCTTCACATGATCGGGTC-3'). Los productos esperados fueron de 607 y 970 pb, respectivamente. Las condiciones del sistema de reacción se describen en la tabla siguiente.

Tabla 4. Sistema de reacción	
DNA total de <i>S. coelicolor</i> M145	Concentración final 100 ng
MgCl ₂	1.5 mM
Buffer 10X (Tris-HCl, 10 mM pH 8.3; KCl, 50 mM)	1X
Oligonucleótidos	
Forward (5')	0.2 μM
Reverse (3')	0.2 μM
DMSO (Dimetil sulfóxido)	10%
DNA polimerasa (Amplitaq de Applied Biosystems)	0.5 U
Volumen final	50 μl

Las condiciones en las cuales se llevó a cabo el PCR se describen en la figura siguiente.

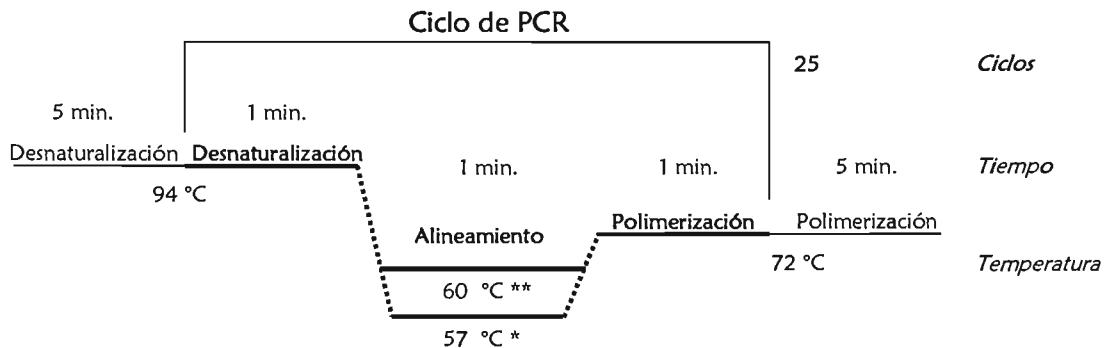


Figura 8. Ciclo de PCR. Se describen las condiciones del PCR para la amplificación de los fragmentos que se utilizaron como sondas de los genes: *SCO2127* y *glkA* de *S. coelicolor* M145. La temperatura de alineamiento para el fragmento correspondiente a *glkA* fue de 57° C* y para *SCO2127* fue de 60° C** respectivamente.

Posteriormente los fragmentos generados, se marcaron con digoxigenina-UTP con el sistema de marcaje “DIG High prime DNA labeling and detection starter kit II” (Roche) según especificaciones descritas por el fabricante.

7.3.2 Preparación del DNA total de *Streptomyces*

El DNA de ambas cepas fue digerido con *Bam* HI, *Eco* RI, *Pst* I y *Xho* I durante 2 h. Posteriormente, 10 μg de cada muestra del DNA digerido, se separaron en un gel de agarosa al 1% bajo condiciones estándar (Sambrook *et al.*, 1989).

7.3.3 Transferencia e hibridación

La desnaturalización y neutralización del gel se llevó a cabo según lo descrito por Sambrook *et al.* (1989). La transferencia del DNA se llevó a cabo por capilaridad con 20× SSC (citrato de sodio, 8.82% y cloruro de sodio, 17.53% a pH 7) sobre una membrana de nylon positivamente cargada (Hybond-N⁺ de Amersham).

El ensayo de hibridación con ambas sondas se llevó a cabo a 62° C durante 12 h, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (DIG High prime DNA labeling and detection starter kit II de Roche).

Posteriormente se realizaron dos lavados por 5 min en solución de 2× SSC y 0.1% SDS a 68 °C con agitación constante y dos veces más en 0.5× SSC y 0.1% SDS a la misma temperatura y agitación.

El revelado se realizó utilizando fosfatasa alcalina-conjugada con anti-digoxigenina y CSPD (sustrato quimioluminiscente para fosfatasa alcalina) como sustrato emisor de luz, exponiendo la membrana a una película de autoradiografía.

7.4 Subclonación de los genes *SCO2127* y *glkA* de *S. coelicolor* M145

7.4.1 Amplificación de los genes *SCO2127* y *glkA* de *S. coelicolor* M145 por reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR)

Los genes *SCO2127* y *glkA*, se amplificaron por PCR usando como templado DNA total de *S. coelicolor* M145. Los cebadores utilizados se diseñaron con base en la secuencia reportada para *S. coelicolor* M145 de los genes *SCO2127* y *glkA* (Angell *et al.*, 1992), los cuales cubren el gen completo, desde el promotor hasta el término de la transcripción. Los oligonucleótidos para amplificar *SCO2127* fueron: Forward (5'-CACGAGATCTGGACGAACG-3') y Reverse (5'-GCCAAGCTTCCGGAGTCGG-3'). Para el gen *glkA* fueron: Forward (5'-CGGAAGCTTCCGGAGTCGG-3') y Reverse (5'-AGGAGTCCGTCTAGAGCGAAG-3'). Ambos pares de oligonucleótidos contienen sitios de restricción para *Bgl* II y *Hind* III. Los productos esperados fueron de 694 y 1122 pb, respectivamente. El sistema de reacción del PCR se realizó como se describe en la tabla 3 y las condiciones de PCR se describen en figura siguiente.

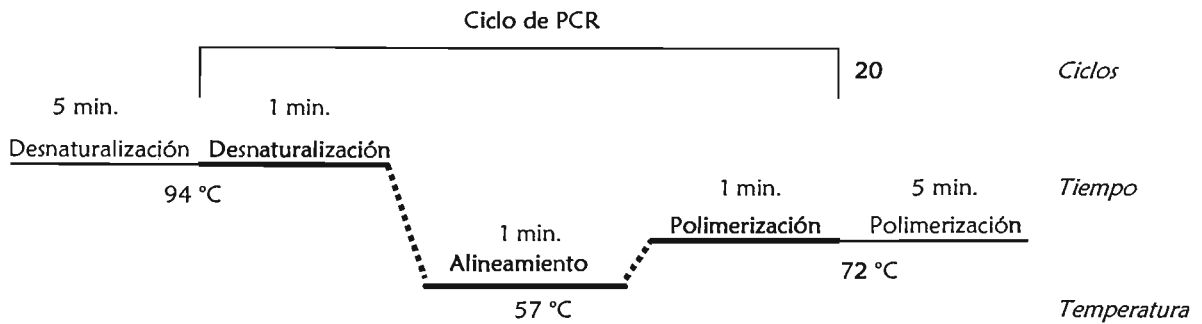


Figura 9. Ciclo de PCR. Condiciones del PCR para la amplificación de los genes *SCO2127* y *gkA* de *S. coelicolor* M145. Ambos fragmento se amplificaron a 57° C de temperatura de alineamiento.

Los fragmentos obtenidos fueron digeridos y analizados por electroforesis en condiciones estándar (Sambrook *et al.*, 1989). Posteriormente se purificaron del gel con el sistema de Qiagen (QIAquick gel Extraction Kit). Se ligaron en pJ486 en los sitios *Bam* HI y *Hind* III. Los plásmidos generados (pSG200 y pSG201) se utilizaron para transformar a las cepas mutantes de *S. peucetius* var. *caesius* (Dog^R, Dog^S-2 y Dog^S-11).

7.4.2 Obtención de recombinantes de *S. peucetius* var. *caesius*

7.4.2.1 Obtención de protoplastos.

Los cultivos utilizados para la obtención de protoplastos, se crecieron hasta el inicio de la fase estacionaria en 50 ml de medio YEME complementado con MgCl₂.6H₂O al 0.1% y glicina al 0.5%.

El micelio obtenido de 100 ml de cultivo se lavó 2 veces con 15 ml de sacarosa al 10.3% y se resuspendió en 5 ml de buffer L (sacarosa, 10.3%; buffer TES, 0.573% a pH 7.2; K₂SO₄, 0.0025%; solución de elementos traza*, 0.01 ml; KH₂PO₄, 0.0005%; MgCl₂.6H₂O%; CaCl₂.2H₂O 0.0368%) complementado con lisozima (1.5 mg/ml), se incubó a 29 °C de temperatura hasta la formación de protoplastos (aproximadamente 1 h). Posteriormente, se adicionaron 5 ml de buffer P (sacarosa, 10.3%; K₂SO₄, 0.025%; complementado con KH₂PO₄, 0.005%; MgCl₂.6H₂O%; CaCl₂.2H₂O, 0.368%; buffer TES, 0.573% a pH 7.2; solución de elementos traza 0.01 ml) y se filtraron dos veces en columnas de algodón. Los protoplastos se sedimentaron por centrifugación a 3000 rpm por 10 min y el pellet se resuspendió en 1 ml de buffer P (Kieser *et al.*, 2000).

* La solución de elementos traza se preparó según lo reportado por Kieser *et al.*, 2000.

7.4.2.2 Transformación y regeneración de protoplastos

Se utilizaron 250 μl de la suspensión de protoplastos para cada transformación, la cual se concentró por centrifugación (3000 rpm/5 min) a un volumen final de 50 μl en buffer P. Se adicionaron hasta 5 μl de DNA y se homogenizó inmediatamente. Posteriormente se agregaron 200 μL de buffer T con PEG-1000 (3:1) y se volvió a homogenizar suavemente.

Se platearon 100 μl en el medio de regeneración R6 (casaminoácidos, 0.1%; glucosa, 1%; sacarosa, 20%; K_2SO_4 , 0.01%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.005% y agar, 2.2% complementado con $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.13%; L-Prolina, 0.15%; Tris-buffer pH 7.2, 0.15% y solución de elementos traza 0.2 ml) (Baltz y Matsushima, 1981). Las placas se incubaron durante 40 h y posteriormente se adicionó 1 ml de solución de sacarosa al 10.3% con 50 μg de trioestreptón y se incubaron durante 48 h más.

Las cepas aisladas se resembraron tres veces en medio YM sólido complementado con glucosa al 0.4% y tioestreptón (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se incubaron durante 120 h. Las esporas se cosecharon y se conservaron en glicerol al 20% como lo reportan Kieser *et al.* (2000).

7.5 Determinación de la sensibilidad a represión catabólica por carbono

7.5.1 Sensibilidad a represión catabólica por glucosa sobre la producción de antraciclinas

Para conocer si las cepas eran sensibles a RC por glucosa, se monitoreó la producción de antraciclinas específicas, en cultivos crecidos en presencia de concentraciones represoras (500 mM) y no represoras de glucosa (100 mM). Las cepas se cultivaron hasta las 96 h en 50 ml de YM complementado con glucosa en matraces de 250 ml.

La cuantificación de antraciclinas se realizó en muestras de 1 ml del cultivo. Éstas se centrifugaron y se separó el micelio. Posteriormente al micelio, se le añadió 1 ml de solución de extracción, SE [acetona: H_2SO_4 0.1 N (5:1)], agitando en vortex durante 120 s. Posteriormente, la muestra se centrifugó para separar el sobrenadante. Este procedimiento se repitió hasta que en la SE resultante no se detectó color. Las antraciclinas extraídas se cuantificaron espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 495 nm usando un coeficiente de extinción de 220 (Dekleva *et al.*, 1985). Para calcular la producción de antraciclinas con relación a la masa celular, se cuantificó la proteína total por el método de Lowry (1959).

7.5.2 Sensibilidad a represión catabólica por glucosa sobre la actividad de β -galactosidasa

La actividad de la enzima β -galactosidasa se determinó espectrofotométricamente usando *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) como sustrato (Eckardt *et al.*, 1987), correspondiendo cada unidad de actividad enzimática a 1 nmol de ONPG hidrolizado a 37°C por min/mg de proteína del cultivo. Las muestras de 1 ml, se centrifugaron a 7,000 rpm durante 10 min para separar el micelio, el cual se lavó con 1 ml de amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M pH 7.5 y se resuspendió en 1 ml de este mismo amortiguador. Se añadieron 20 μ l de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.1 M en β -mercaptoetanol 4.5 M y 40 μ l de tolueno. La mezcla se agitó y se preincubó durante 5 min a 37°C con agitación periódica. La reacción se inició añadiendo 400 μ l de ONPG (4 mg/ml) y se tomaron muestras de 0.5 ml a los 10, 20 y 30 min de iniciada la reacción. Ésta se detuvo añadiendo 0.5 ml de Na_2CO_3 1 M al sistema de reacción. El producto generado de la hidrólisis del ONPG se cuantificó a 420 nm ajustando a cero con amortiguador de fosfatos (Segura *et al.*, 1996). Para determinar la actividad específica de la β -galactosidasa, se cuantificó la proteína total por el método de Lowry (1959).

7.6. Determinación de proteína por el método de Lowry

Se tomó 1 ml del cultivo, se separaron las células por centrifugación y se adicionó 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) para romper las células. Las muestras se congelaron a -20° C al menos 24 h. Éstas se descongelaron y se centrifugaron para eliminar el TCA, luego se resuspendieron en 1 ml de NaOH 0.4 N y se incubaron a 37° C por 2 h, se tomó 0.1 ml del hidrolizado y se aforó a 1 ml con agua destilada. Posteriormente se añadieron 5 ml del reactivo de Lowry, mezclando perfectamente y dejando reposar durante 10 minutos. Posteriormente se adicionó 0.5 ml del reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu diluido 1:3, se agitó perfectamente y se dejó reaccionar durante 30 min a temperatura ambiente. Después se midió la absorbancia a 595 nm contra un blanco de 1 ml de agua, tratado de la misma manera que las muestras. Para calcular la concentración de proteína contenida en las muestras, se interpoló la lectura obtenida para cada una de ellas en una curva estándar de albúmina sérica bovina (ASB) (Lowry, 1959).

7.7 Determinación de la actividad de Glk.

La actividad de Glk se determinó en extractos libres de células. El micelio utilizado se cultivó durante 48 h, en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio YM complementado con 100 mM de glucosa.

Para la obtención de los extractos enzimáticos se prepararon polvos de acetona del micelio, los cuales, posteriormente se trituraron con hielo seco para romper las células, una vez rotas, se resuspendieron en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.2. Dichas muestras se centrifugaron a 45,000 rpm a 4°C durante 1 h para separar los restos celulares.

La cuantificación de dicha actividad fue monitoreada espectrofotométricamente midiendo la reducción de NADP a 340 nm, en una reacción acoplada con glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6PDH) ver figura 10. El sistema de reacción contenía Tris-HCl 100 mM, pH 7.5; D-glucosa, 10 mM; MgCl₂, 5 mM; ATP, 1 mM y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6PDH), 0.7 U/ml a temperatura ambiente, como previamente lo reportaron Imriskova *et al.* (2001). La actividad se expresó como unidades por miligramo de proteína total del extracto. Una unidad es definida como la cantidad de enzima que produce 1 nmol de NADPH por min. Para calcular la actividad específica de la enzima, se midió la cantidad de proteína por el método de Lowry (1959).



Figura 10. Reacción acoplada para la determinación de la Glk.

7.8 Transporte de azúcares

La incorporación de glucosa y galactosa se determinó en cultivos de 36 h, precrecidos en matraces Fernbach de 2 l con 500 ml en medio CD (extracto de levadura, 0.03%; MOPS, 100 mM; NaCl, 0.5%; K₂HPO₄, 0.03%; (NH₄)₂SO₄, 0.113%; MgSO₄·7H₂O, 0.05%; FeSO₄·7H₂O, 0.002%; ZnSO₄·7H₂O, 0.005%; MnCl₂·4H₂O, 0.0001%; CoCl₂·6H₂O, 0.0001%) complementado con glutamato, glucosa y/o galactosa (Escalante *et al.*, 1999).

El cultivo precrecido se lavó dos veces con SSI y se eliminó el exceso de líquido sobre papel filtro. A partir de ese cultivo, se pesaron 250 mg de peso húmedo del micelio. Posteriormente se transfirió a 4.5 ml de SSI estéril y se incubó a 29° C durante 10 min. La cuantificación inició por la adición de una mezcla de 5 μ Ci de D-[U-¹⁴C]glucosa o de D-[U-¹⁴C]galactosa (3.00 Bq mmol⁻¹) (Amersham) en 475 μ l de glucosa y/o galactosa 10 mM fría (sistema de reacción). A cada tiempo (10, 20, 30 y 60 s), se filtró la muestra en membranas de 0.45 μ m (Millipore, tipo HA) e inmediatamente se lavaron con agua fría para detener la reacción. La radioactividad fue determinada en solución de centelleo comercial (EcoLite(+)) de ICN). En la tabla 5 se describen las condiciones de precrecimiento del micelio y las condiciones del sistema de reacción que se utilizó para la incorporación de dichos azúcares.

Tabla 5. Condiciones utilizadas para determinar la incorporación de azúcares		
Azúcar transportado	^A Precrecimiento del cultivo	^B Sistema de reacción
Glucosa	Glucosa 100 mM	Glucosa 10 mM
Galactosa	Galactosa 100 mM	Galactosa 10 mM
	Galactosa 100 mM	Galactosa 10 mM más glucosa 2 mM
	Galactosa 100 mM	Galactosa 10 mM más glucosa 5 mM
	Galactosa más glucosa 330 mM	Galactosa 10 mM
	Glutamato	Galactosa 10 mM

^A El precrecimiento se llevó en medio CD adicionado con diferentes concentraciones de fuentes de carbono y ^B el sistema de reacción se refiere a las condiciones donde se transfirió el micelio y se midió la incorporación de azúcares.

Para calcular el transporte de glucosa con respecto al crecimiento, se cuantificó la masa celular por peso seco. Para ello, se pesaron 250 mg de micelio (peso húmedo) para cada muestra y se colocaron en charolas de aluminio secas y previamente pesadas. El micelio se secó a una temperatura de 50 °C, hasta obtener peso constante (aproximadamente 14 h) (Escalante *et al.*, 1999).

7.9 Análisis de hibridación tipo dot blot de RNA total.

7.9.1 Preparación de células para el aislamiento de RNA total

Los cultivos utilizados para la extracción de RNA total (RNA_{tot}) fueron crecidos hasta la mitad de la fase logarítmica (24 h) en medio YM adicionado con 2 concentraciones de glucosa (100 mM y 500 mM) y con glicina al 0.5%. Todas las cepas se crecieron bajo las mismas condiciones (*S. peucetius* var. *caesius*, Dog^R y SDR-2), solo que al cultivo de la transformante SDR-2, se le

adicionó 50 µg de tioestreptón/ml para mantener la presión selectiva. Posteriormente las células se cosecharon en frío (para evitar variaciones en el estado fisiológico). El paquete celular se separó por centrifugación (5000 rpm durante 10 min), luego se lavaron una vez y se resuspendieron en solución salina fisiológica (en frío) hasta su filtración.

7.9.2 Preparación de polvos de acetona.

La suspensión celular se filtró a través de filtros Whatman del número 41 (filtración rápida) previamente estériles. Se dejó secar y se agregó un volumen de acetona fría, se dejó secar al vacío y los polvos formados se mantuvieron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

7.9.3 Extracción de RNA total.

A partir de los polvos de acetona, se aisló el RNA_{tot} con una solución monofásica de fenol e isocianato (trizol de Life Technologies) de acuerdo al método descrito por Chomczynski y Sacchi (1987). Para ello, se trituran 50 mg de polvos de acetona en un mortero frío y estéril. Posteriormente se agregó 1 ml de trizol, se dejó incubando 5 min a temperatura ambiente y se adicionaron 0.2 volúmenes de cloroformo, se homogeneizó por 2 min y se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y ésta se extrajo con fenol-cloroformo (1:1). El RNA_{tot} se precipitó con 0.5 volúmenes de alcohol isopropílico por 1 volumen de trizol y el pellet obtenido se lavó dos veces con etanol al 70%. Finalmente se dejó secar y se resuspendió en agua libre de RNAsas.

Para quitar el polisacárido de la fase acuosa se adicionó un volumen de acetato de potasio 2 M, se incubó por 30 min y se centrifugó a 13,000 rpm/20 min. Al sobrenadante se le adicionó alcohol isopropílico, luego se incubó por 45 min y se centrifugó a 13,000 rpm/20 min. Posteriormente el pellet se lavó dos veces con etanol al 70% y se dejó secar. El pellet obtenido se disolvió en 400 µl de agua libre de RNAsas, se adicionaron 100 µl de LiCl 10 M y 500 µl de etanol al 100%, se incubó durante 2 h y se centrifugó a 13,000 rpm/20 min. Por último el pellet se lavó 2 veces con etanol al 70% y se resuspendió en agua libre de RNAsas.

El RNA_{tot} aislado, se trató con DNAsa I (Amp. Grade, Invitrogen) a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1h, para eliminar posible DNA contaminante, terminada la reacción se inactivó la DNAsa I, calentando a $65\text{ }^{\circ}\text{C}/10\text{ min}$. Posteriormente la solución de RNA/DNAsa se precipitó con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M y un volumen de isopropanol, el precipitado se lavó 2 veces con etanol al

70% y la pastilla de RNA seca se resuspendió en agua libre de RNAsas. La concentración se determinó espectrofotométricamente y su calidad por electroforesis en gel de agarosa con formamida de acuerdo a lo descrito por Kieser *et al.* (2000). El RNA se conserva a -70 °C hasta 15 días.

7.9.4 Hibridación tipo dot blot de RNA total

El RNA se ajustó a una concentración de 1 µg/µl en buffer GFP (glioxal 1 M, buffer de fosfatos 10 mM, formamida 70%) y luego se calentó a 55 °C por 15 min para su desnaturalización. La solución de RNA desnaturalizado, se mantuvo en baño de hielo hasta su aplicación a las membranas Hybond-N⁺ (Amersham).

Para la detección de RNAm del gen *glkA* se utilizó la sonda de *S. coelicolor* M145 de aproximadamente 900 pb (anteriormente descrita para la hibridación tipo Southern blot). El ensayo de hibridación con la sonda se llevó a cabo a 54 °C durante 12 h de acuerdo a las instrucciones del proveedor (DIG High prime DNA labeling and detection starter kit II de Roche). El revelado se realizó como se describió anteriormente para la hibridación tipo Southern blot. La señal de hibridación se cuantificó por densitometría.

7.10 Reproducibilidad de los resultados.

Los resultados mostrados se realizaron por lo menos 3 veces en experimentos independientes realizados por triplicado. Las variaciones observadas fueron constantes siempre menores del 10%.

8 RESULTADOS

8.1 Amplificación por PCR de los fragmentos de los genes *glkA* y *SCO2127* de *S. coelicolor* utilizados como sondas.

Para amplificar los fragmentos de los genes *SCO2127* y *glkA* de *S. coelicolor* M145 y obtener las sondas para el análisis tipo Southern y Northern blot, se utilizaron oligonucleótidos que cubren la parte codificante de cada gen y DNA total de *S. coelicolor* como templado. Estos fragmentos corresponden a 607 y 970 pb, respectivamente. En la figura 11 se ilustra la parte que corresponde a la región amplificada y el análisis electroforético de cada fragmento, en el cual se puede observar que corresponden al tamaño esperado.

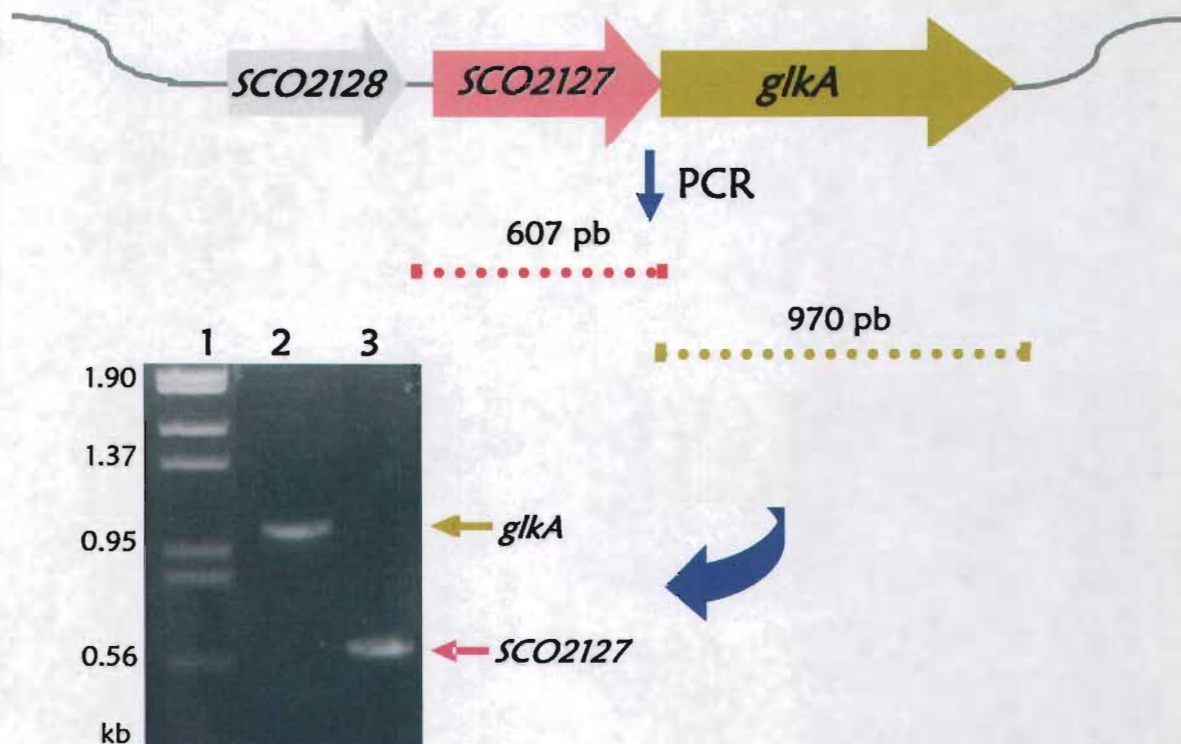


Figura 11. Amplificación de los fragmentos de los genes *SCO2127* y *glkA* de *S. coelicolor* utilizados como sondas. En la fotografía se muestra el marcador de peso molecular, (1); el fragmento del gen *glkA*, (2) y el fragmento del gen *SCO2127*, (3).

8.2 Presencia de posibles genes homólogos a *glkA* y a *SCO2127* de *S. coelicolor* en *S. peucetius* var. *caesius* y su organización genética

Como etapa preliminar fue esencial conocer la presencia de genes homólogos a *glkA* y *SCO2127* en *S. peucetius* var. *caesius*. En análisis de hibridación tipo Southern blot, se observó hibridación de los genes *glkA* y *SCO2127* de *S. coelicolor* con el DNA de *S. coelicolor* (A), (utilizado como

control) y con el DNA de *S. peucetius* var. *caesius* (B) (Fig.12). Adicionalmente, puede observarse que *S. peucetius* var. *caesius* hibrida con ambas sondas, aunque con menor intensidad que en *S. coelicolor*.

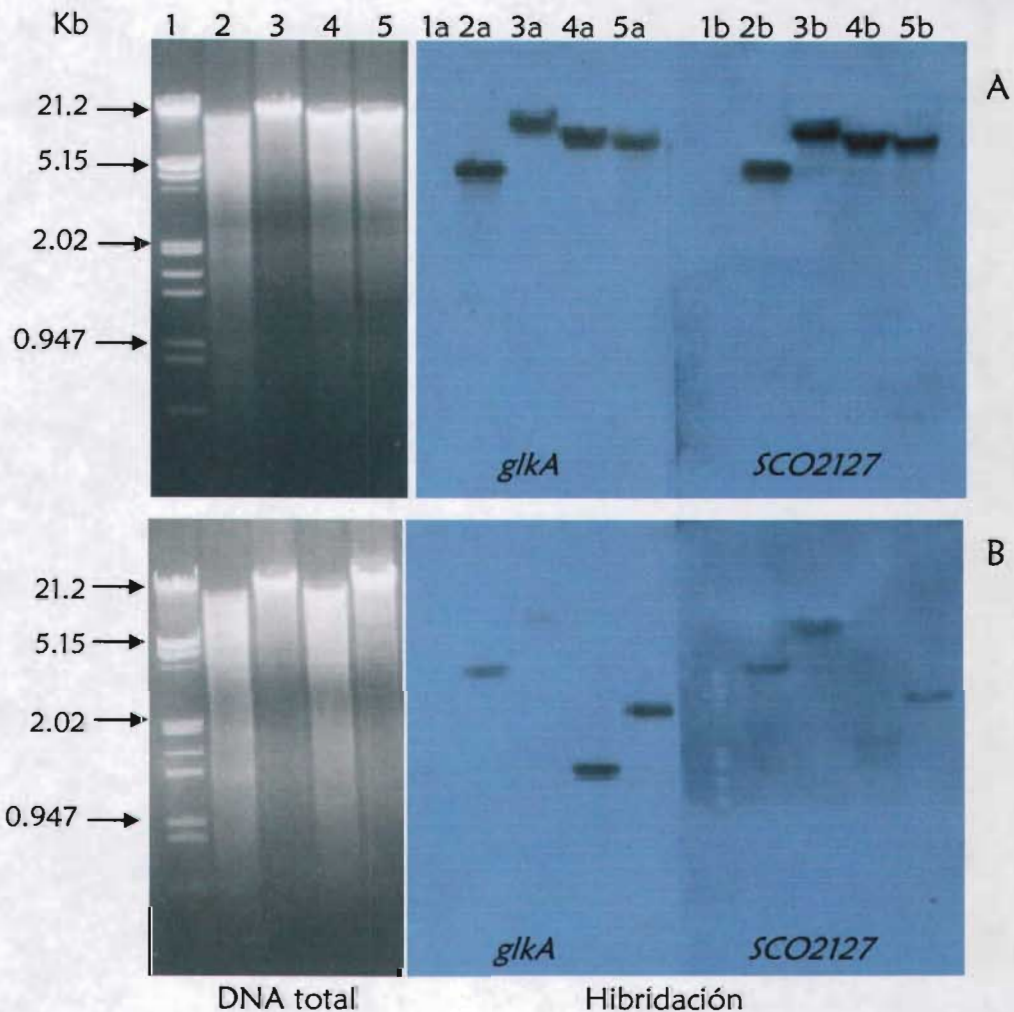


Figura 12. Hibridación tipo Southern blot con DNA total de *S. coelicolor* M145 (control) (A) y de *S. peucetius* var. *caesius* (B). Se utilizaron como sondas los genes *glkA* (a) y *SCO2127* (b) de *S. coelicolor* M145. (1), Marcador de peso molecular. El DNA total fue digerido con *Bam* HI, (2); *Eco* RI, (3); *Pst* I, (4) y *Xho* I, (5); respectivamente.

Como se ilustra en la misma figura (12), en *S. peucetius* var. *caesius* el perfil de hibridación para *glkA* y *SCO2127* es idéntico, mostrando que éstos se encuentran cercanos. Además por el fragmento más pequeño (aproximadamente de 1.5 kb), con el cual hibridaron ambas sondas, posiblemente estos genes estén adyacentes, formando parte del mismo operón, lo cual sugiere que la organización genética es similar a la reportada para *S. coelicolor*.

8.3 Clonación de los genes *glkA* y *SCO2127* de *S. coelicolor* M145

Para este propósito los genes se amplificaron por PCR, diseñando los cebadores con base en la secuencia reportada para *S. coelicolor* (Angell *et al.*, 1992) y utilizando DNA total de *S. coelicolor* como templado.

Los fragmentos obtenidos (*glkA* y *SCO2127*) que incluyen el promotor, se clonaron por separado en el plásmido pIJ486, obteniéndose a los plásmidos pSG200 y PSG210 como se ilustra en la figura de abajo.

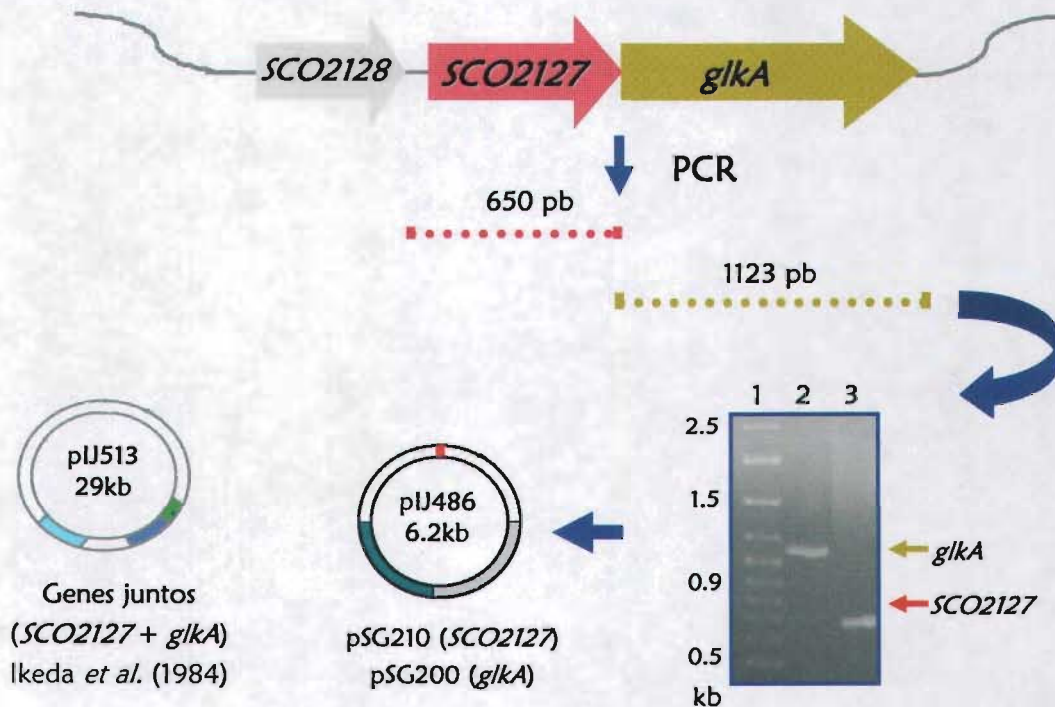


Figura 13. Fragmentos amplificados de los genes *glkA* y *SCO2127* se clonaron en pIJ486 (generando los plásmidos pSG200 y PSG210, respectivamente). En la fotografía se muestra el análisis de electroforesis de los fragmentos amplificados; (1), Marcador de peso molecular; (2) gen *glkA* y (3), gen *SCO2127*.

8.4 Transformación de las mutantes Dog de *S. peucetius* var. *caesius* insensibles a RCC

Los protoplastos de las cepas Dog se transformaron con los plásmidos pIJ513, pSG200 y pSG210 que contienen a los genes *glkA* y *SCO2127* juntos y por separado, respectivamente. Las cepas generadas se platearon en medio R6 y se incubaron durante 48 h, posteriormente se adicionó 1 ml de sacarosa al 10.3% con 50 μ g de tioestreptón y se incubaron durante 48 h más. Posteriormente las recombinantes se sembraron en medio completo (YMG) bajo presión selectiva (tioestreptón). Después de varias generaciones los plásmidos correspondientes (pSG200, pSG210 y pIJ513) fueron recuperados de estos cultivos.

8. 5 Caracterización de las mutantes Dog con los genes *SCO2127* y *glkA*

8.5.1 Sensibilidad a la represión por glucosa

Se ha demostrado que la utilización de glucosa afecta la expresión de una gran gama de genes, entre los que podemos mencionar a aquellos involucrados en el transporte y en la utilización de fuentes de carbono alternativas, como por ejemplo la lactosa (Hodgson, 1982; Smith & Chater, 1988; Mattern *et al.*, 1993), así como en la síntesis de enzimas extracelulares y metabolitos secundarios (Delic *et al.*, 1992; Servín-González *et al.*, 1994; Segura *et al.*, 1996).

Por otro lado se ha reportado que en mutantes Dog^R de *S. coelicolor*, que presentan deficiencias en la actividad de Glk y en la sensibilidad a RCC, recuperan el fenotipo silvestre, cuando son complementadas con un fragmento que posee los genes *glkA* y *SCO2127* (Angell *et al.*, 1992). A pesar de lo anterior, no se conoce cual es el papel de dichos genes en la RCC en *Streptomyces*. Por ello se decidió estudiar el efecto de estos genes en dicho fenómeno, sobre el metabolismo primario (actividad de β -galactosidasa) y secundario (producción de antraciclinas) en mutantes Dog de *S. peucetius* var. *caesius* (ver sus características en la tabla 2).

8.5.1.1 Producción de antraciclinas de las cepas de *S. peucetius* var. *caesius*

Para evaluar el efecto de los genes *SCO2127* y *glkA* en la RCC, se cuantificó la producción de antraciclinas, en cultivos de 120 h crecidos en medio YM complementado con 500 y 100 mM de glucosa, (condiciones represoras y no represoras, previamente establecido). En la tabla 6 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 6. Producción de antraciclinas en altas y bajas concentraciones de glucosa

Cepa	Inserto	Producción de Antraciclinas (μg /mg proteína)		
		100 mM Glu	500 mM Glu	RCC
Original		127.73 \pm 10.33	6.71 \pm 0.04	S*
Dog ^R		547.08 \pm 22.58	235.45 \pm 7.12	R+
SDR-1	<i>glkA</i>	45.49 \pm 4.67	7.39 \pm 0.23	S
SDR-2	<i>SCO2127</i>	4.91 \pm 0.34	5.38 \pm 0.38	S
SDR-3	<i>SCO2127+glkA</i>	20.29 \pm 0.60	14.05 \pm 0.30	S
Dog ^S -2		262.28 \pm 3.15	163.86 \pm 15.87	R
SDS-1	<i>glkA</i>	214.08 \pm 1.12	108.04 \pm 0.93	R
SDS-2	<i>SCO2127</i>	4.28 \pm 0.16	3.15 \pm 0.32	S
SDS-3	<i>SCO2127+glkA</i>	21.72 \pm 2.61	6.22 \pm 0.06	S
Dog ^S -11		139.58 \pm 5.32	67.19 \pm 6.56	R
SDS-11	<i>glkA</i>	1.67 \pm 0.15	2.14 \pm 0.07	S
SDS-12	<i>SCO2127</i>	7.67 \pm 0.67	5.00 \pm 0.51	S
SDS-13	<i>SCO2127+glkA</i>	10.74 \pm 1.78	5.97 \pm 0.49	S

La sensibilidad a RCC se determinó sobre la producción de antraciclinas en cultivos crecidos en altas concentraciones de glucosa 500 mM. Sensibilidad (S*), resistencia (R+) y represión catabólica por fuente de carbono (RCC).

Como se puede observar en la tabla anterior, a excepción de la cepa Dog^S-2 con el plásmido pSG200 (que contiene el gen *glkA*), todas las recombinantes mostraron sensibilidad a RC por glucosa. Dicho efecto fue más claro cuando se utilizó 500 mM de glucosa. Cabe mencionar que las cepas con el plásmido sin inserto, no mostraron diferencias en la sensibilidad a RCC con respecto a las mutantes sin el vector, mostrando que el efecto observado es debido a la presencia de los genes *SCO2127* y *glkA*.

8.5.1.2 Determinación de la actividad de β -galactosidasa.

En *S. peucetius* var. *caesius* se ha demostrado que la presencia de glucosa ejerce RC sobre la actividad de enzimas del metabolismo primario como β - galactosidasa y xilosa isomerasa. En la cepa Dog^R insensible a RCC, la actividad de β -galactosidasa es similar en ausencia o presencia de glucosa (100 ó 330 mM), evidenciando su resistencia a RCC (Segura *et al.*, 1996).

Con el fin de observar el efecto de los genes *SCO2127* y *glkA* sobre la síntesis de β -galactosidasa en la cepa *Dog^R*, en la figura 14 se muestra la actividad obtenida en las cepas: original, *Dog^R* y en la misma cepa con los plásmidos pSG200 (*glkA*), pSG210 (*SCO2127*) y pIJ513 (*SCO2127+glkA*).

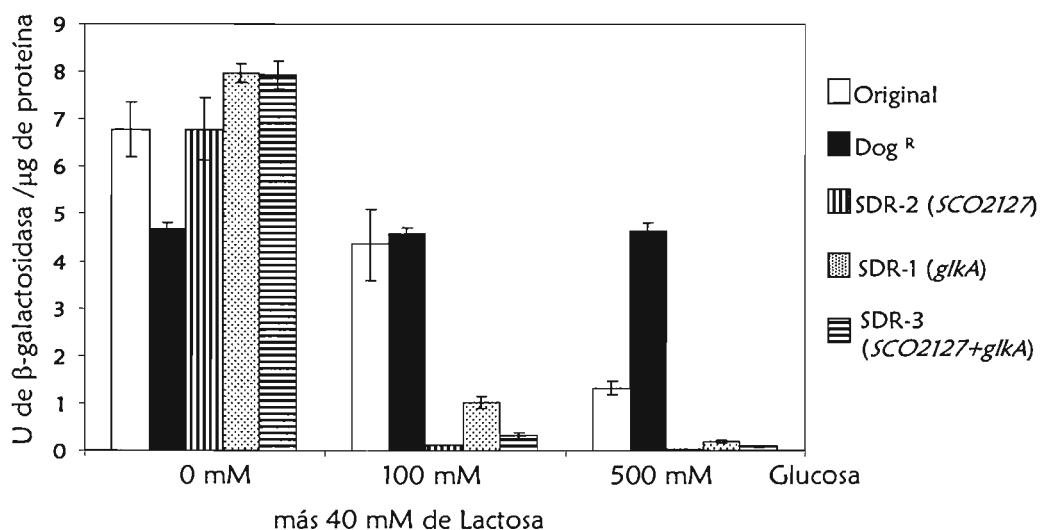


Figura 14. Actividad específica de β -galactosidasa en cultivos crecidos con lactosa sola y con lactosa más glucosa 100 y 500 mM, respectivamente, en la cepa original, la mutante *Dog^R* y ésta misma con los genes *SCO2127* (SDR-2), *glkA* (SDR-1) y *SCO2127+glkA* (SDR-3).

Como se puede observar en esta figura, la cepa original mostró una disminución considerable en la síntesis de β -galactosidasa, en presencia de concentraciones altas de glucosa (500 mM) adicionada con lactosa (40 mM), mientras que la mutante *Dog^R* fue insensible a esta condición de represión. Por otro lado, en las cepas parentales de *Dog^R* con los plásmidos pSG200, pSG210 y pIJ513 (SDR-1, SDR-2 y SDR-3), se observó una baja actividad de β -galactosidasa en condiciones no represoras de glucosa (100 mM) adicionada con lactosa (12.87, 1.88 y 4.06%, respectivamente), comparada con la actividad de los cultivos crecidos solo con lactosa. Cabe mencionar que estas mismas cepas, en altas concentraciones de glucosa (500 mM), mostraron aún mayor sensibilidad (2.51, 0.41 y 1.49%, respectivamente). Es importante señalar que la hipersensibilidad a glucosa que mostraron las recombinantes sobre la actividad de β -galactosidasa, también se vio reflejada sobre la producción de antraciclinas. No obstante, en medio completo (YM) en ausencia de glucosa, hubo producción de la enzima y de antraciclinas, evidenciado que el efecto es por la presencia de glucosa.

8.5.2 Transporte de glucosa

Considerando que el metabolismo de la glucosa inicia con su incorporación a la célula, investigamos la posible relación entre la RCC y el transporte de glucosa en las recombinantes. En la tabla 7 se muestra el fenotipo.

Tabla 7. Transporte de glucosa en las cepas de *S. peucetius* var. *caesius*

Cepa	Inserto	Transporte de glucosa $\mu\text{mol/mg}$ peso seco	%	RCC
Original		2.20 ± 0.194	100	S
Dog ^R		1.15 ± 0.049	51	R
SDR-1	<i>glkA</i>	1.09 ± 0.029	49	S
SDR-2	<i>SCO2127</i>	2.41 ± 0.060	108	S
SDR-3	<i>SCO2127+glkA</i>	2.49 ± 0.050	113	S
Dog ^S -2		0.40 ± 0.019	18	R
SDS-1	<i>glkA</i>	0.44 ± 0.030	19	R
SDS-2	<i>SCO2127</i>	1.19 ± 0.026	54	S
SDS-3	<i>SCO2127+glkA</i>	1.35 ± 0.020	61	S
Dog ^S -11		1.58 ± 0.013	71	R
SDS-11	<i>glkA</i>	1.42 ± 0.098	64	S
SDS-12	<i>SCO2127</i>	2.72 ± 0.134	122	S
SDS-13	<i>SCO2127+glkA</i>	2.69 ± 0.096	121	S

La incorporación de D-[U-¹⁴C] glucosa se midió en micelio cultivado en medio mínimo complementado con 100 mM de D-glucosa y se midió a los 30 s.

En la tabla anterior se observa que todas las mutantes Dog con los plásmidos que contienen el gen *SCO2127* solo o junto con el gen *glkA*, incrementaron considerablemente la incorporación de glucosa entre 1.7 y 3.0 veces. Por el contrario, las mutantes con el plásmido pSG200 (contiene solo el gen *glkA*), no mostraron cambios significativos en el transporte de glucosa, comparadas con la cepa parental. Por otro lado, es importante señalar que la cepa Dog^S-2 con el plásmido pSG210 o pIJ513 (con *SCO2127* solo o con *glkA*, respectivamente), incrementó hasta un 37% la incorporación de glucosa, con respecto a la cepa original. Esto último puede deberse a que la cepa Dog^R-2 presenta mutaciones adicionales en el sistema de transporte de glucosa.

8.5.3 Determinación de la actividad de la glucosa cinasa

Basados en la relación directa entre la actividad de Glk y la RCC que se ha observado en *S. coelicolor*, se cuantificó la actividad de Glk, buscando una relación similar en las mutantes Dog de *S. peucetius* var. *caesius* con los genes *SCO2127* y *glkA* (ver tabla 8).

Tabla 8. Actividad de glucosa cinasa en las cepas de *S. peucetius* var. *caesius*

Cepa	Inserto	Actividad de Glk U/mg proteína	%	RCC
Original		163.75±13.75	100	S
Dog ^R		24.53± 0.2	15	R
SDR-1	<i>glkA</i>	155.56±13.0	95	S
SDR-2	<i>SCO2127</i>	188.32±15.8	115	S
SDR-3	<i>SCO2127+glkA</i>	543.00±27.1	331	S
Dog ^S -2		61.00± 4.9	37	R
SDS-1	<i>glkA</i>	522.34± 8.9	318	R
SDS-2	<i>SCO2127</i>	157.61± 2.4	96	S
SDS-3	<i>SCO2127+glkA</i>	190.03±11.5	115	S
Dog ^S -11		137.55±11.5	84	R
SDS-11	<i>glkA</i>	311.13±26.1	150	S
SDS-12	<i>SCO2127</i>	245.63±20.6	190	S
SDS-13	<i>SCO2127+glkA</i>	294.76±24.7	180	S

La actividad de Glk se determinó en micelio cultivado durante 48 h en medio YM complementado con 100 mM de D-glucosa.

Como puede observarse en la tabla anterior, todas las recombinantes incrementaron la actividad de Glk. En las cepas SDS-1 y SDR-3 se incrementó la actividad 3 veces mas aproximadamente, con respecto a la cepa original.

Es importante señalar que a pesar de que la cepa SDS-1 mostró un aumento significativo de Glk (318%) y niveles de transporte similares a la mutante parental, es aún insensible a RCC. Ésto evidenció que la recuperación de la actividad de Glk no es suficiente para recobrar la sensibilidad a RCC.

En otras investigaciones se ha demostrado que la Glk no es necesaria para la represión por glucosa de *Chi63* (quitinasa) en *S. coelicolor* (Ingram y Westpheling, 1995) o para la expresión de la α -amilasa en *S. kanamycetius* (Flores *et al.*, 1993). Esto sugiere que otras moléculas son necesarias para que la regulación catabólica por glucosa se lleve a cabo.

8.5.4 Efecto del gen *SCO2127* sobre la utilización de galactosa

Para conocer el efecto de la glucosa en el transporte de galactosa en la cepa original de *S. peucetius* var. *caesius*, se realizaron experimentos de transferencia de micelio a glucosa y/o galactosa y se monitoreó la incorporación de galactosa en cultivos previamente crecidos en presencia y ausencia de galactosa.

Se pudo observar que el transporte fue estimulado en cultivos precrecidos en galactosa. Cabe mencionar que cuando se precrece solo en glutamato y se mide la incorporación de galactosa se observa solo un transporte basal (ver la figura 15).

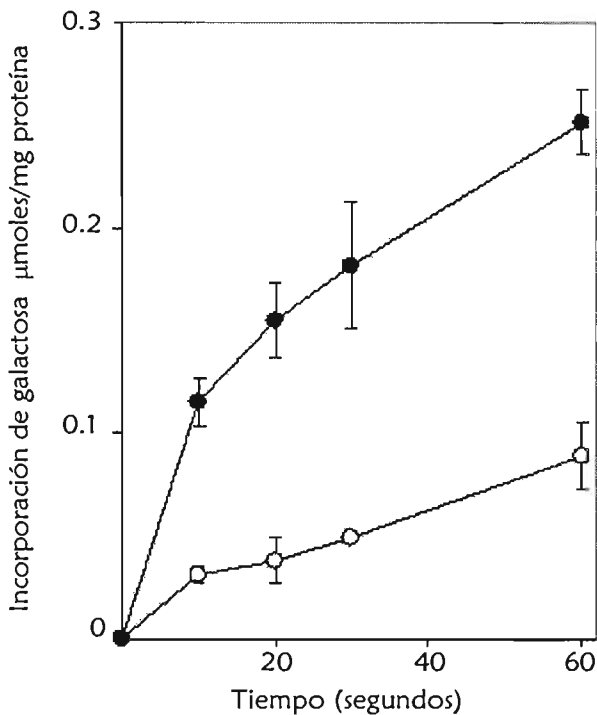


Figura 15. Incorporación de galactosa en *S. peucetius* var. *caesius*. Micelio precrecido en galactosa 100 mM, (●) y glutamato 20 mM, (○) y transferido a galactosa (10 mM).

Posteriormente se determinó el efecto de la glucosa sobre la incorporación de galactosa. Como puede verse en la figura 16, en micelio precrecido solo en galactosa, el transporte de este carbohidrato, en presencia de glucosa en el sistema de reacción (2 y 5 mM), mostró una disminución, probablemente por una inhibición en la actividad de ambos sistemas (el inducido y

el basal). Además, cuando se precreció en galactosa (100 mM) más glucosa (300 mM), la incorporación de galactosa se abatió, mostrando la RC por glucosa sobre la utilización de este azúcar.

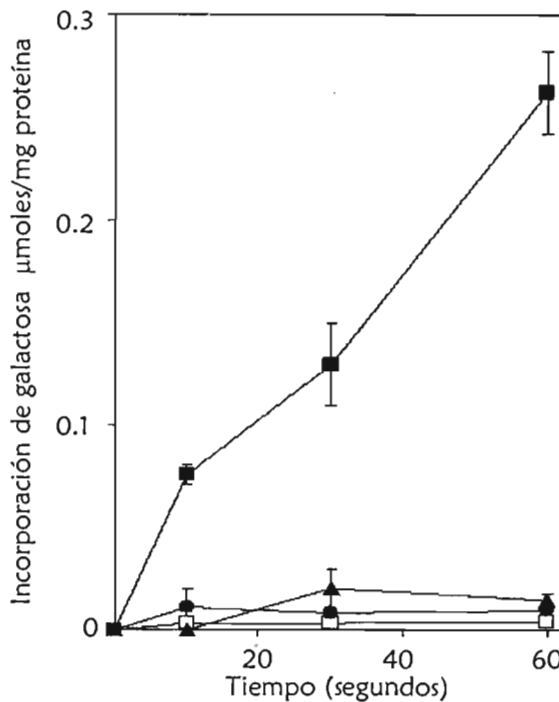


Figura 16. Efecto de la glucosa sobre la incorporación de galactosa en *S. peuceitius* var. *caesius*. El micelio se precreció en galactosa 100 mM y se transfirió a galactosa sola (10 mM) (■) y galactosa 10 mM más glucosa 2 mM (▲) y 5 mM (●), respectivamente. Por otro lado, el micelio se precreció en galactosa 100 mM más glucosa 300 mM y se transfirió a galactosa 10 mM (□).

Con el fin de observar el efecto del gen *SCO2127* sobre la utilización de otras fuentes de carbono, se monitoreó el transporte de galactosa y la sensibilidad a la represión ejercida por esta fuente de carbono en la mutante SDR-2 (ver tabla 9).

En la incorporación de galactosa pudimos observar que la cepa SDR-2 (la mutante Dog^R con el gen *SCO2127*) recuperó el transporte de galactosa en comparación con la cepa parental e inclusive muestra un nivel mayor que la original.

Con respecto a la sensibilidad a RC por galactosa, se observó que la cepa SDR-2 crecida en 330 mM (condiciones represoras) no hubo producción de antraciclinas, lo cual nos muestra que también se restableció la RC por galactosa.

Tabla 9. Efecto del gen *SCO2127* sobre el transporte de galactosa y la sensibilidad a RC por galactosa

Cepa	^A Transporte de galactosa %	^B RCC
Original	100	S
Dog ^R	35	R
SDR-2	120	S

^ATransporte de galactosa, el micelio se precreció en galactosa 100 mM y se transfirió a galactosa 10 mM y se determinó a los 60 s de incubación. El valor de incorporación de la cepa original (0.26 ± 0.02 $\mu\text{mol/mg}$ de peso seco) se tomó como el 100 %.

^BLa sensibilidad a RCC se determinó cualitativamente por la producción de antraciclinas (pigmento rojo) formadas en presencia de 330 mM de D-galactosa. (S) Sensible, no produce y (R) resistente, produce.

8.5.5 Efecto del gen *SCO2127* sobre la expresión del gen *glk* a diferentes concentraciones de glucosa

Con el fin de conocer más acerca del efecto estimulador del gen *SCO2127*, se monitoreó la transcripción de *glk* por dot blot del RNA total (fig. 17). Para ello se emplearon la cepa original, la mutante Dog^R insensible a RCC y la cepa SDR-2 (Dog^R con el gen *SCO2127*).

Como puede verse en la figura 17, hubo una mayor transcripción de *glk* en la recombinante, con respecto a la cepa original y la mutante Dog^R en cultivos crecidos con 100 mM de glucosa. Cabe resaltar que en esta última se detectó menor transcrito de *glk*, el cual mantuvo correspondencia con la baja actividad enzimática.

Además, se midieron los niveles de transcripción de *glk* en diferentes concentraciones de glucosa. Esto se realizó en cultivos crecidos en medio completo (YM) en presencia de altas (represoras) y bajas concentraciones de esta fuente de carbono. Como puede observarse en esta misma figura hubo mayor RNAm en altas concentraciones de glucosa en la cepa original y en la mutante Dog^R, mientras que no se observó diferencia en la cepa SDR-2.

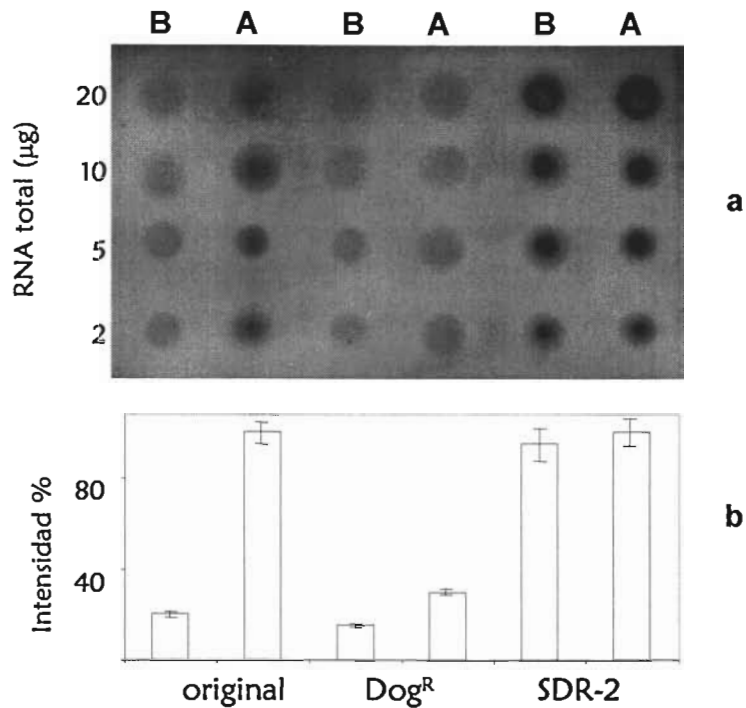


Figura 17 (a) Dot blot de RNA total. Se muestra el mRNA del gen *glkA* de la cepa original, una mutante Dog^R de *S. peuceetius* var. *caesius* y la recombinante SDR-2 derivada de Dog^R. Las cepas se cultivaron en medio YM con 100 (B) y 500 mM (A) D-glucosa. La cantidad de RNA total se indica en la columna de la izquierda. (b) La grafica ilustrada muestra la cuantificación densitométrica derivada del dot con 2 µg de RNA total.

En este mismo experimento se muestra que en condiciones represoras de glucosa (500 mM), la cepa original presentó mayor nivel de expresión de *glk* que en condiciones no represoras (100 mM), evidenciando su presencia durante la RCC. En la mutante Dog^R se observan bajos niveles de expresión de *glk* y solo una ligera diferencia en el RNAm, lo cual correlaciona bien con la insensibilidad a RCC. Por el contrario, la cepa SDR-2 no presentó diferencias en el RNAm en las dos concentraciones de glucosa, explicando la hipersensibilidad de esta mutante al efecto de la glucosa.

9 Discusión

Existen diversas evidencias que sugieren que la Glk no es suficiente para ejercer el efecto de RCC en *Streptomyces*. En *S. coelicolor*, se ha demostrado que mutantes capaces de crecer en DOG (Dog^R), presentan disminución en la actividad de Glk y resistencia a RCC (Hodgson, 1982). Sin embargo, cuando estas mutantes se complementan con el gen *glkA*, recuperan parcialmente la sensibilidad a la RCC (Angell *et al.*, 1994). El restablecimiento completo a la sensibilidad a RCC se observa sólo en las mutantes Dog^R con el plásmido pIJ513 (que contiene los genes *glkA* y *SCO2127* este último localizado upstream de la *glkA*) (Angell *et al.*, 1994). Adicionalmente, se ha demostrado que la Glk no es necesaria para el efecto de represión por glucosa en la expresión de *chi63* (quitinasa) en *S. coelicolor* (Ingram y Westpheling, 1995) o en la expresión de la α -amilasa en *S. kanamycetius* (Flores *et al.*, 1993). Por ello sugerimos que deben existir otras moléculas importantes en la RC ejercida por glucosa en el género *Streptomyces*.

Por otro lado, mutantes de *S. peucetius* var. *caesius* (Dog^R), resistentes a RCC muestran un fenotipo pleiotrópico, ya que muestran simultáneamente deficiencias en la actividad de glucosa cinasa y baja incorporación de glucosa, lo cual parece causar la resistencia al efecto de la glucosa (Segura *et al.*, 1996; Escalante *et al.*, 1999). Posteriormente, por un proceso de enriquecimiento de las cepas Dog^R, se aislaron varias mutantes ahora sensibles a DOG (Dog^S), que presentan diferente relación entre incorporación de glucosa/actividad de Glk. Estas mutantes, además presentan sensibilidad total o parcial a la RCC (ver tabla 2) (Ramos *et al.*, 2004).

En este trabajo demostramos que las mutantes Dog^R o Dog^S de *S. peucetius* var. *caesius* insensibles a RCC, pueden recuperar el fenotipo de la cepa original transformándolas con el plásmido pSG210, el cual expresa el producto génico de *SCO2127* proveniente de *S. coelicolor*. En estas recombinantes, la actividad de Glk y la incorporación de glucosa, aumentan a niveles similares de la cepa original e inclusive a niveles más altos y recuperan la sensibilidad a RC por glucosa. El análisis “*in silico*” de esta región, muestra que el gen *SCO2127* no codifica para una glucosa permeasa o una glucosa cinasa.

Con base en nuestros resultados, las mutantes Dog de *S. peucetius* var. *caesius* parecen estar afectadas a nivel de *SCO2127*, ya que cuando se complementan con este fragmento, recuperan la actividad de Glk, el transporte de glucosa, así como la sensibilidad a RCC, aunque faltan evidencias para apoyar este echo.

Por otro lado en las recombinantes con el plásmido pSG200 que contienen el gen que codifica para la Glk, solo recuperan los niveles de glucosa cinasa pero no el transporte de glucosa, esto nos sugiere que el transporte de glucosa es independiente a la Glk.

En análisis de hibridación tipo Southern blot, se muestra que el perfil de hibridación para *glkA* y *SCO2127* es similar en *S. coelicolor* y *S. peucetius* var. *caesius*, lo cual indica que estos genes están en el mismo fragmento, posiblemente adyacentes, formando parte del mismo operón, lo que sugiere que la organización genética es similar en ambas cepas. En un análisis “*in silico*” con *S. avermitilis*, se mostró la presencia de genes homólogos a *SCO2127* y a *glkA* de *S. coelicolor*, correspondiendo estos a los genes *SAV6073* y *SAV6074 (glk)* de *S. avermitilis*. Estos genes están altamente conservados ya que muestran un 86% y 95% de identidad, respectivamente. Además están organizados de la misma manera que en *S. coelicolor*, lo cual tiene correspondencia con lo que hemos encontrado experimentalmente en *S. peucetius* var. *caesius*. Bentley *et al.* (2001) han reportado que en el grupo de los actinomicetos los genes involucrados en el metabolismo primario están muy conservados en su secuencia y ubicación.

Con respecto a la RCC, las mutantes Dog con el plásmido pSG210 (*SCO2127*) o pSG200 (*glkA*), mostraron recuperación de la sensibilidad a RCC sobre la producción de antraciclinas, inclusive en bajas concentraciones de glucosa (100 mM). La hipersensibilidad de dichas cepas pudiera deberse a que los genes *SCO2127* y *glkA* de *S. coelicolor*, poseen mayor efecto en *S. peucetius* var. *caesius* o por una alta expresión de los genes debido a un mayor número de copias del plásmido (pIJ486). Una excepción a lo anterior es la cepa Dog^s-2 con el plásmido pSG200 (*glkA*), ya que mostró un menor transporte (81%) con respecto a la cepa original. Sin embargo, presentó alta actividad de Glk (3 veces mayor), la cepa mostró aun resistencia a la RCC, probablemente por la poca capacidad de la cepa para incorporar glucosa (19% con respecto a la original), esto sugiere que esta cepa posee una mutación adicional en el transporte de glucosa.

En cuanto al efecto del gen *SCO2127* sobre la incorporación de glucosa y la actividad de Glk, aún no se tiene evidencia que permita aproximarnos al mecanismo por el cual pudiera estar actuando. Cabe mencionar que Angell *et al.* (1992) proponen que el efecto de ambos genes en la recuperación total de la RCC en las mutantes de *S. coelicolor*, pudiera deberse a mayores niveles de expresión del gen *glkA* debido a la presencia del promotor ubicado upstream del gen *SCO2127*. Esto es poco probable en nuestro sistema, ya que si hubiera existido recombinación entre el plásmido y el cromosoma de las mutantes, no podría explicarse el efecto estimulador

de este gen sobre la incorporación de glucosa, ya que el gen *glcP1* (*SCO5578*), responsable del transporte de glucosa en *S. coelicolor*, no se localiza próximo al gen *SCO2127*. Recientemente el gen *glcP1* fue descrito y localizado al lado opuesto del gen *SCO2127* en la región conservada del cromosoma (Bertram *et al.*, 2004).

Con respecto a la incorporación de galactosa, se mostró que *S. peuceitius* var. *caesius*, posee un sistema basal y un sistema inducido cuando crece en presencia de este carbohidrato. Cultivos crecidos en glucosa muestran un efecto negativo sobre el transporte de galactosa, evidenciando la jerarquía de la glucosa en la RCC. Además, se muestra un efecto negativo adicional de la glucosa sobre la incorporación de galactosa, ya que la adición de glucosa en el sistema de reacción para medir la incorporación de galactosa, inhibe fuertemente el transporte de galactosa.

Con relación al transporte de azúcares y la sensibilidad a RCC en *S. peuceitius* var. *caesius*, la mutante insensible a RCC (Dog^R), muestra una disminución en el transporte de glucosa y galactosa 48% y 81% respectivamente. Esto podría evidenciar una menor concentración de ambos azúcares intracelularmente y explicar su resistencia a la represión. Adicionalmente, en la mutante Dog^R con el plásmido pSG210 (*SCO2127*), se mostró recuperación a la sensibilidad por glucosa sobre el transporte de galactosa, sugiriendo que existe un sistema de control integral, que repercute en la regulación general ejercida por la presencia de varias fuentes de carbono represoras y que el gen *SCO2127* pudiera participar en dicha regulación.

En cuanto a la expresión de *Glk*, en concentraciones represoras de glucosa (500 mM) la cepa original mostró niveles mayores de RNAm de *glk* con respecto a condiciones no represoras (100 mM). Con base en esto, se reitera el papel de la *Glk* en la sensibilidad a la RCC. Estas diferencias también se observaron en la mutante resistente a RCC (Dog^R). En este caso se observaron bajos niveles de RNAm en ambas condiciones de represión, lo cual correlaciona bien con la resistencia a RCC que muestra la cepa sobre la producción de antraciclinas (Ramos *et al.*, 2004). Por otro lado, aunque la cepa Dog^R con el plásmido pSG210 (*SCO2127*) muestra altos niveles de transcrito de *glk*, no se muestran diferencias de expresión entre 100 mM y 500 mM de glucosa, explicando la hipersensibilidad a RCC de la cepa.

Considerando el incremento en el RNAm de *glk* observado en la cepa Dog^R con el plásmido pSG210, sugerimos que este gen tiene efecto estimulador en la transcripción de *glk* y probablemente en el gen involucrado en la incorporación de glucosa, posiblemente *glcP1*. De esta manera aumentaría el flujo metabólico y por lo tanto, habría mayor concentración de

intermediarios, que posiblemente actúen como efectores directos de la RCC global. En apoyo a esto último se ha reportado que en *B. subtilis*, la fructosa 1-6 fosfato puede unirse a la HPr cinasa, aumentar los niveles de HPr-ser-P y ejercer su actividad regulatoria en la RCC, activando a su vez a CcpA, provocando una regulación general por carbono (Jault *et al.*, 2000).

Cabe mencionar que en *S. peucetius* var. *caesius*, algunos metabolitos intermediarios de la glucólisis como la glucosa 6-fosfato y el PEP, tienen un efecto negativo sobre la síntesis de antraciclinas (Ramos *et al.*, 2004). Es importante señalar que hasta el momento, el análisis de secuencia del gen *SCO2127* no ha permitido asignarle algún papel específico. Sin embargo, se predice que puede ser una proteína hidrofílica de 191 aminoácidos.

Por último, a pesar de que no se conoce completamente la RCC en el género *Streptomyces*, se piensa que al haber determinado el efecto del gen *SCO2127* en las mutantes Dog de *S. peucetius* var. *caesius* contribuye grandemente al entendimiento de dicho mecanismo.

Experimentalmente se determinó que el gen *SCO2127* en presencia de altas concentraciones de glucosa, estimula la expresión de la Glk y posiblemente también active la síntesis de la permeasa de glucosa, ya que se observa un aumento en los niveles de actividad de Glk e incorporación de glucosa. A pesar que en análisis "*in silico*", el producto del gen *SCO2127* no posee sitios de unión a DNA, proponemos que en presencia de glucosa, puede unirse a un regulador transcripcional general formando un complejo, el cual, pudiera estimular la expresión de la Glk y la glucosa permeasa, aunque no se puede descartar la unión a otros efectores. De esta manera, hay mayor incorporación y fosforilación del carbohidrato, aumentando los niveles de intermediarios glucolíticos. Éstos pudieran unirse a represores generales o específicos (aporrepresores) formando complejos de regulación, que eviten la expresión de genes sensibles a RCC en *S. peucetius* var. *caesius*, tal como sucede en *Bacillus* (Jault *et al.*, 2000). En el diagrama siguiente (figura 18) ilustramos el posible mecanismo de regulación transcripcional por glucosa, con base en los datos que se conocen hasta este momento.

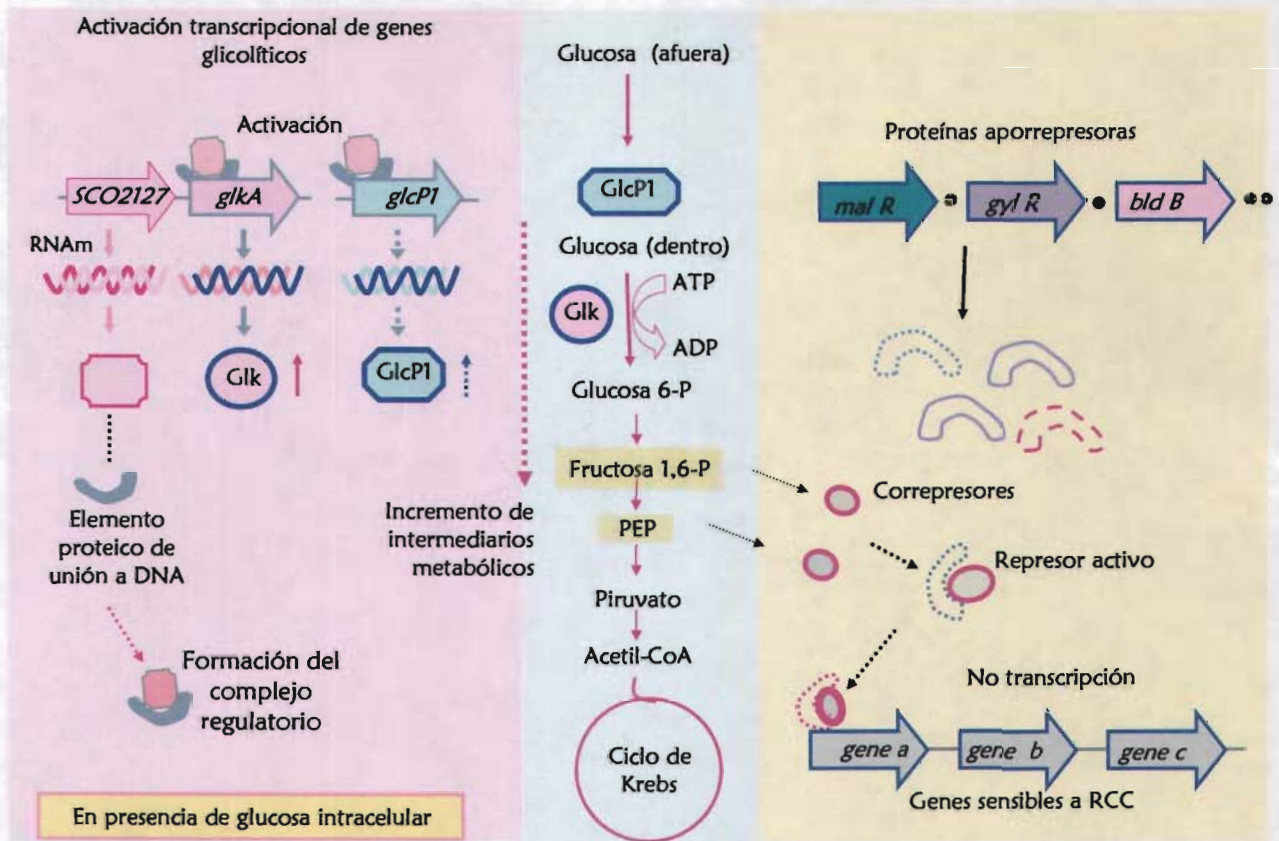


Figura 18. Modelo propuesto para explicar el mecanismo de RCC en *Streptomyces*. Las líneas sólidas representan los pasos que se tiene evidencia experimental y las líneas discontinuas representan posibles procesos presentes en la RCC.

10 Conclusión

En *S. peucetius* var. *caesius* se detectó la existencia de genes homólogos a *glkA* y *SCO2127* de *S. coelicolor*. Estos genes están localizados en el mismo fragmento, lo que sugiere que se encuentran adyacentes en el genoma. Además, se ha detectado la presencia de genes homólogos a *SCO2127* y a *glkA* en *S. avermitilis* con la misma organización genética que en *S. coelicolor*. Ambas especies muestran un 86 y 95% de identidad en dichos genes, respectivamente, lo que sugiere que están altamente conservados. Estas evidencias tienen correspondencia con lo que hemos encontrado experimentalmente en *S. peucetius* var. *caesius*.

La complementación con el gen *glkA* permitió la recuperación de la actividad de Glk pero no el transporte, esto nos sugiere que el transporte de glucosa es independiente a la Glk.

Se ha demostrado que el gen *SCO2127* tiene efecto pleiotrópico, ya que en las mutantes Dog de *S. peucetius* var. *caesius* con el plásmido pSG210 (con el gen *SCO2127*) en presencia de glucosa, se observa un aumento en la actividad de Glk, en la incorporación de glucosa y galactosa y afecta negativamente la síntesis de β -galactosidasa y antraciclinas.

Las mutantes Dog de *S. peucetius* var. *caesius* parecen estar afectadas a nivel de *SCO2127*, ya que cuando se complementan con este fragmento, recuperan la actividad de Glk, el transporte de glucosa, así como la sensibilidad a RCC.

El producto génico de *SCO2127* podría ser regulatorio, ya que estimula la expresión de la Glk y probablemente también a la permeasa de glucosa (GlcP) de *S. peucetius* var. *caesius*.

Nuestros datos sugieren un sistema integral de regulación donde participan diversos elementos. Este sistema inicia con el aumento en la incorporación de glucosa, resultando un incremento en los niveles de glucosa fosforilada intracelular, lo cual repercutiría en los niveles de intermediarios glucolíticos. Tales intermediarios pudieran coordinar directamente la respuesta general de regulación transcripcional negativa ejercida por glucosa. Por ello, la participación del producto génico de *SCO2127* favorece el aumento en la incorporación (vía permeasa) y fosforilación (vía *glk*) de la glucosa, el cual, representa un paso importante para ejercer la RCC en *S. peucetius* var. *caesius*.

11 Perspectivas

A pesar de que se ha demostrado el efecto pleiotrópico del gen *SCO2127* en *S. peucetius* var. *caesius*, no se conoce el mecanismo por el cual éste repercute en la RCC, en la actividad de Glk y en la incorporación de carbohidratos. Por ello se propone lo siguiente:

Determinar la existencia del producto génico de *SCO2127* y su participación en la RCC en *Streptomyces*.

Para ello se requiere purificar el producto del gen, determinar si la proteína es multimérica y la posibilidad de unión a otras proteínas, a la propia Glk o al promotor de *glk*.

Llevar a cabo estudios sobre cinética de síntesis, la posible inducción con glucosa u otras fuentes de carbono, la correlación temporal con la síntesis de Glk y con la permeasa de glucosa y su posible relación en otras actividades de la glucólisis.

Determinar la existencia del gen homólogo a *SCO2127* en *S. peucetius* var. *caesius*.

Se podría amplificar el gen por PCR, tomando como base la secuencia de *S. coelicolor* y clonarlo en un vector comercial o construir una biblioteca genómica de *S. peucetius* var. *caesius* y aislar la clona que contenga el gen homólogo a *SCO2127*.

Determinar si las mutantes Dog de *S. peucetius* var. *caesius* están afectadas a nivel del gen homólogo a *SCO2127* de *S. coelicolor*.

Se ha demostrado que la presencia del gen *SCO2127* en las mutantes Dog tiene un efecto pleiotrópico, a pesar de ello no se ha determinado donde está la mutación, para este propósito se puede hacer la amplificación del gen por PCR y posteriormente secuenciar el producto obtenido y así determinar si existen mutaciones en este fragmento.

Conocer el efecto de la delección de los genes *SCO2127* y/o *glk* en *S. coelicolor* y en *S. peucetius* var. *caesius* sobre: la RCC, la incorporación de glucosa y la actividad de glucosa cinasa.

Se pueden obtener mutantes dirigidas con un sistema diseñado recientemente para la interrupción de genes que permiten eliminar fragmentos de DNA de interés sin repercusión en sitios adyacentes. El sistema "PCR targeting system de *S. coelicolor*" propuesto por Gust *et al.* (2001), puede permitir la obtención de dichas mutantes, para posteriormente evaluar el efecto de la delección en los parámetros antes mencionados.

2 Referencias

- Angell S., Schwartz E. & Bibb M. (1992). The glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2): its nucleotide sequence, transcriptional analysis and role in glucose repression. *Mol. Microbiol.* 6, 2833-2844.
- Angell S., Lewis G., Buttner M. & Bibb M. (1994). Glucose repression in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a likely regulatory role for glucose kinase. *Mol. Gen. Genet.* 244, 135-143.
- Arcamone F., Cassinelli G., Fantini G., Grein A., Orezzi P., Pol C. & Spalla, C. (1969). Adriamycin, 14-Hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol. Bioeng.* 11, 1101-1110.
- Baltz H. & Matsushima P. (1981). Protoplast fusion in *Streptomyces*: conditions for efficient genetic recombination and cell regeneration. *J. Gen. Microbiol.* 127, 137-146.
- Bentley et al. (2001). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature.* 417, 141-147.
- Bertram R., Schlicht M., Mahr K., Nothaft H., Saier Jr. H. & Titgemeyer F. (2004). *In silico* and transcriptional analysis of carbohydrate uptake systems of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* 186, 1362-1373.
- Bolotin A., Wincker P., Mauger S., Jaillon O., Malarme K., Weissenbach J., Ehrlich D., Sorokin A. (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.* 11(5):731-53.
- Brückner R. & Titgemeyer F. (2002). Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiol. Lett.* 209, 141-148.
- Champness W. (1988). New loci required for *Streptomyces coelicolor* morphological and physiological differentiation. *J. Bacteriol.* 170, 1168-1174.
- Chater K. (1998). Taking a genetic scalpel to the *Streptomyces* colony. *Microbiol.* 144, 1465-1478.
- Chatterjee S., & Vining C. (1982). Catabolite repression in *Streptomyces venezuelae*. Induction of β -galactosidase, chloramphenicol production, and intracellular cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate concentrations. *Can. J. Microbiol.* 28, 311-317.
- Chomczynski, P. & Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Dekleva M., Titus A. & Strohl R. (1985). Nutrient effects on anthracycline production by *Streptomyces peucetius* in a defined medium. *Can. J. Microbiol.* 31, 287-294.

- Delic I., Robbins P. & Westphelling J. (1992). Direct repeat sequences are implicated in the regulation of two *Streptomyces* chitinase promoters that are subject to catabolite control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 1885-1889.
- Demain A. (1989). Carbon source regulation of idiolite biosynthesis in Actinomycetes. En *Regulation of secondary metabolism in Actinomycetes*, pp. 127-131. Ed. S. Shapiro. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Di Marco A., Arcamone F. & Zunino F. (1975). Daunomycin (daunorubicin) and adriamycin and structural analogs: biochemical activity and mechanism of action. J. W. Corcoran, F. E. Hahn (eds.), *Antibiotic*. Vol. 3. Ed. Springer Verlag, New York. 101-128.
- Eckhardt T., Strickler J., Gorniak L., Burnett W. & Fare R. (1987) Characterization of the promoter signal sequence and amino terminus of a secreted β -galactosidase from *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* 169, 4249-4256.
- Escalante L., Ramos I., Imriskova I., Langley E. & Sánchez, S. (1999). Glucose repression of anthracyclines formation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, 572-578.
- Flores M. E., Ponce E., Rubio M. & Huitron C. (1993). Glucose and glycerol repression of amylase in *Streptomyces kanamyceticus* and isolation of deregulated mutants. *Biotechnol. Lett.* 15, 595-600.
- Garrity F., Schiel L., Merrill R., Reizer J., Saier Jr M., & Ordal W. (1998). Unique regulation of carbohydrate chemotaxis in *Bacillus subtilis* by the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system and the methyl-accepting chemotaxis protein. McpC. *J. Bacteriol.* 180: 4475–4480.
- Gersch D., Romero W., Bocker H. & Thrum H. (1980). Variations in cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate and cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate in antibiotic-producing strains of *Streptomyces hygroscopicus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 3, 39-41.
- Görke B. & Rak B. (1999). Catabolite control of *Escherichia coli* regulatory protein BglG activity by antagonistically acting phosphorylations. *EMBO J.* 18, 3370–3379.
- Grein A. (1987). Antitumor anthracyclines produced by *Streptomyces peucetius*. *Adv. Appl. Microbiol.* 32, 203-215.
- Gust B., Kieser T. & Chater K. (2001). *PCR targeting system in Streptomyces coelicolor A3(2)*. John Innes Foundation, Centre, Norwich Research Park, Colney, Norwich. pp. 42
- Hershberger C., Queener S. & Hegeman G. (1989). *Genetics and molecular biology of industrial microorganism*. Ed. American Society for Microbiology. USA.

- Hindle Z. & Smith P. (1994). Substrate induction and catabolite repression on the *Streptomyces coelicolor* glycerol operon are mediated through the GylR protein. *Mol. Microbiol.* **12**, 737-745.
- Hirsch F. & McCann-McCormick P. (1985). Biology of *Streptomyces*. En: *Biology of Industrial Microorganisms*. Demain, A., Solomon, N. Ed. Butterworths. USA, **10**, 241-309.
- Hodgson D. (1982). Glucose repression of carbon uptake and metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its perturbation in mutants resistant to 2-deoxyglucose. *J. Gen. Microbiol.* **128**, 2417-2430.
- Hodgson D. (1994). General Physiology. Carbon Metabolism. In *Streptomyces: Handbook of Biotechnology*. Wellington E. & Hodgson D. Ed London: Plenum Press.
- Hodgson D. (2000) Primary metabolism and its control in *Streptomyces*: A most unusual group of bacteria. *Adv. in Microbiol. Physiol.* **42**, 47-238.
- Hopwood, D., Bibb M., Chater C., Kieser T., Bruton C., Kieser H. M., Lydiate D., Smith C. y Ward J. (1985). *Genetic manipulation of Streptomyces a laboratory manual*. Ed. The John Innes Foudation, Norwich. Inglaterra. pp 354.
- Hoskins J., Alborn WE., Arnold J., Blaszcak LC., Burgett S. & DeHoff BS. *et al.* (2001). Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J. Bacteriol.* **183**(19), 5709-17.
- Huang C., Lin Y., Yang Y., Huang S. & Chen C. (1998). The telomeres of *Streptomyces* chromosomes contain conserved palindromic sequences with potential to form complex secondary structures. *Mol. Microbiol.* **28**, 905-926.
- Ikeda H., Seno E., Bruton C. & Chater K. (1984). Genetic mapping cloning and physiological aspects of the glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Gen. Genet.* **196**, 501-507.
- Ikeda H., Ishikawa J., Hanamoto A., Shinose M., Kikuchi H., Shiba T., Sakaki Y., Hattori M., Omura S. (2003). Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature Biotechnology.* **21**, 526-531.
- Imriskova I., Langley E., Arreguín-Espinoza R., Aguilar G., Pardo P. & Sánchez S. (2001). Purification and characterization of glucose kinase from *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Arch. Biochem. Biophys.* **394**, 137-144.
- Imriskova I., Arreguin-Espinosa R., Guzmán S., Rodríguez-Sanoja R., Langley E. & Sánchez S. (2005). Biochemical characterization of the glucose kinase from *Streptomyces coelicolor* compared to *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Res Microbiol.* **156**(3), 361-6.
- Ingram C., Delic I. & Westpheling J. (1995). *ccrA1*: mutation in *Streptomyces coelicolor* that affects the control of catabolite repression. *J. Bacteriol.* **177**, 3579-3586.

Ingram C. & Westpheling J. (1995). The glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor* is not required for glucose repression of the *chi63* promoter. *J. Bacteriol.* 177, 3587-3588.

Jault J-M., Fieulaine S., Nessler S., Gonzalo P., Di Pietro A., Deutscher J. & Galinier A. (2000). The HPr kinase from *Bacillus subtilis* is a homo-oligomeric enzyme which exhibits strong positive for nucleotide and fructose 1,6-bisphosphate binding. *J. Biol. Chemistry.* 275 (3) 1773-1780.

Kieser T., Bibb M., Buttner M., Chater K., & Hopwood D. (2000). *Practical Streptomyces Genetics*. The John Innes Foundation, Norwich.

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

Langley E., Mascareñas N., Ruiz B. & Sánchez S. (2004). *Streptomyces peucetius* var. *caesius* glucosa kinase. NCBI Gen bank nucleotide. gi:50263005.

Lin Y-S., Kieser H.M., Hopwood D. & Chen C. (1993). The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. *Mol Microbiol.* 10, 923-933

Lowry O., Rosebrough N., Farr A. & Randall R. (1959). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol Chemistry.* 193, 265-275.

Lux R., Jahreis K., Bettenbrock K., Parkinson J. & Lengeler J. (1995). Coupling the phosphotransferase system and the methylaccepting chemotaxis protein-dependent chemotaxis signalling pathways of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92,11583–11587.

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

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

Murray R., Williams & Wilkins. (1985). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 2 Ed. Seath P. Los Angeles, USA.

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

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

- Parajuli N., Basnet DV., Chan-Lee H., Kyung-Sohng J & Liou K. (2004). Genome analyses of *Streptomyces peucetius* ATCC 27952 for the identification and comparison of cytochrome P450 complement with other *Streptomyces*. *Arch. Biochem. Biophys.* 425, 233–241.
- Plumbridge J. (2001) Regulation of PTS gene expression by the homologous transcriptional regulators, Mlc and NagC, in *Escherichia coli* (or how two similar repressors can behave differently). *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3(3):371-80.
- Pope M., Green B. & Westpheling J. (1996). The *bld* mutants of *Streptomyces coelicolor* are defective in the regulation of carbon utilization, morphogenesis and cell-cell signalling. *Mol. Microbiol.* 19, 747-756.
- Postma P., Lengeler J & Jacobson G (1993). Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.* 57, 543–594.
- Postma P., Lengeler J. & Jacobson G. (1996). Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria En: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Cellular and Molecular Biology*. Neidhardt, F.C. Ed. Washington, DC: *American Society for Microbiology*, pp. 1149-1174.
- Ramos I., Guzmán S., Escalante L., Imriskova I., Rodríguez-Sanoja R., Sánchez S. & Langley E. (2004). The glucose kinase alone cannot be responsible for carbon source regulation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Res. Microbiol.* 155, 267-274.
- Reizer J., Bachem S., Reizer A., Arnaud M., Saier M. Jr. & Stülke J. (1999). Novel phosphotransferase system genes revealed by genome: analysis the complete complement of PTS proteins encoded within the genome of *Bacillus subtilis*. *Microbiology.* 145, 3419–3429.
- Sabater B., Sebastian J. & Asensio C. (1972). Identification and properties of an inducible and highly specific fructokinase from *Streptomyces violaceoruber*. *Biochim. Biophys. Acta.* 284, 414-420.
- Saier M. Jr. & Reizer J. (1992). Proposed uniform nomenclature for the proteins and protein domains of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. *J. Bacteriol.* 174, 1433-1438.
- Saier M. Jr., Ramseier T.& Reizer J. (1996). Regulation of carbon utilization, *En: Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. Neidhardt F. , Curtiss III R., Ingraham J., Lin E., Low K., Magasanik B., Reznikoff W., Riley M., Schaechter M. & Umberger H. Ed. 2nd, vol. 1. ASM Press, Washington, D. C. pp. 1325-1343.
- Sambrook J., Fritsch E. & Maniatis T. (1989). *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.

- Segura D., González R., Rodríguez R., Sandoval T., Escalante L. & 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.
- Seok Y., Koo B., Sondej M. & Peterkofsky A. (2001). Regulation of *E. coli* glycogen phosphorylase activity by HPr. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3(3), 385–393
- Servin-González L., Jensen M., White J. & Bibb M. (1994). Transcriptional regulation of the four promoters of the agarase gene (*dagA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiol.* 140, 2555-2565.
- Simpkins H., Pearlman L. & Thompson L. (1984). Effects of adriamycin on supercoiled DNA and calf thymus nucleosomes studied with fluorescent probes. *Cancer. Res.* 44, 614-618.
- Smith C. & Chater K. (1988). Structure and regulation of controlling sequences for the *Streptomyces coelicolor* glycerol operon. *J. Mol. Biol.* 204, 569-580.
- Stülke J., Arnaud M., Rapoport G. & Martin-Verstraete. (1998) PDR: a protein domain involved in PTS-dependent induction and carbon catabolite repression of catabolic operons in bacteria. *Mol. Microbiol.* 28, 965-874.
- Stülke J. & Hillen W. (1999). Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 195-201.
- Stülke J. & Hillen W. (2000). Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 849–880.
- Titgemeyer F., Walkenhorst J., Reizer J., Stuver M., Cui X. & Saier M. Jr, (1995). Identification and characterization of phosphoenol-pyruvate: fructose phosphotransferase systems in three *Streptomyces* species. *Microbiology.* 141, 51-58.
- Titgemeyer F., & Brückner R. (2002). Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar. *FEMS Microbiol. Lett.* 141, 141-148.
- Titgemeyer F & Hillen W. (2002) Global control of sugar metabolism: a Gram-positive solution. *Antonie van Leeuwenhoek* 82, 59-71.
- Tritton T. & Yee A. (1982). The anticancer agent adriamycin can be actively cytotoxic without entering cell. *Science.* 217, 248-250.
- Vandamme E. (1984). *Biotechnology of industrial antibiotics*. Vol. 22. *Marcel Dekker Inc.* New York.
- Wang F., Xiao X., Saito A. & Schrepf H. (2002). *Streptomyces olivaceoviridis* possesses a phosphotransferase system that mediates specific, phosphoenolpyruvate-dependent uptake of N-acetylglucosamine. *Mol. Genet. Genomics.* 268, 344-351.

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

Wezel G, Mahr K., Köning M., Traag B. & Pimentel-Schmitt E. (2005). GlcP constitutes the major glucose uptake system of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol.*

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

Yang C., Huang C., Li C., Tsay Y., Lee S. & Chen C. (2002). The terminal proteins of linear *Streptomyces* chromosomes and plasmids: a novel class of replication priming proteins. *Mol. Microbiol.* 43(2), 297-305.

Artículos publicados

S. Guzmán, A. Carmona, L. Escalante, I. Imriskova, R. López, R. Rodríguez-Sanoja, B. Ruiz, L. Servín-González, S. Sánchez and E. Langley. (2005). Pleiotropic effect of the *SCO2127* gene on the glucose uptake, glucose kinase activity and carbon catabolite repression in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Microbiology*. May; 151(5), 1717-23.

S. Guzmán, I. Ramos, E. Moreno, B. Ruiz, R. Rodríguez-Sanoja, L. Escalante, E. Langley y S. Sánchez. (2005). Sugar uptake and sensitivity to carbon catabolite repression in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Abril 6; [En prensa].

Pleiotropic effect of the *SCO2127* gene on the glucose uptake, glucose kinase activity and carbon catabolite repression in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*

Silvia Guzmán, Alonso Carmona, Laura Escalante, Iveta Imriskova,†
Ruth López,‡ Romina Rodríguez-Sanoja, Beatriz Ruiz,
Luis Servín-González, Sergio Sánchez and Elizabeth Langley

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF CP 04510, Mexico

Correspondence

Sergio Sánchez
sersan@servidor.unam.mx

Elizabeth Langley
langley@servidor.unam.mx

Received 12 August 2004
Revised 23 December 2004
Accepted 7 February 2005

SCO2127 and *SCO2126* (*glkA*) are adjacent regions located in *Streptomyces coelicolor* DNA. *glkA* encodes glucose kinase (Gik), which has been implicated in carbon catabolite repression (CCR) in the genus *Streptomyces*. In this work, the *glkA* and *SCO2127* genes from *S. coelicolor* were used, either individually or together, to transform three mutants of *Streptomyces peucetius* var. *caesius* resistant to CCR. These mutants present decreased levels of Gik, and deficiency in glucose transport. When the mutants were transformed with a plasmid containing the *SCO2127* sequence, glucose uptake and Gik activity values were increased to levels similar to or higher than those of the original strain, and each strain regained sensitivity to CCR. This result was surprising considering that the putative *SCO2127* amino acid sequence does not seem to encode a glucose permease or a Gik. In agreement with these results, an increase in *glkA* mRNA levels was observed in a CCR-resistant mutant transformed with *SCO2127* compared with those of the original strain and the CCR-resistant mutant itself. As expected, recombinants containing the *glkA* sequence reverted Gik to normal activity values, but glucose uptake remained deficient. The data suggest that the *SCO2127* gene product enhances transcription of both genes, and support the first specific role for this region in *Streptomyces* species. The physiological consequence of this effect is an increase in the glucose catabolites that may be involved in eliciting CCR in this genus.

INTRODUCTION

Micro-organisms have developed very efficient mechanisms for sensing their nutritional environment, and they respond by adjusting their metabolic activities. This is a global regulatory process, which in the case of carbon source is referred to as carbon catabolite repression (CCR). This mechanism involves control at various levels, including transcriptional expression and protein activity (Brückner & Titgemeyer, 2002).

In various *Streptomyces* species, glucose exerts CCR that not

only affects the utilization of various carbon sources, but also the synthesis of secondary metabolites (Demain, 1989). The mechanisms used by streptomycetes to carry out carbon regulation have been studied primarily in *Streptomyces coelicolor*. One of these mechanisms is the phosphoenolpyruvate (PEP)-dependent sugar phosphotransferase system (PTS) (Saier *et al.*, 1995; Stülke & Hillen, 1999). However, this mechanism responds only to the presence of fructose and *N*-acetylglucosamine (Nothhaft *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2002). Thus, in contrast to mechanisms found in enterobacteria, the PTS system appears to play a secondary role in CCR of streptomycetes (Titgemeyer *et al.*, 1995). Besides the PTS system, the analysis of *Streptomyces* mutants insensitive to CCR has suggested the involvement of the expression products of a number of genes, such as *bld* and *ccrA* (Champness, 1988; Ingram *et al.*, 1995). Additionally, Hodgson (1982) observed that *S. coelicolor* mutants isolated by their resistance to growth on the glucose analogue 2-deoxyglucose (2-DOG) present a decreased sensitivity to repression by various carbon sources, as well as reduced

†Present address: Department of Medical Genetics, 8-33 Medical Sciences Building, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada T6G 2H7.

‡Present address: Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Campeche, Campeche, Cam. 24090, Mexico.

Abbreviations: CCR, carbon catabolite repression; 2-DOG, 2-deoxyglucose; Gik, glucose kinase; PEP, phosphoenolpyruvate; PTS, PEP-dependent sugar phosphotransferase system.

glucose kinase (Glc) activity. When these 2-DOG-resistant (Dog^R) mutants were complemented with the *glkA* gene (Ikeda *et al.*, 1984), Glc activity was completely restored, while CCR sensitivity was only partially recovered (Angell *et al.*, 1994), supporting a role for Glc in this regulatory process. However, a complete recovery can be achieved when the 572 bp *SCO2127* gene, located just upstream, is introduced with *glkA* (Angell *et al.*, 1994). The authors suggest that *SCO2127* may encode a protein involved in glucose transport or its metabolism. However, there has been no evidence to support these possibilities.

Our group has worked with Dog^R mutants from *Streptomyces peucetius* var. *caesius* that show a similar phenotype (Segura *et al.*, 1996). However, in addition to presenting CCR insensitivity and low Glc activity, our mutants also show difficulties in transporting glucose (Escalante *et al.*, 1999), and this phenotype is partially corrected in revertants of a Dog^R mutant that have recovered 2-DOG sensitivity (Dog^S). However, although the Glc of these Dog^S mutants is increased compared with the parent strain, there is no correlation between their Glc activity levels and the degree of glucose repression (Ramos *et al.*, 2004).

In spite of a large number of studies on the effect of glucose in the genus *Streptomyces*, the molecular bases for CCR have yet to be clearly established, and there is not a satisfactory regulatory model to explain this phenomenon. With this background, we began to review the effect of the *S. coelicolor* *glkA* and *SCO2127* genes on Glc activity, glucose transport and CCR sensitivity in a series of mutants derived from

S. peucetius var. *caesius* insensitive to CCR, which present low levels of Glc activity and deficient glucose transport. Our results support a stimulatory role for *SCO2127* on CCR in *Streptomyces* species.

METHODS

Bacterial strains, plasmids and growth conditions. All bacterial strains and plasmids used in this study are described in Table 1. The strains are deposited in the UNAM-Biomedicas Culture Collection, Mexico. For anthracycline production and glucose kinase assays, we used 2.5 ml samples of a seed culture (Segura *et al.*, 1996), washed and resuspended in sterile distilled water, to inoculate 50 ml YM medium with the desired glucose concentration. The medium was contained in 250 ml baffled Erlenmeyer flasks. YM medium contains (l^{-1}): 4 g yeast extract, 10 g malt extract, pH 7.2. All cultures were grown at 29 °C on a rotary shaker at 180 r.p.m.

The *glkA* and *SCO2127* genes from *S. coelicolor* were amplified using PCR from total DNA of the M145 strain. The oligonucleotides were designed based on the reported *glkA* and *SCO2127* gene sequences (Angell *et al.*, 1992), and they covered all the promoter and the transcriptional terminator. For *glkA*, the primers used were: forward (5'-CACGAGATCTGGACGAACG-3') and reverse (5'-GCGAAGC-TTCCGGAGTCCG-3'). For *SCO2127*, the primers were: forward (5'-CGGAGATCTGGCCGCGGG-3') and reverse (5'-GGCAAG-CITACCCGAGGC-3'). Both primers contained restriction sites for *Bgl*II and *Hind*III for cloning into the pIJ486 vector. This vector was digested with *Bam*HI and *Hind*III in the multiple cloning site. PCR conditions for *glkA* and *SCO2127* amplification were an initial denaturation step at 94 °C (5 min), then 94 °C (1 min), 57 °C (1 min) and 72 °C (1 min) for 20 cycles, and a final extension period at 72 °C (5 min). PCR products with 694 and 1122 bp were purified, and cloned into pIJ486, generating pSG210 and pSG200,

Table 1. Strains and plasmids

Strain or plasmid	Characteristics	Reference
Strains		
<i>S. coelicolor</i> M145	Wild-type	Kieser <i>et al.</i> (2000)
<i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i>	Original strain, derived by NRRL B-5337 mutagenesis from <i>S. peucetius</i>	Arcamone <i>et al.</i> (1969)
Dog^R	Obtained from the original strain as resistant to 2-DOG	Segura <i>et al.</i> (1996)
SDR-1	Dog^R transformed with pSG200	This work
SDR-2	Dog^R transformed with pSG210	This work
Dog^S -2	Obtained from the Dog^R strain as sensitive to 2-DOG	Ramos <i>et al.</i> (2004)
SDS-1	Dog^S -2 transformed with pSG200	This work
SDS-2	Dog^S -2 transformed with pSG210	This work
SDS-3	Dog^S -2 transformed with pIJ513	This work
Dog^S -11	Obtained from the Dog^R strain as sensitive to 2-DOG	Ramos <i>et al.</i> (2004)
SDS-11	Dog^S -11 transformed with pSG200	This work
SDS-12	Dog^S -11 transformed with pSG210	This work
SDS-13	Dog^S -11 transformed with pIJ513	This work
Plasmids		
	Origin and comments	Source
pIJ513	Derivative of the low-copy-number plasmid pIJ922 (Lydiat <i>et al.</i> , 1985) with a 3.5 kb <i>Eco</i> RI fragment that contains <i>glkA</i> and <i>SCO2127</i> cloned in the unique <i>Eco</i> RI site of the vector (Ikeda <i>et al.</i> , 1984; Angell <i>et al.</i> , 1992)	L. Servín-González
pIJ486	An autonomously replicating high-copy-number plasmid (Ward <i>et al.</i> , 1986)	L. Servín-González
pSG200	pIJ486 containing the <i>S. coelicolor glkA</i>	This work
pSG210	pIJ486 containing the <i>S. coelicolor SCO2127</i>	This work

containing *SCO2127* and *glkA* genes, respectively. These plasmids were used to transform the *S. peucetius* var. *caesius* Dog mutants. Recombinants containing both genes were obtained by introduction of pJ513, which contains a 2.9 kb fragment including both *SCO2127* and *glkA* regions (Ikeda *et al.*, 1984), into Dog mutants.

Protoplast formation and regeneration. Protoplast formation was carried out from strains grown in 50 ml YEME medium supplemented with 5 mM MgCl₂·6H₂O and 0.5% glycine, as described by Kieser *et al.* (2000). Protoplast regeneration was carried out in R6 medium (Baltz & Matsushima, 1981) for 40 h. After regeneration, 1 ml sucrose (10.3%) and 50 µg thiostrepton were added, and incubation continued for another 48 h.

Southern blot analyses. The *glkA* and *SCO2127* genes from *S. coelicolor* were used as probes to detect their possible homologues in DNA from *S. peucetius* var. *caesius*. Using the method of Kieser *et al.* (2000), chromosomal DNA was extracted from 48 h cultures grown in YEME supplemented with 5 mM MgCl₂·6H₂O. Total DNA from the original *S. peucetius* var. *caesius* strain, and from *S. coelicolor* M145 as a positive control, was digested separately with *Bam*HI, *Eco*RI, *Pst*II and *Xho*I. After digestion, 10 µg of each digest was run on a 1% agarose gel. Southern blotting and hybridization were carried out according to the manufacturer's recommendations for the DIG High-Prime DNA Labelling and Detection Kit II (Roche Molecular Biochemicals).

Anthracycline and protein determination. Anthracyclines were extracted from harvested mycelia (96 h cultures) using acetone and 0.05 M sulfuric acid (4:1), according to Arcamone *et al.* (1969). Anthracyclines were quantified at 495 nm using a molar absorption coefficient of 220. For protein determination, samples were processed as previously reported (Segura *et al.*, 1997), and assayed by the Lowry method, using bovine serum albumin as a standard.

Glucose kinase assays. Glk activity from cell-free extracts prepared from 48 h mycelial cultures of the strains was measured spectrophotometrically by monitoring the reduction of NADP in a glucose-6-phosphate-dehydrogenase-coupled reaction at pH 7.2 and 25°C, as previously reported (Imriskova *et al.*, 2001; Ramos *et al.*, 2004). Glk activity was determined at 25°C and pH 7.5, and expressed as the amount of enzyme that produces 1 nmol NADPH min⁻¹.

Glucose uptake experiments. A 50 ml volume of the seed culture was used to inoculate a 2.8 l Fernbach flask containing 500 ml of a chemically defined medium (CD medium) with 100 mM D-glucose, as previously reported (Escalante *et al.*, 1999). After 36 h, mycelia (250 mg wet weight) were harvested, washed with 0.85% NaCl, and resuspended in a vial containing 4.5 ml saline. The suspension was incubated under agitation, and glucose transport was initiated by the addition of 5 µCi (185 kBq) D-[¹⁴C]glucose (38.8 MBq mmol⁻¹) in 475 µl 10 mM cold glucose, as previously reported (Escalante *et al.*, 1999). Radioactivity was determined by soaking the filter in vials containing 4 ml of a commercial liquid scintillation counting solution.

Isolation of RNA, and dot blot analyses. Total RNA of *S. peucetius* var. *caesius* was extracted from mycelia of the original strain and its derived Dog^R mutant, as well as from the Dog^R mutant transformed with *SCO2127*. RNA was isolated from cultures grown in YM medium with 100 or 500 mM glucose for 24 h (exponential growth phase) by the method of Chomczynski & Sacchi (1987). Residual DNA was eliminated by incubating the samples with DNase I for 1 h at 37°C. Total RNA was precipitated by addition of 0.1 vol. 3 M sodium acetate and 1 vol. ice-cold 2-propanol. RNA concentrations were determined spectrophotometrically, and RNA quality was checked by agarose-formamide electrophoresis, according to Kieser *et al.* (2000). RNA was stored at -70°C for no more than 2 weeks. For dot blot analysis, the RNA concentration

was adjusted to 1 µg µl⁻¹ with GFP (1 M glyoxal, 10 mM phosphate and 70% formamide), and then denatured at 55°C for 15 min. The resulting RNA was kept in an ice-bath until loaded onto Hybond-N⁺ membranes (Amersham). The amounts of total RNA applied to the membranes were 2, 5, 10 and 20 µg. To detect the *glk* mRNA, a digoxigenin-UTP-labelled *S. peucetius* var. *caesius* *glk* probe (900 bp) was utilized (DIG High-Prime DNA Labelling and Detection Starter Kit II; Roche). The hybridization assay was carried out overnight at 54°C. The *glk* mRNA was developed with an alkaline-phosphatase-antidigoxigenin conjugate, and CSPD [disodium 3-(4-methoxy-spiro[1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decan]-4-yl)phenyl]phosphate; Roche] as the light emission substrate, and the membrane was exposed to an autoradiography film. Total RNA from *Paenibacillus amylolyticus* was used as a negative control.

Reproducibility of results. The results shown are the mean values of at least two independent experiments carried out in triplicate. The observed variations were consistently less than 10%.

RESULTS

Transformation of Dog mutants

Protoplasts from Dog mutants were transformed with plasmids containing the *S. coelicolor* *glkA* and *SCO2127* genes individually or together. From each Dog mutant we isolated between one and three transformants containing the different constructs. Table 1 describes each of the seven strains derived from the transformation experiments. After subculturing these transformants for various numbers of generations under selective pressure, we were still able to recover our plasmids, suggesting that recombination into the bacterial chromosome does not occur.

Presence of *glkA* and *SCO2127* homologues in *S. peucetius* var. *caesius*

In order to corroborate the presence of the endogenous *glkA* and *SCO2127* genes in *S. peucetius* var. *caesius*, we carried out Southern blot experiments using probes obtained from *S. coelicolor*. As can be seen in Fig. 1, there was good hybridization in *S. peucetius* var. *caesius* with both probes, and it was comparable with that found with the *S. coelicolor* DNA used as the positive control. Additionally, the hybridization profiles found using *glkA* and *SCO2127* were identical to each other regardless of the restriction endonucleases used, showing that these genes are encoded on the same DNA fragment, and thus suggesting that the genomic organization of these genes is similar to that found in *S. coelicolor*, where they are found adjacent to each other, possibly in the same operon.

Sensitivity to glucose repression of the recombinants

In order to examine the effect that *glkA* and *SCO2127* have on CCR sensitivity, we analysed the effect of two different glucose concentrations upon anthracycline biosynthesis in our Dog mutant strains and their transformants. As shown in Table 2, compared with synthesis on 100 mM glucose (non-repressive concentration), all our mutants

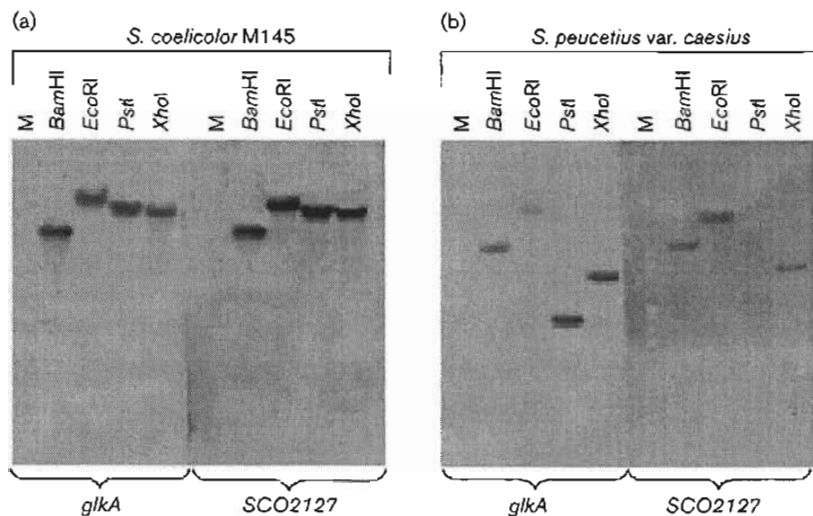


Fig. 1. Southern blot hybridization of total DNA from (a) *S. coelicolor* M145 and (b) *S. peuceitius* var. *caesius* original strain. The *S. coelicolor* A3(2) M145 *glkA* and *SCO2127* genes were used as probes. Total DNA (10 µg) was digested separately with *Bam*HI, *Eco*RI, *Pst*I and *Xho*I. Lanes M contained molecular size markers.

showed resistance to CCR in 500 mM glucose. However, with the exception of the Dog^S-2 mutant transformed with *glkA*, all other transformed strains obtained showed CCR sensitivity at both repressive and non-repressive glucose concentrations, and sensitivity to glucose repression was higher when compared with that of the original strain. Dog mutants transformed with plasmids without inserts did not show differences in sensitivity from that of the untransformed mutants. An effect similar to that found for production of anthracyclines was observed when the synthesis of β-galactosidase was monitored in these strains

Table 2. Anthracycline production by different *S. peuceitius* var. *caesius* mutants and their recombinants

Anthracycline production was determined after 120 h incubation in YM medium supplemented with low (100 mM) and high (500 mM) D-glucose.

Strain	Insert	Anthracycline production [µg (mg protein) ⁻¹]	
		100 mM D-glucose	500 mM D-glucose
Original	None	127.73 ± 10.3	6.71 ± 0.04
Dog ^R	None	547.08 ± 22.5	235.45 ± 7.12
SDR-1	<i>glkA</i>	45.49 ± 4.6	7.39 ± 0.23
SDR-2	<i>SCO2127</i>	4.91 ± 0.3	5.38 ± 0.38
Dog ^S -2	None	262.28 ± 3.1	163.86 ± 15.87
SDS-1	<i>glkA</i>	214.08 ± 1.1	108.04 ± 0.93
SDS-2	<i>SCO2127</i>	4.28 ± 0.1	3.15 ± 0.32
SDS-3*	<i>SCO2127</i> and <i>glkA</i>	21.72 ± 2.6	6.22 ± 0.06
Dog ^S -11	None	139.58 ± 5.3	67.19 ± 6.56
SDS-11	<i>glkA</i>	1.67 ± 0.1	2.14 ± 0.07
SDS-12	<i>SCO2127</i>	7.67 ± 0.6	5.00 ± 0.51
SDS-13*	<i>SCO2127</i> and <i>glkA</i>	10.74 ± 1.7	5.97 ± 0.49

*Dog mutants transformed with the low-copy-number plasmid pJ513.

(not shown). This suggests that an increase in flux through glycolysis, even at lower glucose concentrations, is able to induce CCR. According to their non-integrative characteristic (Ward *et al.*, 1986), after subculturing these transformants in the absence of a selective pressure (without thio strepton), the plasmids were lost, and the mutants recovered their resistance to CCR in 500 mM glucose, showing that no recombination took place between plasmids and chromosomal DNA.

Glucose kinase activity

To elucidate the mechanisms by which the mutant strains transformed with *glkA* and/or *SCO2127* recover CCR sensitivity, we investigated whether there was a connection between this phenotype and Glk activity. As can be seen in Table 3, with relation to the Dog mutants, all of the recombinant strains showed an increase in Glk activity. In some strains, Glk activity increased to almost 320%. Additionally, the increase in activity was observed regardless of which gene was expressed (*glkA* or *SCO2127*). *In situ* Glk activity analysis shows a single band with identical electrophoretic mobility (±32 kDa) in all of our strains (data not shown).

Glucose uptake

Considering that glucose metabolism starts with its incorporation into the cell, we explored the connection between the phenotype of our recombinants and this process by determining the capacity of these strains to incorporate D-[U-¹⁴C]glucose. Table 4 shows that all of the recombinants expressing *SCO2127* alone, SDR-2 (obtained from Dog^R), SDS-2 (obtained from Dog^S-2) and SDS-12 (obtained from Dog^S-11), showed a significant increase in glucose incorporation (between 1.7 and 3 times). Similarly if the mutant strains were transformed with the 2.9 kb fragment expressing both *SCO2127* and *glkA* (transformants SDS-3 and SDS-13), there was a strong increase in glucose transport. This effect does not seem to be due to the plasmid

Table 3. Glucose kinase activity levels of cell extracts from the original strain and several Dog^R and Dog^S mutants of *S. peucetius* var. *caesius* and their recombinants

Strains were grown for 48 h in YM medium supplemented with 100 mM D-glucose.

Strain	Insert	Glucose kinase	
		U (mg protein) ⁻¹	Percentage
Original	None	163.75 ± 13.7	100
Dog ^R	None	24.53 ± 0.2	15
SDR-1	<i>glkA</i>	155.56 ± 13.0	95
SDR-2	<i>SCO2127</i>	188.32 ± 15.8	115
Dog ^S -2	None	61.02 ± 4.9	37
SDS-1	<i>glkA</i>	522.34 ± 8.9	318
SDS-2	<i>SCO2127</i>	157.61 ± 2.4	96
SDS-3	<i>glkA</i> and <i>SCO2127</i>	190.03 ± 11.5	115
Dog ^S -11	None	137.55 ± 11.5	84
SDS-11	<i>glkA</i>	311.13 ± 26.1	190
SDS-12	<i>SCO2127</i>	245.63 ± 20.6	150
SDS-13	<i>glkA</i> and <i>SCO2127</i>	294.76 ± 24.7	180

copy number, since the 2.9 kb fragment was contained in the low-copy-number plasmid pIJ513. Conversely, none of the transformants containing only *glkA* showed significant changes in transport efficiency compared to the non-transformed strains.

Table 4. D-Glucose uptake by the original strain of *S. peucetius* var. *caesius*, and several Dog mutants and their recombinants

Strains were grown for 36 h in CD medium supplemented with 100 mM glucose.

Strains	Insert	Glucose uptake*	
		μmol (mg dry cell weight) ⁻¹	Percentage
Original	None	2.237 ± 0.194	100
Dog ^R	None	1.150 ± 0.049	51
SDR-1	(<i>glkA</i>)	1.094 ± 0.029	49
SDR-2	(<i>SCO2127</i>)	2.410 ± 0.060	108
Dog ^S -2	None	0.406 ± 0.019	18
SDS-1	(<i>glkA</i>)	0.439 ± 0.030	19
SDS-2	(<i>SCO2127</i>)	1.195 ± 0.026	54
SDS-3	(<i>glkA</i> and <i>SCO2127</i>)	1.350 ± 0.020	61
Dog ^S -11	None	1.587 ± 0.013	71
SDS-11	(<i>glkA</i>)	1.420 ± 0.098	64
SDS-12	(<i>SCO2127</i>)	2.720 ± 0.134	122
SDS-13	(<i>glkA</i> and <i>SCO2127</i>)	2.695 ± 0.096	121
Original†	None	0.081 ± 0.005	3

*D-[U-¹⁴C]Glucose incorporated over 30 s.

†Grown in CD medium supplemented with 30 mM L-glutamate instead of glucose.

Interestingly, when Dog^S-2 was transformed with *SCO2127*, either alone or in combination with *glkA*, glucose incorporation was increased three times. However, this increase barely reached 50% of the transport capacity found in the original strain.

RNA transcription

To gain more information about the stimulatory mechanism of *SCO2127*, transcription of *glk* was monitored by performing RNA dot blot experiments. As shown in Fig. 2, when *glk* mRNA levels from the original strain and a CCR-resistant mutant (Dog^R) were compared with those of the Dog^R mutant transformed with *SCO2127* (SDR-2), an increase in the *glk* mRNA levels was observed in the transformed mutant compared with those of the other strains. In contrast, lower *glk* mRNA levels were obtained in the Dog^R mutant. In addition, in comparison with cultures grown with 100 mM D-glucose, higher *glk* mRNA levels were observed when two of the strains (original and Dog^R mutant) were cultivated with 500 mM D-glucose. On the other hand, these differences were not found in cultures of the Dog^R mutant transformed with *SCO2127*. The glucose permease mRNA levels were not determined, since the sequence of this gene was only recently described (Bertram *et al.*, 2004).

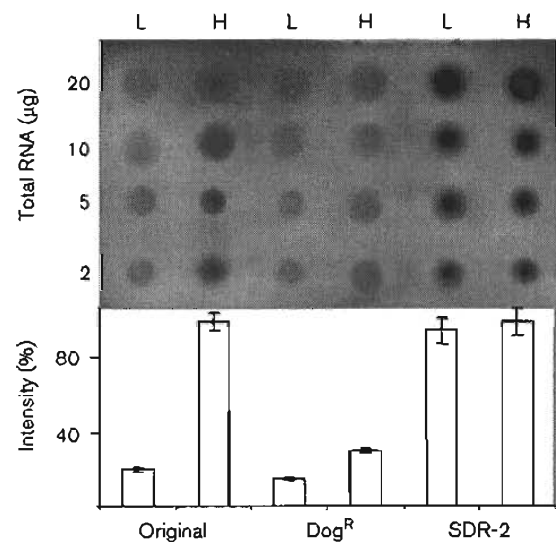


Fig. 2. RNA dot blot of *glk* mRNA from the original strain, a Dog^R mutant of *S. peucetius* var. *caesius*, and a recombinant derived from this mutant grown in YM medium with 100 (L) or 500 mM (H) D-glucose (SDR-2). The amounts of total RNA applied are indicated on the left. As an example of the relative signal intensities, the bar graph shows a densitometric quantification derived from the 2 μg RNA dot blot signals. The data are the means of three independent experiments. Standard deviations are indicated by error bars.

DISCUSSION

There is mounting evidence that Glk is not sufficient to elicit CCR in streptomycetes. It has been shown in *S. coelicolor* that resistance to 2-DOG yields mutants (Dog^R) with decreased Glk activity, and reversal of glucose repression (Hodgson, 1982). However, when these mutants are transformed with the *glkA* gene there is only a partial recovery of CCR sensitivity (Angell *et al.*, 1994). Complete recovery is only attained when the region containing both *glkA* and the *SCO2127* gene, located directly upstream of *glkA*, is introduced (Angell *et al.*, 1994). Additionally, Glk is not necessary for glucose repression of the *chi63* (chitinase) in *S. coelicolor* (Ingram & Westpheling, 1995), or for the expression of α -amylase in *Streptomyces kanamyceticus* (Flores *et al.*, 1993). This would suggest the existence of other molecules important for the regulation of CCR exerted by glucose.

Mutants of *S. peuceitius* var. *caesius* resistant to the inhibition of carbon source utilization by 2-DOG (Dog^R mutants) exhibit a pleiotropic phenotype, with decreased Glk activity and low glucose incorporation, which seem to cause reversal of glucose repression (Segura *et al.*, 1996; Escalante *et al.*, 1999). By applying an enrichment procedure to the Dog^R strain, several mutants were isolated that regained sensitivity to 2-DOG inhibition (Dog^S). Although sensitive to 2-DOG, these mutants exhibit different glucose uptake/Glk ratios, which render them totally or partially sensitive to CCR (Ramos *et al.*, 2004). In the present work, we have shown that both Dog^R and Dog^S phenotypes can be reverted to that of the original strain by transforming the mutants with plasmid pSG210, which expresses the 620 bp *SCO2127* gene of *S. coelicolor*. In these recombinant strains, glucose uptake and Glk activity values were restored to similar or even higher levels than the original strain, and the recombinants regained sensitivity to CCR. The effect of *SCO2127* on Glk activity correlated well with the *glk* mRNA levels observed in a CCR-resistant mutant transformed with this region. The above-mentioned results were quite unforeseen considering that the *SCO2127* region does not seem to code for either a glucose permease (Bertram *et al.*, 2004) or a glucose kinase (Angell *et al.*, 1994). Similar results were obtained by transformation with plasmid pIJ513 (Ikeda *et al.*, 1984), which contains both *SCO2127* and *glkA*. As expected, recombinants with plasmid pSG200 containing a 950 bp fragment with the *glkA* gene alone reverted to normal Glk activity values, but glucose uptake was unchanged.

Our hybridization experiments suggest that the *SCO2127* and *glkA* genes have a similar genomic organization in both *S. coelicolor* and *S. peuceitius* var. *caesius*, or are at least in close proximity within the chromosome. However, there appear to be no data published on the activity and expression of *SCO2127* in either of these systems (Angell *et al.*, 1994).

With regard to CCR sensitivity in the mutant strains

transformed with either *SCO2127* or *glkA*, anthracycline production showed increased sensitivity to the glucose effect, even at low carbohydrate concentrations (100 mM). This oversensitivity could be explained in terms of a better performance of *S. coelicolor* *SCO2127* and Glk activities in the *S. peuceitius* var. *caesius* intracellular environment, or by the high-copy-number plasmids harbouring either *SCO2127* or *glkA*. An exception to this observation was obtained with the Dog^S-2 mutant transformed with *glkA*. However, this recombinant exhibited about 80% less glucose incorporation compared to that of the original strain. Therefore, although containing a high Glk activity (three-fold higher), its glucose availability is probably very low.

As expected, under glucose-repressive conditions (500 mM), the original strain displayed higher *glk* mRNA levels than those observed in non-repressive concentrations (100 mM), again supporting the role of Glk activity in CCR sensitivity. These differences were also observed in a mutant resistant to CCR (Dog^R). In this case, the low *glk* mRNA levels observed under both repressive and non-repressive conditions correlated well with its CCR-resistant phenotype (Ramos *et al.*, 2004). On the other hand, although higher *glk* mRNA levels were observed in the Dog^R strain transformed with *SCO2127*, no differences were observed in this parameter under repressive and non-repressive conditions, explaining the oversensitivity of this recombinant to the glucose effect.

The question arises of how *SCO2127* mediates its stimulatory effect on glucose uptake and Glk activity. Our data from the *SCO2127*-transformed strains do not support the occurrence of recombination between pSG210 and the mutants' chromosomal DNA, thus eliminating the possibility of a highly transcribed *SCO2127* promoter as the cause of the stimulatory effect on Glk activity and glucose uptake. In addition, although the *glk* gene is located next to *SCO2127*, and in theory may be susceptible to a stimulatory effect from the *SCO2127* promoter, the *glcP1* (*SCO5578*) region, which was recently described as encoding a non-PTS glucose permease in *S. coelicolor* (Bertram *et al.*, 2004), was found to be located not in the vicinity of *SCO2127*, but on the opposite side of the conserved region of the chromosome. Considering the increase in *glk* mRNA levels observed in one of the CCR-resistant mutants transformed with *SCO2127*, we suggest that *SCO2127* is involved in stimulating transcription of *glk*, and probably that of the glucose permease gene as well. In conclusion, our data suggest the participation of an integral regulatory system, which is initiated with an increase in glucose incorporation and metabolism, resulting in an increased synthesis of catabolites, which may be involved in eliciting CCR in this micro-organism. In agreement with this possibility, among several products of glucose metabolism, fructose 1,6-bisphosphate and PEP exert CCR on anthracycline formation in *S. peuceitius* var. *caesius* (Ramos *et al.*, 2004), with fructose 1,6-bisphosphate being the most effective. This effect resembles that reported for fructose 1,6-bisphosphate

on the phosphorylation of Hpr kinase from *Bacillus subtilis* as a preliminary step for CCR (Jault *et al.*, 2000). This would suggest an increase in glycolytic flux as a requisite for the establishment of the phenomenon of CCR in *S. peuceitius* var. *caesius*.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Rafael Cervantes for excellent technical assistance. We are indebted to Marco Antonio Ortiz for strain-preservation studies. This work was partially supported by the grant IN-202903 from Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, México. Silvia Guzmán was recipient of a doctoral fellowship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México, and from Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México.

REFERENCES

- Angell, S., Schwartz, E. & Bibb, J. M. (1992). The glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2): its nucleotide sequence, transcriptional analysis and role in glucose repression. *Mol Microbiol* 6, 2833–2844.
- Angell, S., Lewis, C. G., Buttner, M. J. & Bibb, J. M. (1994). Glucose repression in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a likely regulatory role for glucose kinase. *Mol Genet* 244, 135–143.
- Arcamone, F., Cassinelli, G., Fantini, G., Grein, A., Orezzi, P., Poi, C. & Spalla, C. (1969). Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *Streptomyces peuceitius* var. *caesius*. *Biotechnol Bioeng* 11, 1101–1110.
- Baltz, R. H. & Matsushima, P. (1981). Protoplast fusion in *Streptomyces*: conditions for efficient genetic recombination and cell regeneration. *J Gen Microbiol* 127, 137–146.
- Bertram, R., Schlicht, M., Mahr, K., Nothhaft, H., Saier, M. H., Jr & Tittgemeyer, F. (2004). *In silico* and transcriptional analysis of carbohydrate uptake systems of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* 186, 1362–1373.
- Brückner, R. & Tittgemeyer, F. (2002). Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiol Lett* 209, 141–148.
- Champness, W. (1988). New loci required for *Streptomyces coelicolor* morphological and physiological differentiation. *J Bacteriol* 170, 1168–1174.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156–159.
- Demain, A. L. (1989). Carbon source regulation of idiolite biosynthesis in actinomycetes. In *Regulation of Secondary Metabolism in Actinomycetes*, pp. 127–131. Edited by S. Shapiro. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Escalante, L., Ramos, I., Imrskova, I., Langley, E. & Sánchez, S. (1999). Glucose repression of anthracycline formation in *Streptomyces peuceitius* var. *caesius*. *Appl Microbiol Biotechnol* 52, 572–578.
- Flores, M. E., Ponce, E., Rubio, M. & Hultron, C. (1993). Glucose and glycerol repression of amylase in *Streptomyces kanamyceticus* and isolation of deregulated mutants. *Biotechnol Lett* 15, 595–600.
- Hodgson, D. A. (1982). Glucose repression of carbon uptake and metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its perturbation in mutants resistant to 2-deoxyglucose. *J Gen Microbiol* 128, 2417–2430.
- Ikeda, H., Seno, E. T., Bruton, C. J. & Chater, K. F. (1984). Genetic mapping, cloning and physiological aspects of the glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Gen Genet* 196, 501–507.
- Imrskova, I., Langley, E., Arreguin-Espinoza, R., Aguilar, G., Pardo, J. P. & Sánchez, S. (2001). Purification and characterization of glucose kinase from *Streptomyces peuceitius* var. *caesius*. *Arch Biochem Biophys* 394, 137–144.
- Ingram, C. & Westpheling, J. (1995). The glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor* is not required for glucose repression of the *chi63* promoter. *J Bacteriol* 177, 3587–3588.
- Ingram, C., Delic, I. & Westpheling, J. (1995). *ccrA1*: mutation in *Streptomyces coelicolor* that affects the control of catabolite repression. *J Bacteriol* 177, 3579–3586.
- Jault, J.-M., Fieulaine, S., Nessler, S., Gonzalo, P., Di Pietro, A., Deutscher, J. & Galinier, A. (2000). The HPr kinase from *Bacillus subtilis* is a homo-oligomeric enzyme which exhibits strong positive cooperativity for nucleotide and fructose 1,6-bisphosphate binding. *J Biol Chem* 275, 1773–1780.
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F. & Hopwood, D. A. (2000). *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich: John Innes Foundation.
- Lydiate, D. J., Malpartida, F. & Hopwood, D. A. (1985). The *Streptomyces* plasmid SCP2*: its functional analysis and development into useful cloning vectors. *Gene* 35, 223–235.
- Nothhaft, H., Parche, S., Kamlonka, A. & Tittgemeyer, F. (2003). *In vivo* analysis of HPr reveals a fructose-specific phosphotransferase system that confers high-affinity uptake in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* 185, 929–937.
- Ramos, I., Guzmán, S., Escalante, L., Imrskova, I., Rodríguez-Sanoja, R., Sánchez, S. & Langley, E. (2004). The glucose kinase alone cannot be responsible for carbon source regulation in *Streptomyces peuceitius* var. *caesius*. *Res Microbiol* 155, 267–274.
- Saier, M. H., Jr, Chauvaux, S., Deutscher, J., Reizer, J. & Ye, J. J. (1995). Protein phosphorylation and regulation of carbon metabolism in Gram-negative versus Gram-positive bacteria. *Trends Biochem Sci* 20, 267–271.
- Segura, D., González, R., Rodríguez, R., Sandoval, T., Escalante, L. & 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.
- Segura, D., Santana, C., Gosh, R., Escalante, L. & Sánchez, S. (1997). Anthracyclines: isolation of overproducing strains by selection and genetic recombination of putative regulatory mutants of *Streptomyces peuceitius* var. *caesius*. *Appl Microbiol Biotechnol* 48, 615–620.
- Stülke, J. & Hillen, W. (1999). Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 2, 195–201.
- Tittgemeyer, F., Walkenhorst, J., Reizer, J., Stuiver, M. H., Cui, X. & Saier, M. H., Jr (1995). Identification and characterization of phosphoenolpyruvate:fructose phosphotransferase systems in three *Streptomyces* species. *Microbiology* 141, 51–58.
- Wang, F., Xiao, X., Saito, A. & Schremp, H. (2002). *Streptomyces olivaceoviridis* possesses a phosphotransferase system that mediates specific, phosphoenolpyruvate-dependent uptake of *N*-acetylglucosamine. *Mol Genet Genomics* 268, 344–351.
- Ward, J. M., Janssen, J. R., Kieser, T. & Bibb, M. J. (1986). Construction and characterization of a series of multi-copy promoter-probe plasmid vectors for *Streptomyces* using the aminoglycoside phosphotransferase gene from Tn5 as indicator. *Mol Gen Genet* 203, 468–478.

Applied Microbial and Cell Physiology

Sugar uptake and sensitivity to carbon catabolite regulation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*

Silvia Guzmán¹, Itzel Ramos^{1,3}, Elizabeth Moreno¹, Beatriz Ruiz¹,
Romina Rodríguez-Sanoja¹, Laura Escalante¹, Elizabeth Langley^{1,2} and
Sergio Sanchez¹

- (1) Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF 04510, Mexico
- (2) Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", México, DF 14000, Mexico
- (3) *Present address:* Department of Bacteriology, Enzyme Institute, The University of Wisconsin, Madison, WI 53706, USA

Sergio Sanchez Email: sersan@servidor.unam.mx

Received: 7 January 2005 **Revised:** 7 March 2005 **Accepted:** 12 March 2005 **Published online:** 6 April 2005

Abstract *Streptomyces peucetius* var. *caesius* produces a family of secondary metabolites called anthracyclines. Production of these compounds is negatively affected in the presence of glucose, galactose, and lactose, but the greatest effect is observed under conditions of excess glucose. Other carbon sources, such as arabinose or glutamate, show either no effect or stimulate production. Among the carbon sources that negatively affect anthracycline production, glucose is consumed in greater concentrations. We determined glucose and galactose transport in *S. peucetius* var. *caesius* and in a mutant of this strain whose anthracycline production is insensitive to carbon catabolite repression (CCR). In the original strain, incorporation of glucose and galactose was stimulated when the microorganism was grown in media containing these sugars, although we also observed basal galactose incorporation. Both the induced and the basal incorporation of galactose were suppressed when the microorganism was grown in the presence of glucose. Furthermore, adding glucose directly during the transport assay also inhibited galactose incorporation. In the mutant strain, we observed a reduction in both glucose (48%) and galactose (81%) incorporation compared to the original. Galactose transport in this mutant showed reduced sensitivity to the negative effect of glucose; however, it was still sensitive to

inhibition. The deficient transport of these sugars, as well as CCR sensitivity to glucose in this mutant was corrected when the mutant was transformed with the *SCO2127* region of the *Streptomyces coelicolor* genome. Our results support a role for glucose as the most easily utilized carbon source capable of exerting the greatest repression on anthracycline biosynthesis. In consequence, glucose also prevented the repressive effect of galactose by suppressing its incorporation. This suggests the participation of an integral regulatory system, which is initiated by an increase in incorporation of repressive sugars and their metabolism as a prerequisite for establishing the phenomenon of CCR in *S. peucetius* var. *caesius*.

Introduction

Streptomyces are Gram positive microorganisms capable of synthesizing a great number of hydrolytic enzymes that allow them to utilize a wide variety of proteins and polysaccharides as carbon source (Rose 1979; Crandall and Hamill 1986; Frost and Moss 1987). Analysis of the *Streptomyces coelicolor* genome has revealed the presence of genes encoding proteases, chitinases, amylases, and cellulases (Bertram et al. 2004). In complex culture media, these enzymes can generate primary degradation products (amino acids, fatty acids and sugars) for further utilization. Among these carbon sources, the type and concentration of sugars has played an important role in microbial fermentations of industrial interest. One of the most important systems for sugar uptake in Gram positive and Gram negative microorganisms is the phosphoenolpyruvate:sugar system (PTS) (Saier et al. 1995). This system has been described in three *Streptomyces* species (*S. coelicolor*, *S. griseofuscus* and *S. lividans*) (Titgemeyer et al. 1995). In *S. coelicolor*, this system comprises three proteins, EI, HPr and enzyme II (II^{Fru}), which are induced by *N*-acetylglucosamine and permit fructose incorporation into the cell and its phosphorylation to fructose 1-phosphate (Nothaft et al. 2003). However, this system does not seem to be involved in the uptake of other carbon sources such as glucose and mannitol (Titgemeyer et al. 1995). Besides PTS, fructose can be phosphorylated by an ATP-dependent fructokinase (Titgemeyer et al. 1995). Similarly, it has been reported that glucose and galactose phosphorylation is carried out by their respective kinases (Hodgson 1982; Kendall et al. 1987), implying the existence of specific permeases for their transport into the cell. Recently, van Wezel et al. (2005) provided elegant evidence supporting a glucose transporter in *S. coelicolor* encoded by *glcP* and induced by D-glucose.

Streptomyces peucetius var. *caesius* produces a family of polyketide antibiotics known as anthracyclines. Among these, daunorubicin and doxorubicin are of great clinical importance due to their antineoplastic activity (Arcamone et al. 1969). This strain grows and produces anthracyclines in the presence of a number of carbon sources such as mannose, cellobiose, lactose, fructose, maltose and starch (Dekleva et al. 1985; Segura et al. 1996). Both carbon utilization and anthracycline production are susceptible to regulation by glucose in this microorganism (Escalante et al. 1999). From the original *S. peucetius* var. *caesius* strain, we have isolated mutants resistant to a non-metabolizable glucose analogue, 2-deoxyglucose (DOG). In these mutants

(Dog^R), anthracycline production is less sensitive to the repressive effects of glucose (Segura et al. 1996). Additionally, the mutants present low glucose kinase (Glk) activity and decreased glucose incorporation (Escalante et al. 1999). Although anthracycline production in Dog^R mutants is resistant to glucose, supplementation of the culture medium with fructose 1,6 bis-phosphate or phosphoenolpyruvate, both glucose degradation products, exerted a negative effect on anthracycline biosynthesis (Ramos et al. 2004). Analysis of these results has suggested that glucose exerts catabolic repression on anthracycline synthesis (Escalante et al. 1999), and that this effect depends on both the microorganism's ability to incorporate glucose and its phosphorylation by Glk, culminating in the production of the metabolic signals possibly responsible for repression (Ramos et al. 2004). The role for Glk in this regulatory process has been intensively studied in *Streptomyces* (Angell et al. 1992; Imriskova et al. 2001; Kwakman and Postma 1994; Ramos et al. 2004). In this study we propose to delve into the role that transport of various repressive carbon sources plays in the process of carbon catabolite repression (CCR). Additionally, we will explore the possible relationship between these carbon sources and their manifestations in this phenomenon. With this purpose in mind, we selected carbohydrates that have a negative effect on anthracycline production. The compounds selected were analyzed in terms of their incorporation into the cell in various strains under different experimental conditions. The strains utilized were the original *S. peucetius* var. *caesius* strain, a mutant derivative insensitive to regulation by glucose (Dog^R), and the same mutant carrying a DNA fragment from *S. coelicolor* termed *SCO2127*. This fragment encodes a putative 572 bp long open reading frame (ORF) that is localized just upstream of the *glkA* gene encoding Glk (Angell et al. 1992). *SCO2127* has been shown to be necessary to completely restore CCR sensitivity in mutants (Dog^R) complemented with the *glkA* gene (Angell et al. 1994) and is suggested to be involved in glucose transport or its metabolism. Both genes are expressed as part of a polycistronic mRNA; however, the function of the putative protein produced by the *SCO2127* region is as yet undetermined.

Materials and methods

Bacterial strains and cultivation

S. peucetius var. *caesius* NRRL B-5337 was kindly provided by the ARS culture collection (United States Department of Agriculture, Peoria, Ill.). The Dog^R strain is a spontaneous mutant previously isolated in this laboratory through its resistance to growth inhibition by DOG (Segura et al. 1996). Compared to the original strain, this mutant contains only 14% Glk activity and is insensitive to CCR by glucose (Escalante et al. 1999). Both strains are maintained in a viable condition at the UNAM-48 Culture Collection (Mexico D.F.). For anthracycline production, we used 2.5 ml samples of a seed culture (Segura et al. 1996), washed and resuspended in sterile distilled water, to inoculate 50 ml YM medium with the desired carbon source concentration, contained in 250-ml baffled Erlenmeyer flasks. YM medium contains (l⁻¹): 4 g yeast extract, 10 g malt extract, pH 7.2. For uptake experiments, 50 ml seed culture (Segura et al. 1996)

previously washed and resuspended in sterile distilled water were used to inoculate a 2.8-l Fernbach flask containing 500 ml uptake minimal medium (UM; Escalante et al. 1999). The UM medium was supplemented with 10 mM (NH₄)₂SO₄ and 100 mM of the desired carbon source (D-glucose or D-galactose). To test the effect of glucose on galactose transport, the sugar uptake was determined in cultures grown in UM medium supplemented with 100 mM galactose plus 300 mM glucose. To measure the effect of glucose on galactose incorporation, D-[1-¹⁴C]galactose uptake was determined in 10 mM galactose plus 2 and 5 mM D-glucose. Cultures were grown for 36 h at 29°C in a rotary shaker at 180 rpm.

Construction of the recombinant strain

The *SCO2127* gene from *S. coelicolor* was amplified using PCR from total DNA of strain M145. Oligonucleotides were designed based on the reported gene sequences (Angell et al. 1992) covering the promoter region and the transcriptional terminator. For *SCO2127* the primers were: forward (5'-CGGAGATCTGGCCGCGGGG-3') and reverse (5'-GGCAAGCTTACCCGAGGC-3'). The primers contain restriction sites for *Bgl* II and *Hind*III (underlined), respectively, for cloning into the corresponding sites within the vector pIJ486. PCR conditions for *SCO2127* amplification were an initial denaturation step at 94°C (5 min), then 94°C (1 min), 57°C (1 min), 72°C (1 min) for 20 cycles and a final extension period at 72°C (5 min). PCR products of 694 bp were digested, purified and cloned into pIJ486, generating pSG210 containing *SCO2127*.

These plasmids were used to transform *S. peucetius* var. *caesius* protoplasts from the Dog^R mutant using traditional methods (Kieser et al. 2000); a transformation frequency of 300 transformants/μg DNA was obtained. Transformation of the pSG210 plasmid into the mutant strain was relatively stable, showing little or no integration into the chromosome, as substantiated by the fact that after several generations we were able to recover the plasmid from our transformed strain.

Protoplast formation and regeneration

Protoplast formation was carried out from strains grown in 50 ml YEME medium complemented with 5 mM MgCl₂·6H₂O and 0.5% glycine as described by Kieser et al. (2000). Protoplast regeneration was carried out in R6 medium (Balts and Matsushima 1981) for 40 h. After regeneration, 1 ml sucrose (10.3%) and 50 μg thiostrepton were added and incubation continued for another 48 h.

Anthracycline and protein determination

Anthracyclines were extracted from harvested mycelia (120 h cultures) using acetone and 0.05 M sulfuric acid [4:1] according to Arcamone et al. (1969). Anthracyclines were quantified at 495 nm, using a molar extinction coefficient of 220. For protein determination, samples were processed as previously reported (Segura et al. 1996), and assayed by the Lowry method, using bovine serum albumin as standard (Lowry et al. 1951).

Uptake experiments

Seed culture (50 ml) was used to inoculate a 2.8-l Fernbach flask containing 500 ml UM medium and the desired carbon source. After 36 h, mycelia (250 mg wet weight) were harvested, washed with distilled water and resuspended in a vial containing 4.5 ml saline solution. The suspension was incubated under agitation and transport initiated by the addition of 25 μl of either D- ^{14}C glucose (38.8 MBq mmol^{-1}) or D-[1- ^{14}C]galactose (19.2 MBq mmol^{-1}), in 475 μl containing 10 mM non-radioactive sugar, as previously reported (Escalante et al. 1999). Cells were recovered by filtration, and radioactivity was determined by soaking the filter in vials containing 4 ml of a commercial liquid scintillation counting solution.

Results

Effect of various carbon sources on anthracycline production

Streptomyces peucetius var. *caesius* produces a family of secondary metabolites named anthracyclines. We determined the effect of a variety of carbon sources on anthracycline biosynthesis (Fig. 1) and found that, compared to a control, production was negatively affected in the presence of glucose (88%), galactose (69%) and lactose (25%). Other carbon sources, such as arabinose and glutamate, had no effect or were able to stimulate biosynthesis. Additionally, pH values varied between 5 and 9 depending on the carbon source utilized. However, we were unable to establish a correlation with the production of anthracyclines in each case since at similar pH values we found low (condition 2) and high (condition 3) anthracycline production.

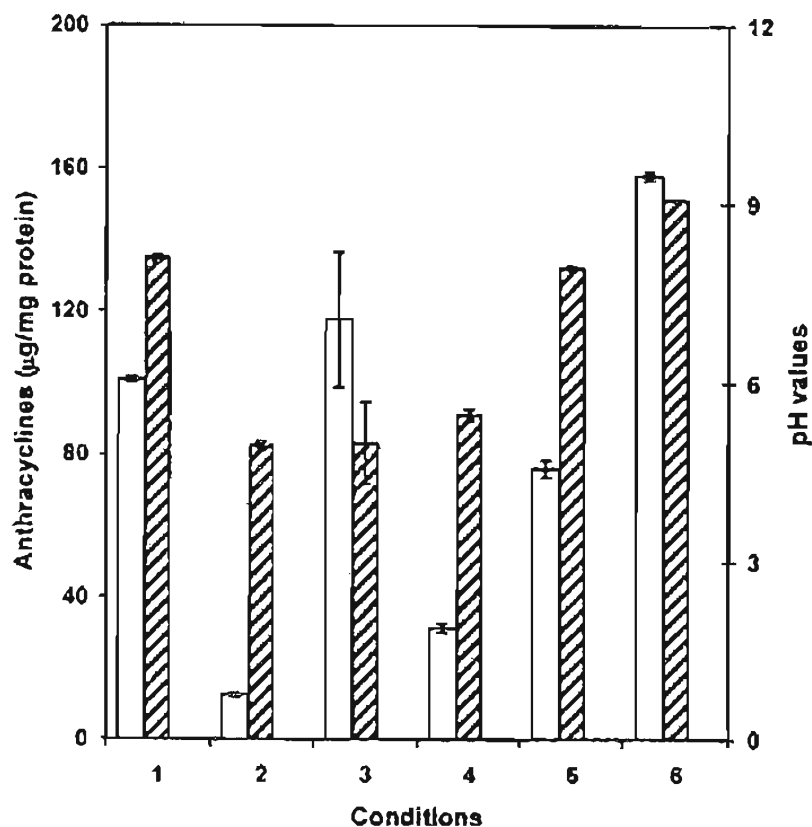


Fig. 1 Effect of various carbon sources on anthracycline production in the original *Streptomyces peucetius* var. *caesius* strain. Production (*white bars*) was determined at 120 h of fermentation. 1 Control, 2 glucose 330 mM, 3 arabinose 330 mM, 4 galactose 330 mM, 5 lactose 330 mM, 6 glutamate 40 mM. *Hatched bars* pH values for each condition at the same fermentation time point

Glucose and galactose transport

In order to establish a possible relationship between the negative effects exerted by glucose and galactose on anthracycline synthesis and the incorporation of these sugars into the cell, we carried out transport assays using the original *S. peucetius* var. *caesius* strain. As seen in Fig. 2, compared to a control in which the original strain was grown in the absence of sugar, cultures grown in the presence of glucose or galactose (100 mM) showed an increase in glucose and galactose incorporation of 20 and 4 times, respectively after 10 s. Additionally, galactose showed a basal incorporation of 25%. Figure 2 also shows that glucose is transported in greater concentrations (almost 15-fold higher) than galactose. It is interesting to note that although glucose and galactose (lactose degradation products) can be transported into these cells, incorporation of lactose was minimal (almost 100 times less than that of glucose) and

there were no differences between cells grown in the presence or absence of lactose (not shown).

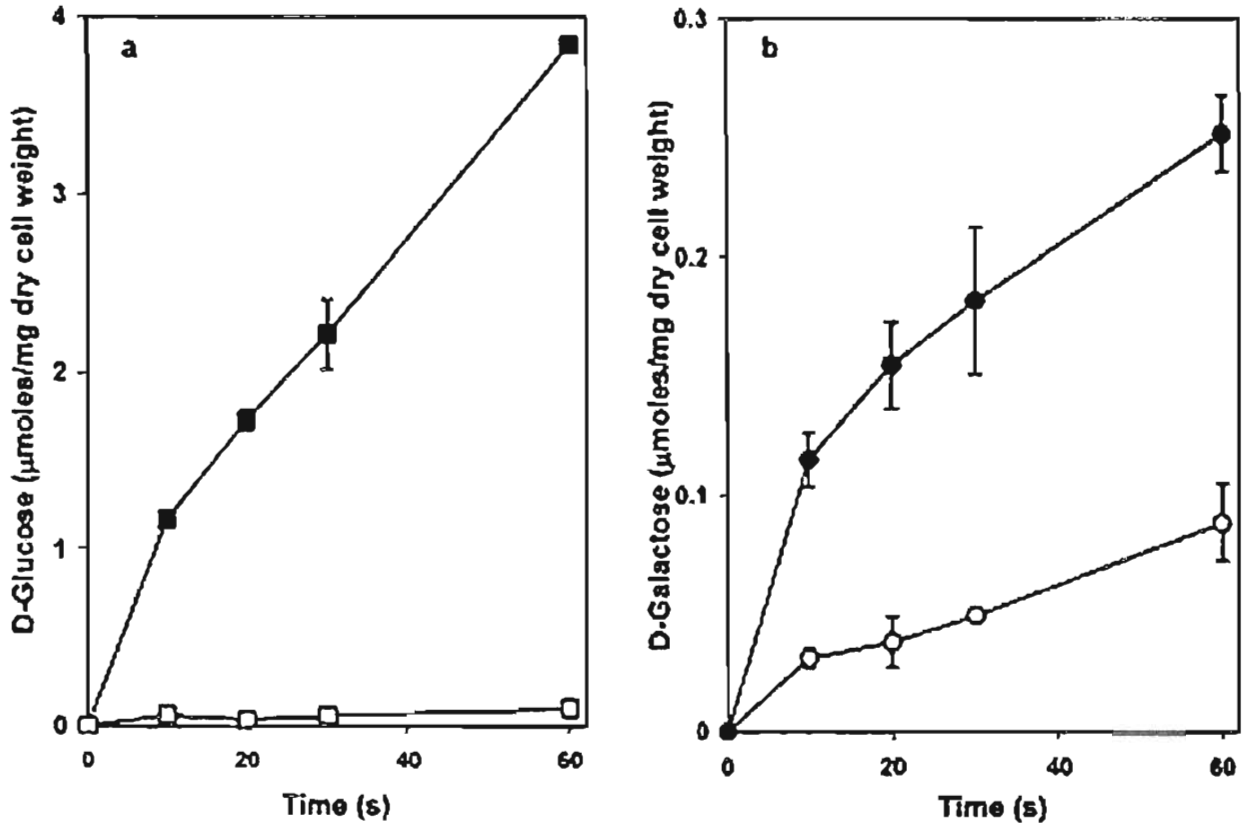


Fig. 2 Glucose (a) and galactose (b) (10 mM) transport in mycelia from the original *S. peucetius* var. *caesius* strain grown in 100 mM glucose or galactose (filled symbols). Controls (open symbols) were grown in 20 mM glutamate

Effect of glucose on galactose transport

In order to elucidate the relationship between these two carbon sources, we determined the effect of glucose on galactose transport, and vice versa. As shown in Fig. 3, when the original strain was grown in galactose plus glucose, galactose transport was almost completely suppressed. Conversely, galactose did not significantly affect glucose transport (data not shown). Additionally, adding different concentrations of glucose directly to the galactose transport assay system inhibited galactose transport by almost 95%. This effect was observed even when glucose was added in concentrations five and two times lower than that of galactose.

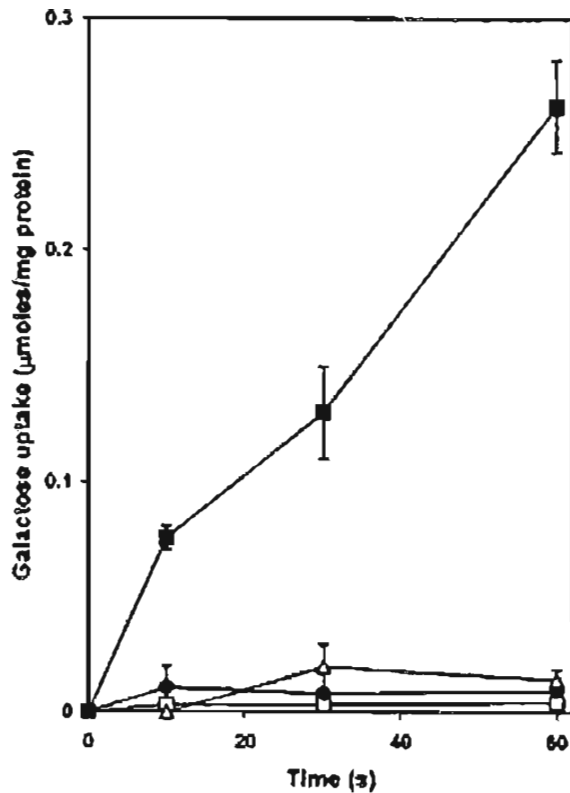


Fig. 3 Effect of glucose on galactose (10 mM) transport into cells of the original *S. peucetius* var. *caesius* strain grown in 100 mM galactose. Filled squares Galactose transport in the absence of glucose. Glucose concentrations tested were 2 mM (open triangles) and 5 mM (filled circles). Open squares Galactose transport in cells grown in 100 mM galactose plus 300 mM glucose

Glucose and galactose transport in a mutant resistant to CCR

To delve into the relationship between sugar transport and sensitivity to CCR, we repeated the glucose and galactose incorporation assays in a mutant strain (Dog^R) resistant to this regulatory effect. As shown in Fig. 4, when the mutant was grown in the presence of glucose or galactose, transport of these sugars was reduced 50 and 70%, respectively compared to the original *S. peucetius* var. *caesius* strain. Furthermore, glucose transport in this mutant was still inducible and basal galactose transport was conserved.

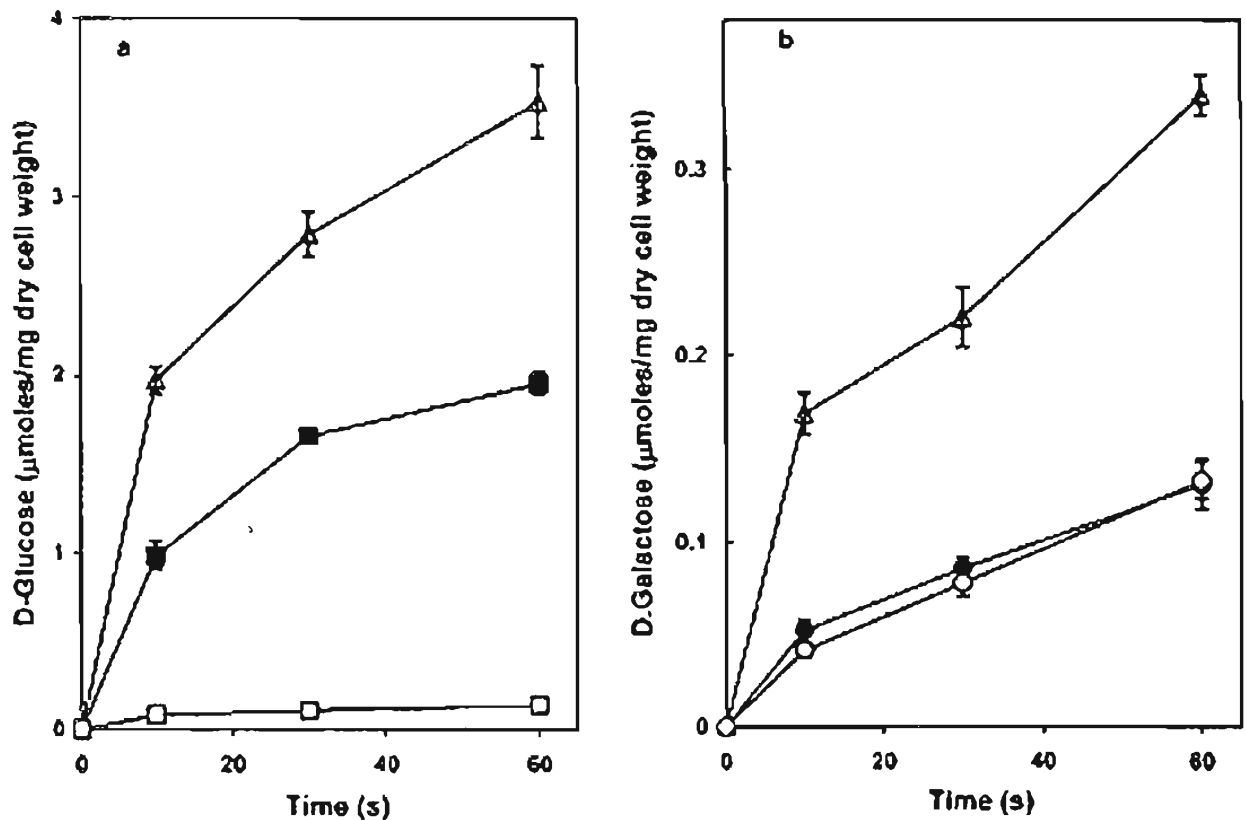


Fig. 4 Glucose (a) and galactose (b) (10 mM) transport in mycelia from the Dog^R mutant derived from *S. peucetius* var. *caesius* grown in 100 mM glucose or galactose (filled squares, filled circles). Glucose (open squares) and galactose (open circles) transport in cells grown in 20 mM glutamate. Open triangles Glucose and galactose transport in the original strain grown in 100 mM of the respective sugar as a control

In order to understand the sensitivity of the galactose transport system to the negative effects mediated by glucose in this mutant, we measured galactose transport in cultures grown in galactose alone and galactose plus glucose. As can be seen in Table 1, the mutant exhibits lower sensitivity to glucose (65%) compared to the original strain (95%) (Fig. 3), but it remained sensitive to the inhibitory effect of glucose. The lower glucose sensitivity of galactose uptake by the mutant probably reflects its 50% reduction in glucose transport.

Table 1 Galactose transport in the Dog^R mutant of *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. Gal Galactose, Glc glucose

Growth	Assay ^a	Nanomoles per milligram dry cell weight ^b	Percent
Gal 100 mM	Gal 10 mM	69.90	100.00
Gal 100 mM	Gal 10 Glc 10 mM	2.63	3.76
Gal 100 Glc 330 mM	Gal 10 mM	24.80	35.40

^aFive-milliliter system containing the cellular pellet suspended in 4.5 ml saline. Transport is initiated by addition of 25 μ l D-[1-¹⁴C]galactose (19.2 MBq mmol⁻¹), in 475 μ l 10 mM galactose (or 10 mM galactose plus 10 mM glucose). ^bGalactose incorporated at 30 s of incubation time

Glucose and galactose transport in the Dog^R mutant transformed with region SCO2127

In order to evaluate whether the *SCO2127* region has an effect over the transport system for glucose and galactose, we constructed a recombinant strain of the mutant Dog^R expressing this region. As can be seen in Table 2, compared to the Dog^R mutant, the recombinant strain not only regained glucose and galactose transport to an extent greater than the original *S. peucetius* var. *caesius* strain, but also regained its sensitivity to catabolic repression induced by glucose or galactose.

Table 2 Effect of the *SCO2127* region of *S. coelicolor* on glucose transport and sensitivity to glucose repression

Strains	Glucose uptake (%) ^a	Galactose uptake (%) ^a	Sensitivity to D-glucose or D-galactose ^b
Original	100	100	S
Dog ^R	51	35	R
Dog ^R + <i>SCO2127</i>	108	120	S

^aCultures were grown in 100 mM glucose or 100 mM galactose. Values for incorporation of glucose (3.84±0.02 μ mol/mg dry cell weight) and galactose (0.26±0.02 μ mol/mg dry cell weight) at 60 s of incubation time were set as 100%

^bCultures were grown in D-glucose or D-galactose (330 mM). Sensitivity was visualized as red colored pigments (anthracyclines) formed in the presence of the sugars. Sensitive strains (S) do not produce pigments, resistant mutants (R) do

Discussion

Many different mechanisms for negative carbon catabolite effects exist in microorganisms (Saier [1996](#)). In *S. peucetius* var. *caesius*, glucose, usually an excellent carbon source for growth, interferes with the formation of anthracyclines (Escalante et al. [1999](#)). Additionally, in this microorganism glucose represses enzymes involved in the utilization of lactose and xylose (Segura et al. [1996](#)). Glk seems to play an important role in the mechanism of glucose repression. However, its regulatory function has not yet been elucidated. In the present work we found that, in addition to glucose, galactose and lactose also repressed anthracycline formation, although glucose has the highest effect. In agreement with these results, of the carbon sources negatively affecting anthracycline production, glucose is incorporated with greater efficiency by this microorganism.

In a previous paper, we reported that glucose uptake seemed to be inducible by its own substrate (Ramos et al. [2004](#)). A similar effect was obtained in the present work, since glucose transport was stimulated 20-fold in mycelia grown in this sugar while there was practically no incorporation when other sugars were used as carbon source for growth. Recently, a glucose transport system was identified in *S. coelicolor* (van Wezel et al. [2005](#)). Although this system is encoded by two distinct loci (*glcP1* and *glcP2*), only *glcP1* seems to be functional, and is inducible by glucose. Our results in *S. peucetius* var. *caesius* correlate with the expression experiments for *glcP1* reported for *S. coelicolor* (van Wezel et al. [2005](#)), supporting an inducible glucose transport in both species.

Similar to glucose, galactose transport in *S. peucetius* var. *caesius* was stimulated 4-fold in mycelia grown in the presence of this sugar. However, the level of galactose incorporation was almost 15 times less compared to that observed for glucose (0.25 μg mol/mg dry cell weight galactose vs 3.84 μmol /mg dry cell weight glucose). This suggests that, in *S. peucetius* var. *caesius*, glucose is more easily utilized than galactose. In *S. coelicolor*, galactose transport appears to be constitutive (Hodgson [1982](#)). Genes for the utilization of galactose have been identified in *S. lividans*. The products of the *galKEIT* operon in *S. lividans* mediate the funneling of galactose into glycolysis. The promoter region of the *galKEIT* operon has been analyzed with respect to its role in glucose repression and seems also to be glucose sensitive (Mattern et al. [1993](#)). Homologs of these galactose genes have also been detected in *S. coelicolor* (Adams et al. [1988](#)). However, the galactose transporter-encoding gene has so far not been elucidated.

In addition to the induced uptake of galactose, a basal incorporation was also detected. Basal transport of galactose seems to be constitutive and makes up 36% of the total galactose uptake observed in induced cells. In *S. coelicolor*, other groups have reported constitutive uptake of xylose, lactose and mannitol, and two genes (*rbsH* and *rbs 3*) potentially involved in ribose incorporation have been identified (Bertram et al. [2004](#)).

It is interesting to note that although glucose and galactose (both lactose degradation products) were easily transported by the original *S. peucetius* var. *caesius* strain, lactose incorporation was minimal (almost 100-fold less than that of glucose). In *S.*

lividans, Eckhardt et al. (1987) found that, in the presence of lactose, β -galactosidase is synthesized and excreted into the fermentation medium to hydrolyze the disaccharide, resulting in the production of glucose and galactose. The presence of these sugars in the medium may explain the partial inhibitory effect on anthracycline biosynthesis exerted by this disaccharide.

In *S. peucetius* var. *caesius*, we found that both basal and induced incorporation of galactose were suppressed when the microorganism was grown in the presence of glucose, suggesting a repressive effect on galactose transport and supporting yet again the greater hierarchical position of glucose as the easiest utilizable carbon source. In addition to its possible repressive effect, glucose almost completely inhibited galactose transport, resembling the inducer exclusion mechanism described for low G-C Gram positive bacteria. In these bacteria, inducer exclusion involves allosteric control by HPr(Ser-P) or control via HPr(His~P)-dependent phosphorylation. Preferential utilization of glucose has also been described in *S. coelicolor*. An example of this occurs with glycerol transport. It seems that two inducible transport systems for glycerol exist, one of which is inhibited and repressed by glucose, the other being only repressed by this carbohydrate (Hodgson 1982).

Additional evidence in favor of the importance of sugar transport in sensitivity to CCR in *S. peucetius* var. *caesius*, was obtained by using a mutant (Dog^R), whose synthesis of anthracyclines is insensitive to catabolic repression by glucose. When we measured glucose and galactose transport in this mutant, we observed a reduced incorporation of each sugar of 48 and 81%, respectively. This decrease in intracellular concentration of sugars could explain, at least in part, the basis for the observed resistance. As a consequence, basal incorporation of galactose also showed a lower sensitivity to the negative effects of glucose.

The deficiency in the incorporation of these sugars, as well as sensitivity to glucose, were corrected when the Dog^R mutant was transformed with the *SCO2127* region of *Streptomyces coelicolor*. The above mentioned results were quite unforeseen considering that this region does not seem to code for a glucose permease (Angell et al. 1994; Bertram et al. 2004). The question arises of how *SCO2127* mediates its stimulating effect on glucose and galactose uptake. Our data from the transformed strains suggests that this region is expressed and may function as a trans-acting factor in glucose metabolism. Recently, we have obtained experimental evidence suggesting that *SCO2127* also functions as a putative transcriptional activator of Glk (Guzmán et al. 2005). The obvious consequence of these actions, the stimulation of both glucose transport and Glk, is the synthesis of catabolites that elicit CCR in this microorganism. In agreement with this possibility, among several products of glucose metabolism, fructose 1,6 bis-phosphate and phosphoenolpyruvate exert CCR on anthracycline formation in *S. peucetius* var. *caesius* (Ramos et al. 2004) with fructose 1,6 bis-phosphate being the most effective. This effect resembles that reported for fructose 1,6 bis-phosphate on phosphorylation of Hpr kinase from *Bacillus subtilis* as a preliminary step in CCR (Jault et al. 2000).

In conclusion, the results obtained in this work support glucose as both the most easily metabolizable carbon source and the sugar most capable of exerting the greatest

repression over anthracycline biosynthesis. In consequence, glucose prevented the suppressive effect of galactose by suppressing incorporation of the latter into the cell. Additionally, these data suggest the participation of an integral regulatory system that is initiated by an increase in incorporation of repressive sugars, as well as their metabolism, as a requisite for the establishment of the phenomenon of CCR in *S. peucetius* var. *caesius*.

Acknowledgements We are indebted to Marco A. Ortíz Jiménez for strain preservation studies. This work was partially supported by grant IN-202903 from Dirección General de Asuntos del Personal Académico UNAM, México. Silvia Guzmán was the recipient of a doctoral fellowship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México and from Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México.

References

- Adams CW, Fornwald JA, Schmidt FJ, Rosenberg M, Brawner ME (1988) Gene organization and structure of the *Streptomyces lividans* gal operon. *J Bacteriol* 170:203–212
- Angell S, Schwartz E, 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
- Angell S, Lewis CG, Buttner MJ, Bibb JM (1994) Glucose repression in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a likely regulatory role for glucose kinase. *Mol Gen Genet* 244:135–143
- Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G, Grein A, Orezzi P, Pol C, Spalla C (1969) Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol Bioeng* 11:1101–1110
- Balts RH, Matsushima P (1981) Protoplast fusion in *Streptomyces*: conditions for efficient genetic recombination and cell-regeneration. *J Gen Microbiol* 127:137–146
- Bertram R, Schlicht M, Mahr K, Nothaft H, Saier MH Jr, Titgemeyer F (2004) In silico and transcriptional analysis of carbohydrate uptake systems of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* 186:1362–1373
- Crandall LW, Hamill RL (1986) Antibiotics produced by *Streptomyces*: major structural classes. In: Queener SW, Day LE (eds) *The bacteria*, vol 9. Academic, New York, pp 355–402
- Dekleva ML, Titus JA, Strohl WR (1985) Nutrient effects on anthracycline production by *Streptomyces peucetius* in a defined medium. *Can J Microbiol* 31:287–294
- Eckhardt T, Strickler J, Gorniak L, Burnett WB, Fare LR (1987) Characterization of the promoter signal sequence and amino terminus of a secreted β -galactosidase from *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol* 169:4249–4256
- Escalante L, Ramos I, Imriskova I, Langley E, Sanchez S (1999) Glucose repression of anthracyclines formation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Appl Microbiol Biotechnol* 52:572–578

Frost MG, Moss DA (1987) Production of enzymes by fermentation. In: Rehm HJ, Reed G (eds) *Biotechnology*, vol 7a. VCH, Weinheim, pp 108–110

Guzmán S, Carmona A, Escalante L, Imriskova I, López R, Rodríguez-Sanoja R, Ruiz B, Servín-González L, Sánchez S, Langley E (2005) Pleiotropic effect of the *SCO2127* gene on the glucose uptake, glucose kinase activity and carbon catabolite repression in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Microbiology* (in press)

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

Imriskova I, Langley E, Arreguín-Espinoza R, Aguilar G, Pardo JP, Sanchez S (2001) Purification and characterization of glucose kinase from *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Arch Biochem Biophys* 394:137–144

Jault JM, Fieulaine S, Nessler S, Gonzalo P, Di Pietro A, Deutscher J, Galinier A (2000) The HPr kinase from *Bacillus subtilis* is a homo-oligomeric enzyme which exhibits strong positive cooperativity for nucleotide and fructose 1,6-bisphosphate binding. *J Biol Chem* 275:1773–1780

Kendall K, Ali-Dunkrah U, Cullum J (1987) Cloning of the galactokinase gene (*galK*) from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Gen Microbiol* 133:721–725

Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA (2000) *Practical Streptomyces genetics*. John Innes Foundation, Norwich

Kwakman JHJM, Postma PW (1994) Glucose kinase has a regulatory role in carbon catabolite repression in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* 176:2694–2698

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chemistry* 193:265–275

Mattern SG, Brawner ME, Westpheling J (1993) Identification of a complex operator for *galP1*, the glucose-sensitive, galactose-dependent promoter of the *Streptomyces* galactose operon. *J Bacteriol* 175:1213–1220

Nothaft H, Dresel D, Willimek A, Mahr K, Niederweis M, Titgemeyer F (2003) The phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is biased for *N*-acetylglucosamine metabolism. *J Bacteriol* 185:7019–7023

Ramos I, Guzmán S, Escalante L, Imriskova I, Rodríguez-Sanoja R, Sanchez S, Langley E (2004) The glucose kinase alone cannot be responsible for carbon source regulation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Res Microbiol* 155:267–274

Rose AH (1979) Production and industrial importance of secondary products of metabolism. In: Rose AH (ed) *Economic microbiology*, vol 3. Academic, New York, NY, pp 1–33

Saier MH Jr (1996) Cyclic AMP-independent catabolite repression in bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 138:97–103

Saier MH Jr, Chauvaux S, Deutscher J, Reizer J, Ye JJ (1995) Protein phosphorylation and regulation of carbon metabolism in Gram-negative versus Gram-positive bacteria. *Trends Biochem Sci* 20:267–271

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

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

Wezel GP van, Mahr K, König M, Traag BA, Pimentel-Schmitt EF, Willimek A, Titgemeyer F (2005) GlcP constitutes the major glucose uptake system of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* 55:624–636