



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Efecto de la sobreexpresión de los genes
SCO2127 Y *glkA* en la represión catabólica
por glucosa en *Streptomyces peucetius* var.
caesius.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

MARTÍN ALONSO CARMONA TÉLLEZ

BAJO LA DIRECCION DE:
DRA. SILVIA GUZMÁN BELTRÁN



2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

1.Datos del Alumno Carmona Téllez Martín Alonso 56510502 Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias Biología 098107979
2.Datos del Tutor Doctora Silvia Guzmán Beltrán
3.Datos del Sinodal 1 Doctor Sergio Sánchez Esquivel
4.Datos del Sinodal 2 M. en C. Adán Chávez Castillo
5.Datos del Sinodal 3 M. en Ing. Eduardo Rodríguez Bustamante
6.Datos del Sinodal 4 Q.A. Susana González Reyes
7.Datos del Trabajo Escrito Efecto de la sobreexpresión de los genes <i>SCO2127</i> Y <i>glkA</i> en la represión catabólica por glucosa en <i>Streptomyces peucetius</i> var. <i>caesius</i> . 49 páginas 2008.

EFFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DE LOS GENES *SCO2127* Y *glkA* EN LA REPRESIÓN CATABOLICA POR GLUCOSA EN *Streptomyces peucetius* var. *caesius*.

RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Sergio Sánchez Esquivel y la Dra. Silvia Guzmán Beltrán 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 jurado por la revisión y comentarios a este trabajo, el cual estuvo constituido por:

Dr. Sergio Sánchez Esquivel	Instituto de Investigaciones Biomédicas
Dra. Silvia Guzmán Beltrán	Facultad de Química
M. en C. Adán Chávez Castillo	Instituto de Investigaciones Biomédicas
M. en Ing. Eduardo Rodríguez Bustamante	Facultad de Ciencias
Q. A. Susana Gonzáles Reyes	Instituto de Investigaciones Biomédicas

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Sergio Sánchez y Dra. Silvia Guzmán por su paciencia y apoyo incondicional durante mi estancia en el laboratorio de Microbiología Industrial; años que ahora parecen ser solo un instante y que sin embargo me ayudaron a consolidar una visión integral de la investigación científica.

A todos mis compañeros del laboratorio de Microbiología Industrial, Silvia, Lalo, Adán, Bety, Laura, Ruth, Nadine a quienes puedo considerar amigos y con quienes tuve el placer de compartir buenos momentos, y claro a quienes no tuve el gusto de conocer del todo pero que siempre tuvieron una sonrisa y/o consejo para con mi persona: Yoahly, Mauricio, Blanca, Susana, Romina, espero perdonen mi escasa memoria y si olvido a alguien por favor espero no se sientan mal porque son importantes para mí.

A mis mejores amigos, Alejandro Monroy, Eva, Sinue y Aliet por su compañía en los momentos importantes de mi vida, aquellos sinsabores que le dan sentido a la vida y por hacerme sonreír aún en los momentos mas grises.

A Aliet, la mujer quién ha puesto a prueba todo lo que yo concebía como mi universo, y que por cierto me ha dedicado su tiempo y su cariño en un giro extraño de la vida. Por lo anterior, como una mujer de ciencia, espero disfrutes el leer mi trabajo y que lo sientas como tuyo y bien entenderás porque. Gracias por ser como eres y por darme tanto sin pedir nada a cambio.

A mis locos hermanos, Ulises e Isaac, quienes me han entregado todo cuanto han podido sin condiciones; su cariño, su amistad, son consejos, su compañía y todos aquellos momentos que hemos compartido juntos y que extrañamente han moldeado de maneras muy sutiles mi percepción de la vida.

A mis padres Lucia y Martín, a quienes debo mucho, no solo la vida, sino toda la felicidad y buenos momentos que me han entregado como un estilo de vida. Doy gracias a ti madre, por ser la persona que más me ha impulsado a ser lo que soy, por tu honestidad, tu amor, tu comprensión, tus consejos y por todo aquello que en realidad no puedo escribir en este momento porque necesitaría toda una vida para escribir todo lo que me gustaría. Por ello te dedico este trabajo que bien sabes cuanto trabajo implicó para mí.

	Página
Índice	
1 Resumen	3
2 Abreviaturas	4
3 Antecedentes	5
3.1 Características generales de <i>Streptomyces</i>	5
3.1.1 Ciclo de vida	5
3.1.2. Genética y Evolución	6
3.1.3 Condiciones de crecimiento	8
3.1.4 Importancia económica.	9
3.2 <i>Streptomyces peucetius</i> var. <i>caesius</i> .	10
3.3 Represión catabólica por carbono.	10
3.4. Sistema de fosfotransferasa dependiente de fosfoenol piruvato	11
3.4.1 Mecanismo de represión catabólica en <i>Escherichia coli</i>	11
3.4.2 Mecanismo de represión catabólica en bacterias Gram-positivas de bajo contenido en G+C	13
3.4.3 Represión catabólica en bacterias Gram-positivas con alto contenido en G+C	15
3.5 Glucosa cinasa y su participación en el fenómeno de RCC	16
3.6 Sistemas de incorporación de carbohidratos en <i>Streptomyces</i>	19
4 Justificación	21
5 Hipótesis	22
6 Objetivo general	22
6.1 Objetivos particulares.	22
7 Material y métodos.	23
7.1 Cepas bacterianas y plásmidos.	23
7.2. Purificación del plásmido pSG290 y pIJ486	24
7.2.1 Extracción del plásmido pSG290	24
7.2.2 Extracción del plásmido pIJ486	25
7.3 Subclonación de los genes <i>glkA</i> y <i>SCO2127</i>	25
7.3.1 Amplificación de los genes <i>glkA</i> y <i>SCO2127</i> de <i>S. coelicolor</i> por reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR)	25

7.4. Obtención de recombinantes	27
7.4.1. Obtención de protoplastos	27
7.4.2 Transformación y regeneración de protoplastos	28
7.5 Actividad de glucosa cinasa	28
7.5.1 Obtención de polvos de acetona	28
7.5.2 Obtención de extracto libre de células	29
7.5.3 Cuantificación de la actividad enzimática	29
7.6 Cuantificación de proteína por el método de Lowry	29
7.7 Transporte de Glucosa	30
7.7.1 Cuantificación de peso seco	30
7.8 Sensibilidad a represión catabólica por glucosa	31
7.8.1 Cuantificación de antraciclinas	31
7.9 Reproducibilidad de los resultados	31
8 Resultados.	31
8.1 Análisis del vector pSG290	31
8.2 Amplificación y clonación de los genes <i>SCO2127</i> y <i>glkA</i> juntos y por separados de <i>S. coelicolor</i>	32
8.3. Transformación de <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i> insensibles a RCC	33
8.4. Análisis y caracterización de las recombinantes de <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i> .	34
8.4.1. Actividad de glucosa cinasa.	34
8.4.2. Incorporación de glucosa.	35
8.4.3 Sensibilidad a Represión por Glucosa	36
9 Discusión	38
10 Conclusión	43
11 Perspectivas.	44
12 Referencias.	45

1. RESUMEN

Cepas mutantes de *Streptomyces coelicolor* resistentes al análogo de glucosa, 2-desoxiglucosa (Dog^R) presentan el fenotipo Glu⁻ (sin capacidad de utilizar glucosa), Glk⁻ (glucosa cinasa inactiva) y son insensibles a represión catabólica. Dichas mutantes, al ser complementadas con un fragmento que posee 2 genes (*glkA* y *SCO2127*) recuperan el fenotipo silvestre (Glu⁺, Glk⁺), por ello se ha sugerido la participación de los productos génicos de *glkA* y *SCO2127* en el proceso de represión catabólica por glucosa (RC) entendiéndose a esta como un mecanismo mediante el cual se evita la expresión de genes necesarios para la utilización de fuentes alternas de carbono en presencia de un sustrato preferido (Stulke & Hillen, 1999). Por otro lado, *Streptomyces peucetius* var. *caesius* es una cepa productora de doxorrubicina (antibiótico de la familia de las antraciclinas) en la cual se evaluó el efecto de la sobre-expresión de *glkA* y *SCO2127* juntos y por separado en la cepa original de *S. peucetius* var. *caesius*, así como en una mutante Dog^R de esta cepa, que presenta deficiencias en la Glk, en el transporte de glucosa y presentan hipersensibilidad a RCC. Para ello, los genes *glkA* y *SCO2127* se amplificaron por PCR y se clonaron en el vector pIJ486, las cepas antes mencionadas (original y mutante Dog^R) se transformaron con dichas construcciones y posteriormente se evaluó la actividad de glucosa cinasa, el transporte de glucosa y la RCC sobre la producción de antraciclinas. Se observó que al complementar las cepas con los genes *glkA* o *glkA+SCO2127* aumentan la actividad de Glk considerablemente así como la incorporación de glucosa y la hipersensibilidad al efecto de la glucosa. Los resultados sugieren que la región *SCO2127* posee un efecto pleiotrópico sobre la síntesis de Glk, actuando mayormente sobre *glk*, probablemente favoreciendo la formación de intermediarios de la glucólisis que pudieran actuar como señales para iniciar el fenómeno de represión catabólica por carbono.

2. ABREVIATURAS

ABC	ATP Binding Casette
ADP	Adenosin Di-Fosfato
AMPc	Adenosin Mono Fosfato cíclico
ATP	Adenosin Tri-Fosfato
CAP	Proteína activadora catabólica
CcpA	Proteína de control catabólico
Cra	Proteína represora /activadora
Cya	Adenilato ciclasa
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	o-nitrofenil- α -galactopiranosido
oriC	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
TIR	Secuencias invertidas repetidas
TPs	Proteínas de unión a las secuencias invertidas repetidas

3. ANTECEDENTES

Streptomyces es un género ampliamente distribuido en muchos tipos de ambientes y puede encontrarse en el mar (*Streptomyces maritimus*), tierra (*Streptomyces coelicolor* y *Streptomyces peucetius*) y también es capaz de establecer asociaciones parásitas (*Streptomyces. scabies*). Este grupo bacteriano es esencial en el ecosistema, ya que participa en el reciclaje del carbono degradando la materia orgánica derivada de plantas y animales. Este género posee gran habilidad para sintetizar enzimas extracelulares, las cuales actúan sobre polímeros insolubles como el almidón, xilano, celulosa, quitina, etc., y a partir de ellos generar productos solubles que son incorporados y utilizados para el crecimiento (Hodgson, 2000).

3.1 Características generales de *Streptomyces*.

El género *Streptomyces*, es uno de los constituyentes del Orden Actinomycetales (Bergey's, 1985), conformado por bacterias Gram-positivas con alto contenido de G+C (69-78%). Este género es de gran importancia científica debido a su excepcional ciclo de vida. Por otro lado tienen un potencial biotecnológico ya que producen una gran gama de compuestos de interés en la industria y en la medicina (como antibióticos, herbicidas, fungicidas, etc.).

3.1.1 Ciclo de vida.

Streptomyces lleva a cabo un proceso de diferenciación morfológica en su ciclo de vida (Figura 1). En medio sólido, la spora en germinación forma micelio basal multicelular, el cual, se desarrolla a partir de los nutrientes que le proporciona el medio de cultivo. Conforme la colonia madura, las hifas aéreas emergen del micelio y se extiende ascendentemente; subsecuentemente, éstas forman cadenas de esporas unicelulares divididas por septos. Un alto número de hifas aéreas y la región del sustrato miceliar atraviesan un proceso de auto-lisis y eventos de muerte celular programada, probablemente en apoyo a la formación de micelio aéreo y esporas, los cuales no tienen acceso directo a los nutrientes en el medio sólido (Chen et. al., 2002)

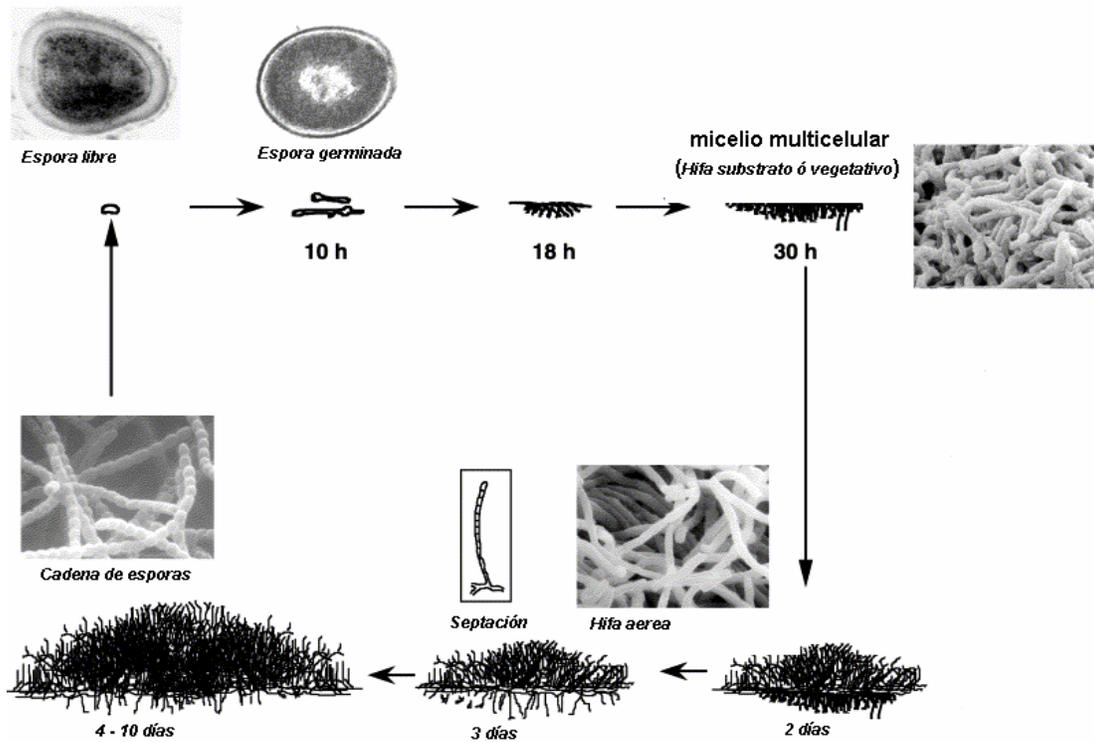


Figura 1. Ciclo de vida en el género *Streptomyces* (Tomado de Ohnishi *et al.*, 2002).

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

3.1.2. Genética y Evolución

Con la secuenciación del genoma de algunas especies de *Streptomyces*, se ha obtenido un mayor conocimiento en torno a este grupo. Al parecer el tamaño tan grande de su genoma refleja el ciclo de vida tan complejo, así como su gran repertorio de producción de metabolitos secundarios.

Hasta ahora se puede acceder a la secuencia del genoma completo de tres especies de *Streptomyces*: *Streptomyces coelicolor* (Bentley *et al.*, 2002), *Streptomyces avermitilis* (Ikeda *et al.*, 2003) y *Streptomyces scabies* (Sanger Institute, 2005).

Estas bacterias presentan un genoma de tipo lineal, a diferencia de otras bacterias. Este es un fenómeno recurrente en este género, el cual se describió por primera vez en *S. lividans* 66 (Lin *et al.*, 1993). Recientemente se determinó la secuencia del genoma de *Streptomyces peucetius* ATCC27952, aunque la información aún no ha sido publicada, sin embargo se sabe que es de 8.7 Mb (Parajuli *et al.*, 2004).

El tamaño de los cromosomas de los estreptomicetos es de aproximadamente 9.0 Mb, siendo de los genomas más grandes secuenciados en bacterias, contrastando con otros géneros como: *Borrelia* (bacteria Gram- del orden de las Spirochaetales), con un genoma de 950 kb aproximadamente (Chen *et al.*, 2002).

En el análisis *in silico* del genoma de *Streptomyces* se ha demostrado una alta densidad genética. Se predicen aproximadamente 7500, que corresponde al doble de genes presentes en otras bacterias por ejemplo; 4289 para *Escherichia coli* y 6232 en eucariontes como *Saccharomyces cerevisiae* (Bentley *et al.*, 2001).

En el cromosoma de *Streptomyces*, se localiza una región central enmarcada por dos brazos, los cuales están sujetos a intensa variabilidad e inestabilidad genética. Aunque es un fenómeno bien documentado, se ha reportado que los rearrreglos en el cromosoma se deben a la linealidad y son modulados durante el desarrollo (Dary *et al.*, 1999). Las fracciones terminales de este cromosoma, están conformados por secuencias invertidas repetidas (TIR) o regiones teloméricas, son variables en secuencia y tamaño. Además dichos segmentos están protegidos por proteínas terminales (TP's), las cuales se encuentran unidas covalentemente a las regiones TIR (Yang *et al.*, 2002).

Si bien es cierto que los cromosomas bacterianos circulares se han linearizado esporádicamente durante la evolución, un aspecto intrigante es que estos cromosomas de tipo lineal se han distribuido en distintos linajes separados, incluidas las espiroquetas y el género *Streptomyces* (Volf & Altenbuchner, 2000). En la figura 2 se muestra la distribución de los cromosomas lineales y circulares entre los procariontes.

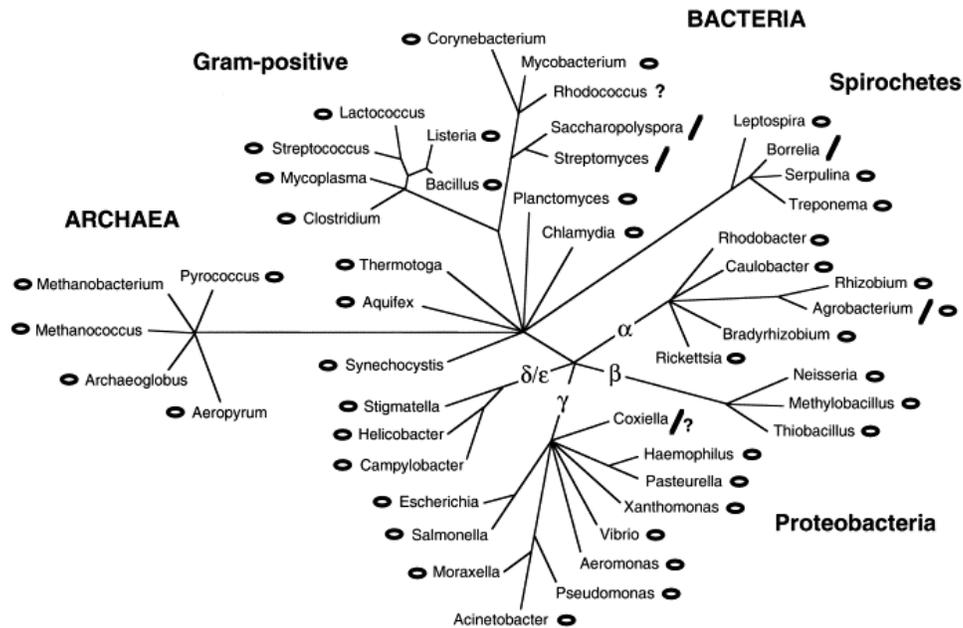


Figura 2. Distribución de los cromosomas lineales y circulares entre los procariontes. Símbolos: círculos, cromosomas circulares; barras, cromosomas lineales. Interrogación, que solo ha sido demostrado por electroforesis por campos de pulsos y que puede ser lineal y/o circular. Las longitudes de las ramas no demuestran el grado de relaciones entre los géneros. De acuerdo al principio general de la evolución, partiendo de cosas simples a mas complejas, los cromosomas lineales debieron ser posteriores a los circulares (Volf & Altenbuchner, 2000)

Por otro lado se ha propuesto que los cromosomas lineales en *Streptomyces* son resultado de recombinación entre plásmidos lineales y cromosomas circulares ancestrales (Volf & Altenbuchner, 2000). Se ha demostrado que genomas lineales de *Streptomyces* reversion a la circularidad con facilidad y que la maquinaria genética necesaria para la replicación y la herencia es más estable cuando el cromosoma es circular (Chen, 2002).

3.1.3. 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 CO₂ en el ambiente (≈10%). Las esporas resisten bajas concentraciones de agua y son tolerantes a ambientes salinos (Murray *et al.*, 1985).

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

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

3.1.4 Importancia económica.

La producción de compuestos bioactivos no solo se reduce a las bacterias, sino que es un fenómeno presente en algunos eucariontes como plantas y hongos. Dentro del número de compuestos producidos por bacterias y hongos, los actinomicetos son responsables de la producción de dos tercios del total. Dentro del grupo antes mencionado, el género *Streptomyces* produce del 70 al 80% de metabolitos secundarios (Tabla 1), además de la producción de diversas enzimas extracelulares como: celulasas, xilanasas, quitinasas, pectinasas, amilasas, etcétera; con pequeñas contribuciones de géneros como *Saccharopolyspora*, *Amycolaptosis*, *Micromonospora* y *Actinoplanes* (Challis & Hopwood, 2003).

Tabla 1. Metabolitos secundarios producidos por el género <i>Streptomyces</i> de interés económico.		
Especie	Metabolitos secundarios	Aplicaciones
<i>S. lavendulae</i>	MitomicinaC	Anti-HIV
<i>S. antibioticus</i>	Oleandomicina Simociclinona	Antibacterial Antifungal
<i>S. avermitilis</i>	Filipina	Antifungal
<i>S. hygroscopicus</i>	Rapamicina	Antibacterial
<i>S. carzinostaticus</i>	Neocarcinostatina	Antitumor
<i>S. griseolus</i>	7-etoxycoumarina	Antimicrobial
<i>S. nanchangensis</i>	Nanchangicina	Anticoccidial
<i>S. natalensis</i>	Pimaricina	Antifungal
<i>S. nodosus</i>	Amfotericina	Antifungal
<i>S. noursei</i>	Nistatina	Antifungal
<i>S. tendae</i>	Nikkomicina	Insecticida
<i>S. peuceitius</i>	Doxorrubicina	Antitumor
<i>S. sp. Cepa C5</i>	Daunorrubicina	Antitumor
<i>S. ansochromogenes</i>	Nikomicina	Insecticida
<i>S. clavuligerus</i>	Ac. Clavulinico	Antibacterial
<i>S. caelestis</i>	Nidamicina	Antibacterial
<i>S. cinnamonensis</i>	Monensina	Anticoccidial
<i>S. globisporus</i>	Antibiotico C-1027	Antitumor
<i>S. narbonensis</i>	Narbomicina	Antifungal
<i>S. spheroides</i>	Novobiocina	Antibacterial
<i>S. thermotolerans</i>	Carbomicina	Antibacterial

Tabla tomada de Challis & Hopwood, 2003.

3.2 *Streptomyces peucetius* var. *caesius*

S. peucetius es una cepa que fue aislada en Peucetia, Italia en 1957 y posteriormente descrita por Grein en 1963. Por otro lado *S. peucetius* var. *caesius* es una cepa obtenida por un tratamiento mutagénico con N- nitroso-N-metil uretano (Arcamone *et al.*, 1969). Esta última se caracteriza por la formación de micelio aéreo abundante de un tono azul verdoso a gris verde y un micelio vegetativo (o sustrato) rojo oscuro con respecto al original que es más claro. Una de las novedades importantes en torno a esta variedad de *S. peucetius*, es la producción de doxorubicina (DXR), un antibiótico del grupo de las antraciclinas, cuya fórmula química es $C_{27}H_{29}NO_{11} \cdot HCl$ y su peso molecular corresponde a 579.99 g/mol. Este compuesto es usado para el tratamiento de diversos tipos de cáncer como el de mama, ovario, estómago y linfomas (Vandamme, 1984; Hershberger *et al.*, 1989).

En *S. peucetius* var. *caesius*, la producción de DXR se realiza en medios de cultivo con diversas fuentes de carbono como; glucosa, manosa, celobiosa, lactosa, fructosa, maltosa y almidón; siendo la glucosa 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 regulada 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 carbono (RCC) (Demain, 1989; Hodgson, 1982; Segura *et al.*, 1996).

3.3 Represión catabólica por carbono.

La Represión catabólica por carbono (RCC) es un sistema de regulación negativa que actúa a nivel global, ejercido por la presencia de diversos carbohidratos más fácilmente metabolizados. Este mecanismo involucra el control a nivel transcripcional y actividad proteica (Titgemeyer y Brückner, 2002). Gracias a la RCC, la célula coordina el metabolismo y la obtención de energía, lo cual le permite discriminar y elegir los sustratos que le permitan obtener un mayor perfil de crecimiento cuando más de una fuente de carbono se encuentra presente en el medio de cultivo de manera simultánea (Stülke & Hillen, 1999).

A pesar de que el mecanismo de RCC fue descubierto hace más de un siglo, hasta la fecha son pocos los procesos que han sido descritos 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). (Guzmán, 2005).

3.4. Sistema de fosfotransferasa dependiente de fosfoenol piruvato.

Este es un mecanismo de transporte de azúcares fácilmente asimilables y regulador negativo de otros sistemas de incorporación de carbohidratos alternativos. Este sistema es un complejo multienzimático, el cual, está constituido por dos fosfotransferasas: principalmente la enzima I (EI) y Hpr (del inglés Histidin protein como transportadora de fosfato) y un grupo de proteínas transportadoras membranales específicas para cada carbohidrato, llamadas Enzimas II (EIIA, EIIB y EIIC). La ruta de transferencia de fosfato inicia en el fosfoenol piruvato vía EI, Hpr, EIIABC hasta el azúcar (ver figura 3).

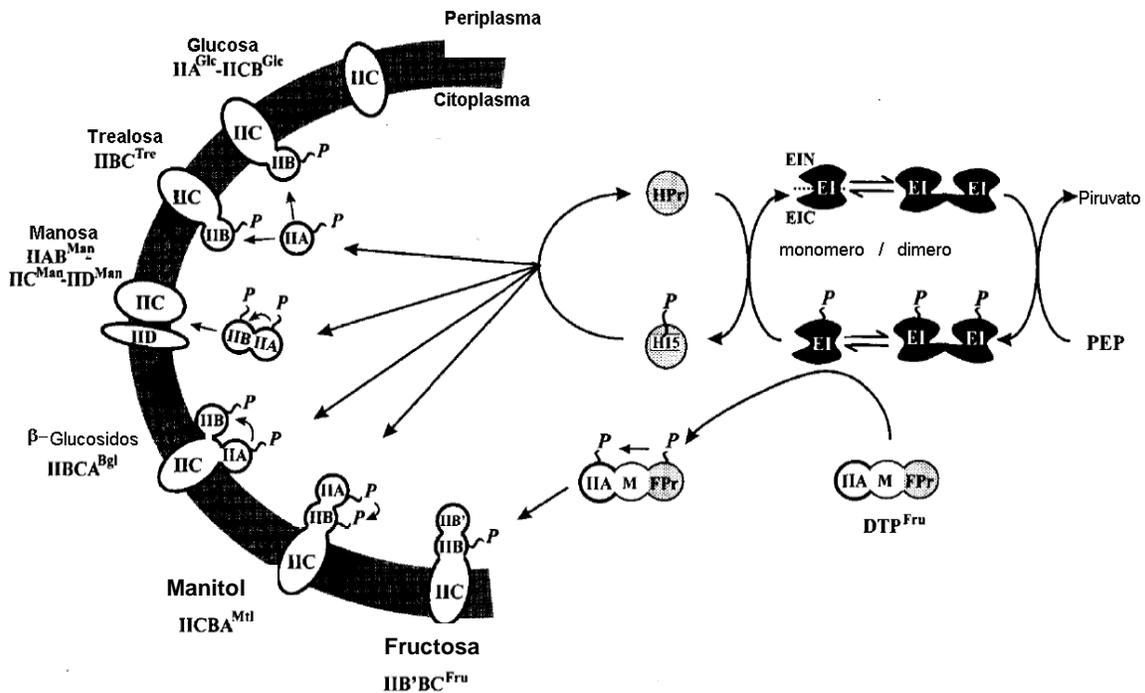


Figura 3. Sistema PTS de *Escherichia coli*. La Enzima EI y Hpr son componentes generales del sistema. Los componentes del complejo EII; IIA, IIB y IIC, son proteínas azúcar-específicas constituyentes de permeasas individuales. (Postma *et al*, 1985).

3.4.1 Mecanismo de represión catabólica en *Escherichia coli*.

La enzima del PTS denominada EIIA juega un papel esencial en el fenómeno de regulación por fuente de carbono, ya que transduce señales vía fosforilación a una serie de blancos celulares. Como parte del sistema de transporte de azúcares vía PTS, el grupo fosfato es transferido del PEP hasta el azúcar. En el momento en que otras fuentes de carbono son importadas, la proteína EIIA^{Glu} permanece en su forma no fosforilada. Recientemente se ha demostrado que durante la RCC ejercida por otras fuentes de carbono represoras, las cuales no son transportadas vía PTS, también se modula el estado de fosforilación de EIIA^{Glu}. Por ello se ha sugerido que los niveles de EIIA^{Glu} / EIIA^{Glu}-P reflejan el estado fisiológico celular permitiendo así la transducción de señales de control global (Titgemeyer & Hillen, 2002).

Como parte del control transcripcional a nivel global la enzima EIIA^{Glu} permanece en su forma fosforilada en ausencia de glucosa y puede estimular a la adenilato ciclasa (Cya) produciendo AMPc, el cual se une a la proteína activadora catabólica (CAP) donde estos dos últimos elementos interactúan para formar el complejo (CAP-AMPc) y en esta conformación se activan genes sensibles a regulación. Es de notar que CAP se encuentra como parte de la regulación de algunos otros procesos como la activación de factores sigma y por otro lado la biosíntesis del flagelo. Hasta este momento se conoce que CAP controla más de 100 genes en *E. coli* (Titgemeyer & Hillen, 2002).

Por otra parte la enzima EIIA^{Glu} en presencia de glucosa permanece en su forma no fosforilada. De esta manera mediante un mecanismo de exclusión del inductor, evita la actividad de permeasas específicas, responsables de la incorporación de carbohidratos como: lactosa, maltosa, melobiosa así como rafinosa, lo que a su vez impide la incorporación de los inductores y la inducción de genes necesarios para su utilización. EIIA^{Glu} no fosforilada también inhibe alostéricamente varias proteínas citoplásmicas como la glicerol cinasa, previniendo la formación del inductor (glicerol-3-fosfato) (Titgemeyer & Hillen, 2002).

Se sabe que otros elementos están involucrados en la regulación negativa por carbono como: BglG (proteína antiterminadora del operón de β -glucósidos), HPr y EI. Por ejemplo BglG se

ha caracterizado como una proteína antiterminadora, la cual regula la expresión de genes involucrados en la utilización de β -glucósidos. Ésta contiene dominios de regulación por el sistema PTS llamados PRD, los cuales pueden ser fosforilados por HPr o la enzima EII específica (Gorke & Rak, 1999). BglG es inactiva en presencia de β -glucósidos o en presencia de sustratos PTS preferenciales.

Por otro lado la enzima Hpr regula a la glucógeno fosforilasa, coordinando el consumo o almacenamiento de glucosa (Seok *et al.*, 2001). La enzima EI-PTS en su estado no fosforilado evita la activación de CheA (proteínas de quimiotaxis) al prevenir su fosforilación. De esta forma controla negativamente la respuesta quimiotáctica para el movimiento del flagelo (Lux *et al.*, 1995) (ver figura 4).

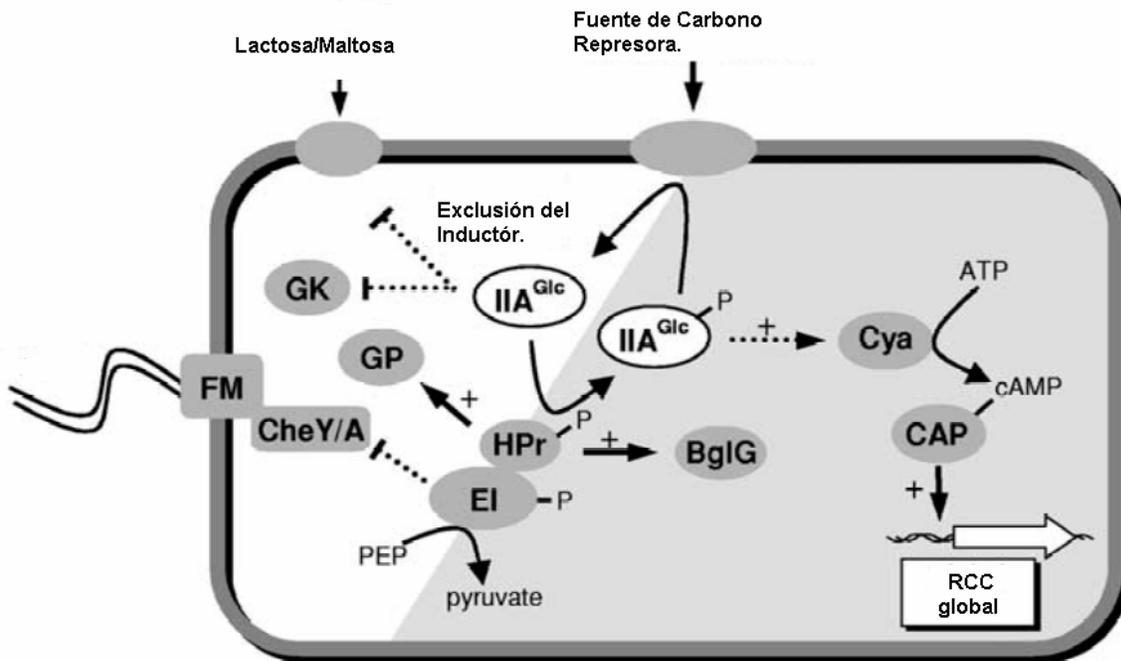


Figura 4. Represión catabólica por carbono en bacteria Gram-negativas. El modelo muestra una célula bacteriana bajo dos condiciones: En presencia de una fuente de carbono represora (fondo blanco). En ausencia de una fuente de carbono (fondo gris). Regulación por activación (+) y represión (T), mientras que eventos de fosforilación se ilustran en líneas gruesas y otras interacciones con flechas seccionadas. Abreviaciones: BglG, proteína antiterminadora del operón de β -glucósidos; CAP, proteína activadora del catabolismo; CCW, en contra de las manecillas del reloj; CheY/A, proteínas de quimiotaxis; Cya, adenilato ciclasa; EI, enzima I fosfotransfera del sistema PTS; FM, movimiento flagelar; GK, glicerol cinasa; GP, glucógeno fosforilasa; HPr, proteína que contiene una histidina como transportadora de fosfato. (Guzmán, 2005).

3.4.2. Mecanismo de represión catabólica en bacterias Gram-positivas de bajo contenido en G+C.

Este grupo exhibe un mecanismo diferente para la regulación por fuente de carbono. En este caso las proteínas que censan el estado fisiológico de la célula y controlan el consumo de carbono son: la proteína HPr, la HPr cinasa/fosfatasa (HPrK/P) y la enzima de control catabólico (CcpA). 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 a través del sistema PTS, el cual, produce HPr-his-P. Esta enzima participa en el transporte de diversas fuentes de carbono preferenciales. 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).

Por un lado la HPr-his-P juega un papel importante en la regulación transcripcional por carbono y en la exclusión del inductor, ya que regula positivamente la actividad de la enzima glicerol cinasa, estimulando la utilización de glicerol. Además 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 al operón ptsGHI (EII, HPr, EI) y SacT, el regulador del PTS para sacarosa (Stülke & Hillen, 2000).

Por otro lado, cuando los azúcares dependientes de PTS son metabolizados, los niveles, de intermediarios glucolíticos como fructosa-1-6-bi fosfato (FBP) aumentan. Este a su vez estimula a la enzima HPrK/P generando mayores niveles de HPr-ser-P y 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 defosforila a HPr-P, aumentando los niveles de HPr, lo cual permite el incremento del transporte de los azúcares PTS dependientes (Brückner & Titgemeyer, 2002).

Otra enzima que tiene un papel esencial en el control transcripcional global es la proteína de control catabólico (CcpA). La cual, se sabe que dicha enzima en *B. subtilis* regula

aproximadamente 300 genes. Esta enzima tiene función como activador/represor. La activación de CcpA requiere de la interacción con el correpresor HPr-ser-P, este complejo es el que tiene como blanco molecular el operador Cre (del inglés Catabolite responsive element) de genes sensibles a regulación por carbono. Además se han detectado otras proteínas homólogas como CcpB y CcpC que también participan en la RCC en *B. subtilis* (Bruckner & Titgemeyer, 2002). (Fig 5).

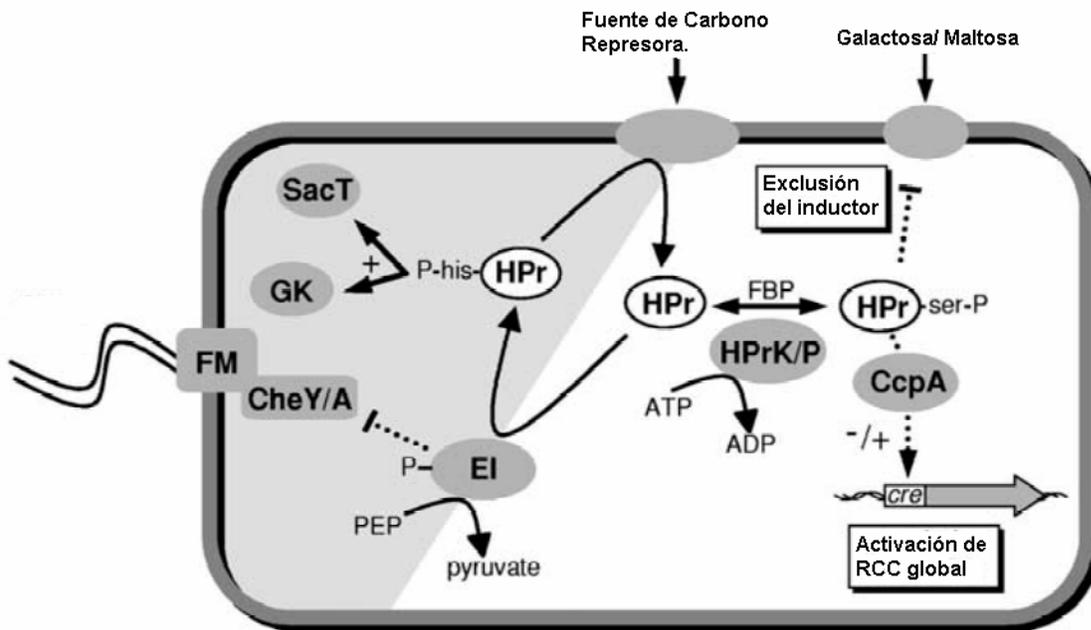


Figura 5. Represión catabólica por carbono en bacterias Gram-positivas de bajo contenido en G+C. El modelo muestra una célula bacteriana bajo dos condiciones: (1) en presencia de una fuente de carbono represora (fondo blanco), (2) en ausencia de una fuente de carbono (fondo gris). Regulación por activación (+) y represión (-), mientras que eventos de fosforilación se ilustran en líneas gruesas y otras interacciones con flechas seccionadas. El estado fosforilado de HPr se subraya, bajo condiciones represoras, HPr se encuentra fosforilada en un sitio específico (ser46) mediando la exclusión del inductor y regulando a CcpA. En condiciones no represoras HPr se mantiene fosforilada en un segundo sitio específico de regulación. Abreviaciones: BglG, proteína antiterminadora del operón de β -glucósidos; CAP, proteína activadora del catabolismo; CCW, contra las manecillas del reloj; CheY/A, proteínas de quimiotaxis; Cya, adenilato ciclasa; EI, enzima I fosfotransfera del sistema PTS; FM, movimiento flagelar; GK, glicerol cinasa; GP, glucogeno fosforilasa; HPr, proteína que contiene una histidina como transportadora de fosfato, SacT, Proteína transportadora de sacarosa. (Guzmán, 2005).

3.4.3 Represión catabólica en bacterias Gram-positivas con alto contenido en G+C.

Comparativamente con los otros grupos bacterianos antes mencionados se sabe poco acerca del mecanismo molecular en *Streptomyces* y bacterias Gram-positivas con alto contenido en G+C. Se han encontrado elementos del sistema PTS (por ej. fructosa), sin embargo, EI, EII y Hpr no tienen algún papel regulatorio a nivel de RC por glucosa en *S. coelicolor* (Sabater et al., 1972; Novotná y Hostálek, 1985; Titgemeyer et al., 1995; Wang et al., 2002).

Por otro lado, algunos trabajos realizados en mutantes de *S. coelicolor*, resistentes a 2-desoxiglucosa (no metabolizable) reportaron mutaciones en el gen de *glkA* (Glucosa Cinasa), las cuales generaban insensibilidad a RCC sobre un gran número de genes catabólicos (como agarasa, glicerol cinasa, α -amilasa y quitinasa) en presencia de varias fuentes de carbono represoras. Por ello proponen que este efecto no solo se debe a la pérdida en la utilización de glucosa y que esta enzima pudiera tener un papel a nivel regulatorio en la RCC (Hodgson, 1982). (Fig. 6).

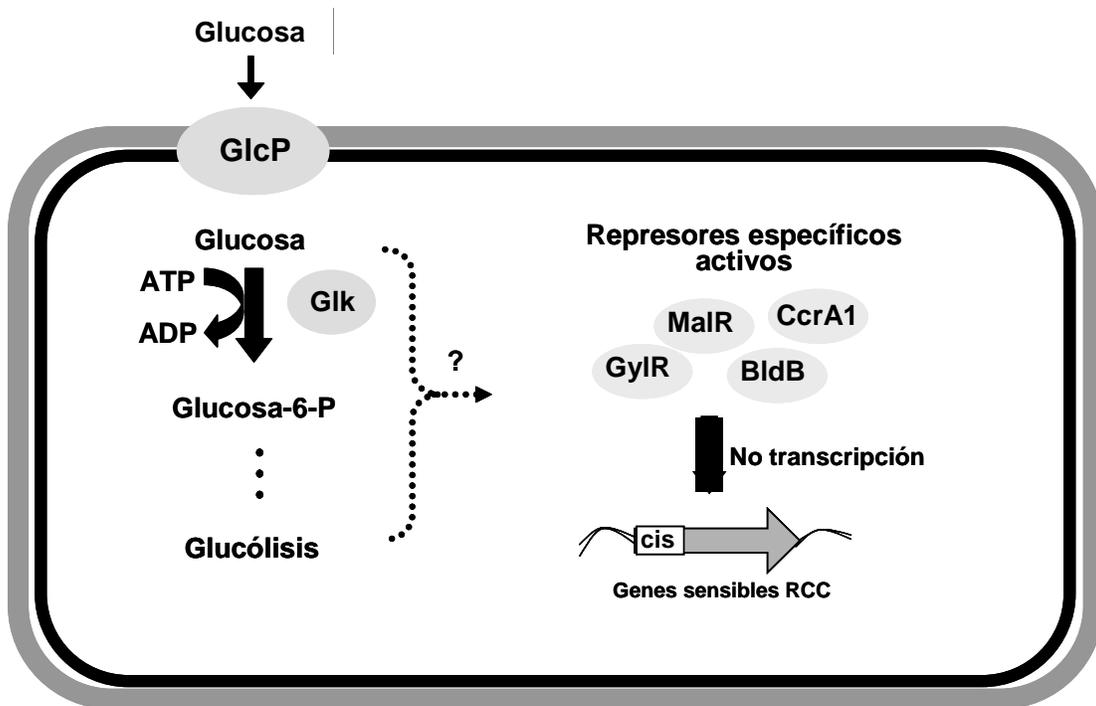


Figura 6. Represión catabólica en bacterias Gram-positivas con alto contenido en G+C. Se ha sugerido que en presencia de glucosa, la Glk (Glucosa Cinasa) junto con represores específicos pudieran interactuar, afectando negativamente la expresión de genes sensibles a regulación por glucosa. En donde MalR, CcrA1, GylR y Blvd. Son represores de operones catabólicos sensibles a RCC (Guzmán, 2005).

3.5 Glucosa cinasa y su participación en el fenómeno de RCC.

La glucosa cinasa (Glk) cataliza el primer paso de la glucólisis, reacción la cual depende de ATP y Mg_2^+ . En trabajos recientes, se llevó a cabo la caracterización bioquímica de la Glk en dos especies del género *Streptomyces*: *S. coelicolor* y *S. peucetius* var. *caesius*. Esta enzima pertenece a la familia de las hexocinasas. Se conoce que solo algunas bacterias y organismos eucariontes unicelulares poseen una glucosa cinasa verdadera. La Glk de *S. peucetius* var. *caesius* es altamente específica para glucosa pero puede fosforilar galactosa y arabinosa (Imriskova et al., 2001).

En *S. coelicolor* y *S. peucetius* var. *caesius*, se demostró que la Glk es citosólica, se induce por glucosa, es homotetramérica, con un peso molecular aproximado de los monómeros de 31 y 32 kDa respectivamente. De acuerdo a evidencia experimental, la Glk de *S. coelicolor* puede ser más estable que la de *S. peucetius* var. *caesius*, ya que después de algunas horas de almacenamiento a 4° C, ésta última se disocia en un 85% a su forma dimérica, aunque la presencia de 100 mM de glucosa evita su dimerización. En recientes trabajos se ha reportado la secuencia del gen de *S. peucetius* var. *caesius*, mostrando un 87% de identidad con su homólogo en *S. coelicolor* (Langley et al., 2004).

En *S. coelicolor* se aislaron mutantes Dog^R, las cuales fueron seleccionadas por su capacidad de crecer en 2-desoxiglucosa (DOG), un análogo de la glucosa no metabolizable, pero capaz de ejercer RCC. Estas mutantes mostraban pérdida parcial o total de la actividad de glucosa cinasa (Glk⁻) e insensibilidad a RC por glucosa. Además son incapaces de utilizar glucosa (Glu⁻) aún cuando aparentemente el transporte de glucosa no está afectado (Hodgson, 1982).

En estudios posteriores también se obtuvieron mutantes Dog^R de *S. peucetius* var. *caesius* (Segura et al., 1996). Estas mutantes Dog^R presentaban un fenotipo similar a las

obtenidas por Hodgson, con la diferencia de que las mutantes de *S. peucetius* var. *caesius* son capaces crecer en glucosa como única fuente de carbono, a pesar de tener el sistema de transporte dañado. (Escalante et al., 1999). A partir de las cepas Dog^R se obtuvo una serie de mutantes en las cuales se reestableció la sensibilidad a 2-DOG, mismas que presentaban diferentes capacidad en cuanto a los siguientes parámetros: actividad de Glk, transporte de glucosa y a RCC (Ramos et al., 2004) (Tabla 2). A partir de esta información se logró determinar que Glk no es la única responsable de ejercer RCC y que no existe una relación directa entre la actividad de Glk y la sensibilidad a DOG y RCC a diferencia de lo observado en *S. coelicolor* (Ramos et al., 2004).

Tabla 2. Características de mutantes Dog de <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i>				
Cepa	Sensibilidad A ^c DOG.	Transporte de glucosa %	Actividad de ^a Glk %	Sensibilidad a ^b 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

Tabla 2. Resultados tomados de Ramos et al. (2004). ^aGlk: 100% (170 U/mg proteína), incorporación de glucosa 100% (2.21 μmol/mg de peso seco de micelio). ^bLa sensibilidad a represión por carbono se determinó por la formación de pigmento rojo (antraciclinas) formado en presencia de D-glucosa 500 mM. ^cLas 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⁻, Glk⁻) complementaron su deficiencia con un fragmento de 2.9 kb que contiene el gen que codifica para la Glk, es decir, recuperaron la capacidad para utilizar glucosa, su actividad de Glk y la sensibilidad a RCC (Ikeda et al., 1984).

En análisis posteriores se detectó que el fragmento de 2.9 kb, el cual complementaba el fenotipo silvestre, contenía tres marcos de lectura abiertos (ORF's), SCO2126, SCO2127 y SCO2128 (este último se encuentra truncado como parte del fragmento); los cuales corresponden a proteínas de un peso molecular de 33.1 kDa, 20.1 kDa y 44.7 kDa, respectivamente, de las cuales, se sabe que el producto génico de SCO2126 es la Glk. Sin embargo a los otros dos marcos de lectura no se les han asignado alguna función.

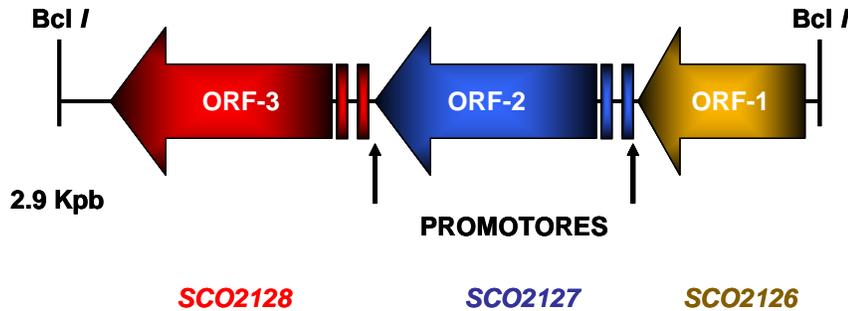


Figura 7. Fragmento Bcl I del genoma de *S. coelicolor*. Contiene tres marcos de lectura: SCO2128 (truncado), SCO2127 y SCO2126 (*glkA*) (Angell et al., 1992).

Como se muestra en la figura 7, los genes SCO2127 y *glkA* (SCO2126) poseen su propio promotor, están separados por 51 nucleótidos y a cada uno le antecede 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 ambos genes se co-transcriben como un operón. Además el gen *glkA* puede transcribirse desde su propio promotor. Al respecto los autores sugieren que ambos productos génicos pudieran tener interacción o funciones correlacionadas, sujetas a expresión coordinada. Proponen que el gen SCO2127 pudiese codificar para una proteína de transporte o estar involucrado en el metabolismo de la glucosa. Sin embargo no muestran evidencias de esta posibilidad (Angell et al., 1992; 1994).

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

Por otro lado existen evidencias que apoyan el papel regulatorio de la Glk en la RCC. Una de ellas es que al complementar mutantes Dog^R (Glu⁻, Glk⁻) de *S. coelicolor* con un gen análogo a la Glk (*Zimomonas mobilis*) se reestablece la capacidad de utilizar glucosa y la actividad de la enzima, pero no la RCC (Angell et al., 1994). Otro dato que apoya la participación de Glk en dicho mecanismo es que en mutantes de *S. coelicolor* con deleciones en el gen *glkA*, muestran insensibilidad a RCC ejercida por diversas fuentes de carbono represoras como: arabinosa, galactosa, citrato y glutamato sobre la expresión de

la glicerol cinasa y la agarasa. Cabe resaltar que estas fuentes no son metabolizadas vía glucosa cinasa (Kwakman & Postma, 1994). Otro dato que apoya este hecho es que mutantes Dog^R de *S. peucetius* var. *caesius* con deficiencias también en Glk son insensibles a RCC para la producción de antraciclinas y α -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 la Glk con la RCC en *Streptomyces*. Sin embargo, no hay pruebas contundentes de su participación como represora en el mecanismo de regulación. En un análisis comparativo con otras proteínas regulatorias como NagC, XylR de *B. subtilis* y XylR de *Lactobacillus pentosus*, se ha detectado que posee un 52%, 55% y 52% de identidad 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., 1992). Se cree que más que solo permitir el flujo de glucosa o la simple fosforilación del carbohidratos, pudiera estar actuando como una proteína regulatoria en la RCC, ya sea sola y/o formando un complejo con proteínas represoras y este a su vez unirse a genes sensibles a represión por carbono, evitando su transcripción (Mahr, 2000; Postma et al., 1993; Angell et al., 1994).

3.6 Sistemas de incorporación de carbohidratos en *Streptomyces*

Con la publicación del genoma de *S.coelicolor* A3(2) se han revelado características importantes con respecto a la utilización de carbono (Bertram *et al.*, 2004). Por un lado, el número tan elevado de genes (172), los cuales codifican para proteínas extracelulares como: hidrolasas, quitinasas, celulasas, lipasas, nucleasas y proteasas y por otro lado la existencia de 81 permeasas de tipo ABC (casette de unión a ATP), las cuales son empleadas a nivel celular para la incorporación de carbohidratos, oligopéptidos y nucleósidos, así como para el exporte de diversos metabolitos secundarios.

Como bacteria del suelo, los estreptomicetos pueden metabolizar una gran cantidad de fuentes de carbono, su internalización es mediante permeasas específicas. Su actividad y regulación determina el estado nutricional de la célula y así influye en la morfogénesis y en la síntesis de antibióticos (Bertram et al., 2004).

En análisis *in silico*, se ha predicho la existencia de diferentes mecanismos que tienen como finalidad la incorporación de carbohidratos como: el PTS, los sistemas de transporte ABC, el simporte y el transporte facilitado. Tomando en cuenta esta diversidad en cuanto a mecanismos de transporte, se entiende entonces la capacidad tan alta de los estreptomicetos, para utilizar una gran cantidad de polisacáridos presentes en la materia orgánica (Bertram *et al.*, 2004). En la Figura 8 se esquematizan los diferentes sistemas de transporte de carbohidratos antes descritos.

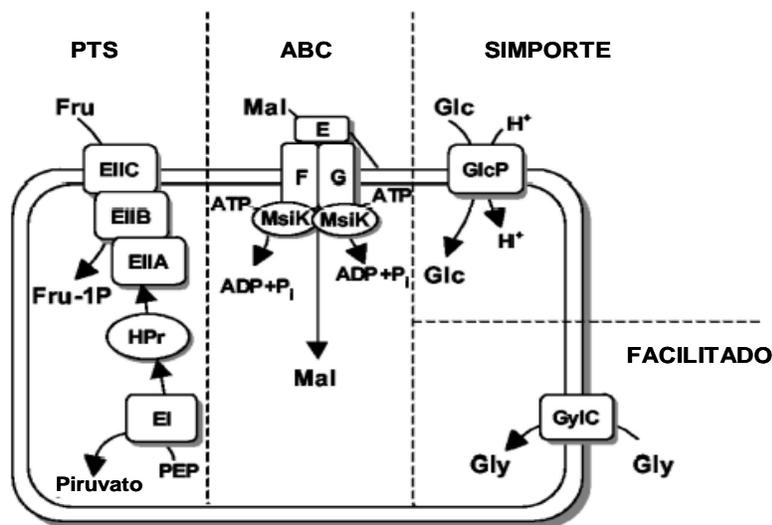


Figura 8. Esquema de los sistemas representativos de incorporación de carbohidratos en *S. coelicolor*. PTS para fructosa (Fru), ABC para maltosa (Mal), simporte para glucosa (Glc) y difusión facilitada para glicerol (Gly) (Bertram *et al.*, 2004)

Se ha establecido que el transporte de glucosa es un sistema inducible. Además se han analizado los genes de incorporación de este carbohidrato (*glcPs*). Estos parecen ser miembros de la familia de facilitadores (FMS), mismos que se localizan en la región núcleo (*glcP1*) y en el brazo derecho del cromosoma (*glcP2*). Cabe mencionar que ambos genes muestran un 99% de identidad entre sí, codifican para un producto idéntico y probablemente *glcP2* se generó a partir de un evento de duplicación (Wezel *et al.*, 2005). Es importante señalar que en estudios recientes se ha comprobado una relación directa entre la expresión de *glkA* y *glcPs* en *S. coelicolor* (Wezel *et al.*, 2007).

4. Justificación.

A pesar de toda la información que se ha generado en torno a RCC en *Streptomyces*, aún no se ha logrado comprender de manera global el mecanismo molecular a través del cual la glucosa ejerce un efecto negativo sobre genes sensibles a represión catabólica, los cuales repercuten en aspectos del desarrollo y metabolismo secundario.

En investigaciones previas sobre RC se ha demostrado que los genes *glkA* y *SCO2127* juegan un papel relevante en este fenómeno, sin embargo la sobreexpresión de *glkA* en *Streptomyces peucetius* var. *caesius* y en una mutante Dog^R, nos permitirá determinar si la Glk posee el mismo efecto regulatorio que se observa en *S. coelicolor* y por otro lado conocer cual es el papel del fragmento *SCO2127-glkA* en la RC por glucosa.

Por tal motivo este trabajo pretende generar evidencia experimental que soporte la participación de los genes *glkA* y *SCO2127* en la RCC, la cual pueda ser de interés para comprender este mecanismo y así contribuir a la generación de un esquema global de regulación por carbono en el género *Streptomyces*.

5. HIPÓTESIS

La complementación de mutantes insensibles a RCC de *S. peucetius* var. *caesius*, sólo se da cuando están presentes los productos génicos de *glkA* y *SCO2127* de *S. coelicolor*, por lo tanto, proponemos que los productos de dichos genes tienen función regulatoria y al sobreexpresarlos juntos y por separado en la cepa original de *S. peucetius* var. *caesius* se generarán cepas alteradas en el metabolismo y regulación por glucosa.

6. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la sobreexpresión de los genes *glkA* y *SCO2127* de *S. coelicolor* en la represión catabólica por carbono y determinar su papel en el transporte, la actividad de Glk y la síntesis de antraciclinas en *S. peucetius* var. *caesius*.

6.1 Objetivos particulares

- Subclonar los genes *glkA* y *SCO2127* de *S. coelicolor* en el plásmido multicopia pIJ486.
- Obtener cepas recombinantes con los genes *glkA* y *SCO2127* sobreexpresados en *S. peucetius* var. *caesius*.
- Evaluar el efecto de la sobreexpresión de dichos genes en la RCC sobre la síntesis de antraciclinas, el transporte de glucosa y la actividad de glucosa cinasa (Glk)

7. MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1 Cepas y plásmidos

Todas las cepas y los plásmidos utilizados, así como sus características más relevantes se describen en la tabla siguiente (3).

Tabla 3. Generalidades de las cepas y plásmidos utilizados		
Cepas	Características	Referencia
<i>S. coelicolor</i> M145	Cepa silvestre (Hopwood <i>et al.</i> , 1985)	Donada por el Dr. L. Servín-González
<i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i> NRRL B-5337	Cepa original derivada de <i>S. peucetius</i> (ORI)	Arcamone <i>et al.</i> , 1969
ORI-1 de <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i>	Cepa original con el plásmido pSG200	Este trabajo
ORI-3 <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i>	Cepa original con el plásmido pSG220	Este trabajo
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 pSG220	Este trabajo
Plásmidos	Origen y características	Fuente
pIJ486	Plásmido de alto número de copias (Kieser <i>et al.</i> , 2000).	Donado por el Dr. L. Servín-González
PSG290	pUC18 que contiene el fragmento de 2.9 kb clonado a partir de pIJ513	Guzmán <i>et al.</i> 2005
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
pSG220	pIJ486 con los genes <i>glkA</i> y <i>SCO2127</i> de <i>S. coelicolor</i>	Este trabajo

7.2 Purificación del plásmido pSG290 y pIJ486

7.2.1 Extracción del plásmido pSG290

Se transfirió una sola colonia de las placas cultivadas de *E. coli* a 3 ml de medio LB adicionado con ampicilina (100 µg/ml) en un tubo de ensayo de 5 ml, se incubó toda la noche a 37° C con agitación constante.

Se tomaron 1.5 ml del cultivo y se colocaron en un tubo Eppendorf. La muestra se centrifugó durante 30 s a 12,000x g, luego se removió el medio de cultivo dejando el paquete celular tan seco como fuera posible.

Se resuspendió el paquete de células en 100 µl de solución I fría (glucosa, 50 mM; Tris-HCl pH 8, 25 mM y EDTA pH 8, 10 mM) y se agitó en vórtex hasta disgregar el pellet por completo. Posteriormente se adicionaron 200 µl de la solución II (NaOH, 0.2N y SDS, 1%) preparada en el momento, se mezcló por inversión (5 veces) y se dejó reposar en hielo durante 5 min. Posteriormente se adicionaron 150 µl de solución III (acetato de sodio, 5M; ácido acético glacial, 1M) homogenizando en vórtex con el tubo invertido durante 10 s para dispersar la solución III a través del lisado bacteriano (de apariencia muy viscosa) y se colocó en hielo durante 5 min.

Las muestras se centrifugaron a 12,000x g durante 15 min a 4° C y posteriormente el sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo. Para precipitar el ADN se adicionaron 2 volúmenes de etanol y se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se removió el sobrenadante teniendo precaución de no extraer el pellet y se invirtió el tubo destapado sobre una toalla de papel para secarlo por completo.

Finalmente el ADN se lavó con 100 µl de etanol al 70%, se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 50 µl de buffer TE (pH 8) con RNasa (20 µg/ml). Se incubó por 30 min a 55 °C. Posteriormente se extrajo con 1 volumen (v) de fenol-cloroformo (1:1) y se precipitó con 1/10 v NaCl 5M y 2 v de etanol absoluto. Posteriormente se lavó con 100 µl de etanol al 70%, el pellet se dejó secar y se resuspendió en 50 µl de TE y se almacenó a -20° C hasta su uso (Sambrook *et al.*, 1989).

7.2.2. Extracción del plásmido pIJ486

Se utilizó micelio cultivado en fase estacionaria (72 h) en 50 ml de medio YEME (extracto de levadura, 0.3%; extracto de malta, 0.3%; glucosa, 1.0% y sacarosa, 34%) complementado con $MgCl_2 \cdot 6H_2O$. Posteriormente se centrifugó el cultivo a 7000 rpm durante 10 min, al término del ciclo, el paquete celular se resuspendió en 5 ml de solución de lisozima (2 mg/ml de lisozima en 0.3 M de sacarosa; Tris pH 8, 25 mM y EDTA, 25 mM) y se incubó a 37° C durante 30 min. Se adicionaron 2.5 ml de solución SDS-alcálina (NaOH, 0.2M y SDS, 1%) la cual se mezcló por inversión del tubo (5 veces) y se incubó durante 10 min en hielo. Posteriormente se adicionaron 8 ml de fenol-cloroformo ácido mezclando perfectamente por inversión y se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min. Se transfirió la fase acuosa (fase superior) con una pipeta Pasteur y el sobrenadante se colocó en un tubo nuevo, al cual se adicionaron 800 µl de acetato de sodio 3M y 7 ml de isopropanol. Se mezcló por inversión durante 5 min y posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min para eliminar todo el sobrenadante.

El pellet se disolvió en 500 µl de buffer TE (Tris-HCl pH 8.0, 10 mM y EDTA 10 mM, pH 8.0) adicionado con RNAsa (50 µg/ml), se incubó a 55 °C durante 30 min y transcurrido el tiempo se adicionaron 1/10 vol. de acetato de sodio 3M y 1 vol. de fenol-cloroformo neutro, que fueron mezclados en vórtex, luego la solución se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se adicionaron 500 µl de isopropanol, se volvió a centrifugar 10 min y posteriormente se retiró el sobrenadante con una pipeta. El ADN se lavó con etanol al 70%, se dejó secar y luego se resuspendió en 100 µl de buffer TE. Éste se almacenó a -20° C hasta su uso (Modificado de Kieser *et al.*, 2000).

7.3 Subclonación de los genes *glkA* y *SCO2127*

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

Los genes *glkA* y *SCO2127*, se amplificaron por PCR, juntos y por separado usando como templado el plásmido pSG290. Los cebadores empleados se diseñaron a partir de la

secuencia reportada para *S. coelicolor* M145 de los genes *SCO2127* y *glkA* (Angell *et al.*, 1992), los cuales abarcan, desde el promotor hasta el término de la transcripción.

Los oligonucleótidos para amplificar *SCO2127* fueron: Forward (5'-CACGAGATCTGGACGAACG-3') y Reverse (5'-GCGAAGCTTCCGGAGTCGG-3'). Para *glkA* fueron: Forward (5'-CGGAACTGCAGCCGCGGG-3') y Reverse (5'-AGGAGTCCGTCTAGAGCGAAG-3'). Donde ambos pares de oligonucleótidos contienen sitios de restricción para *Bgl II* y *Hind III* (Guzmán *et al.* 2005).

Para amplificar el producto *SCO2127-glkA* se empleó el oligonucleótido Forward de *SCO2127* y el Reverse de *glkA*, y se amplificaron bajo las mismas condiciones de los fragmentos por separado, esto se realizó bajo el supuesto de que dichos genes se encuentran adyacentes y posiblemente se co-transcriben (Angell *et al.*, 1992; Guzmán *et al.*,

Tabla 4. Sistema de reacción	
	<i>Concentración final</i>
Plásmido pSG290	100 ng
MgCl ₂ .7H ₂ O	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

2005). El tamaño esperado de los fragmentos de PCR es 694 (*SCO2127*), 1122 (*glkA*), y 1800 pb (*glkA-SCO2127*) respectivamente. Las características del sistema de reacción utilizado se muestran en la tabla 4.

Las condiciones bajo las cuales se realizaron los experimentos de PCR se describen en la siguiente figura.

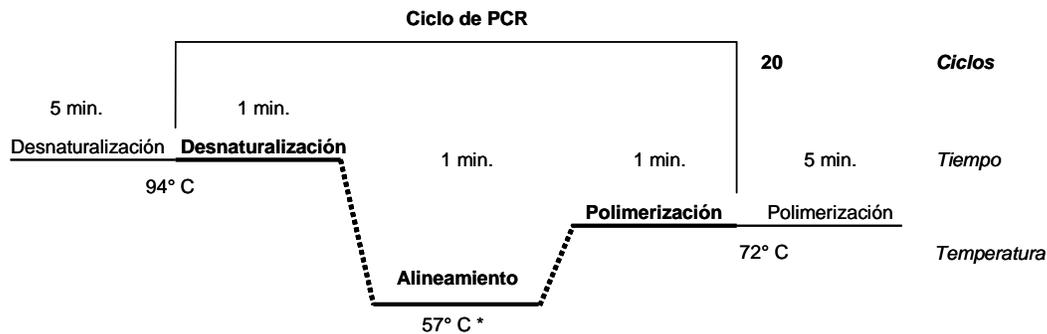


Figura 9. Condiciones para amplificación de los genes *SCO2127* y de *glkA* de *S. coelicolor*. Ambos fragmentos fueron amplificados a 57° C de temperatura de alineamiento.

Los fragmentos obtenidos fueron digeridos y analizados por electroforesis en condiciones estándar (Sambrook *et al.*, 1989). Posteriormente se cortaron las bandas correspondientes a los fragmentos esperados, los cuales fueron purificados con el sistema de Qiagen (QIAquick gel Extraction Kit). Los fragmentos se ligaron en pIJ486 en los sitios *Bgl II* y *Hind III*. Tales construcciones fueron utilizadas para transformar a la cepa original y a la mutante Dog^R de *S. peucetius* var. *caesius* utilizando las condiciones reportadas por Guzmán *et al.* (2005).

7.4 Obtención de recombinantes

7.4.1. Obtención de protoplastos

Primero se obtuvo un preinoculo de 48 h (a partir de 1 ml del stock de glicerol) cultivado en 50 ml de medio YMG (extracto de levadura al 0.4% w/v, extracto de malta al 1.0% w/v, glucosa al 0.4% a pH de 7.25) en un matraz Erlenmeyer de 250 ml con 5 perlas de vidrio (5 mm de diámetro) para disgregar el micelio (Segura *et al.*, 1996). Éste se incubó a 29° C y 180 rpm. Se lavó 2 veces con solución salina isotónica (SSI; NaCl 0.85 %) estéril y se resuspendió en 10 ml de la solución anterior.

Para obtener el cultivo se utilizó 1 ml del micelio obtenido en el precultivo para inocular un matraz con 50 ml de medio YEME, que contenía extracto de levadura 0.3%, extracto de malta 0.3%, Bacto peptona 0.5%, glucosa 1.0%, sacarosa 34%, complementado con 5

mM de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ y glicina 0.5%, como fue descrito por Kieser *et al.* (2000). Estos cultivos se crecieron hasta el inicio de la fase estacionaria.

El micelio obtenido de 100 ml (dos matrices en medio YEME) de cultivo se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min (Beckman J2-MC). El paquete celular se resuspendió en 15 ml de sacarosa al 10.35% y se repitió el paso anterior 2 veces más. Posteriormente el micelio se resuspendió en 4.5 ml de buffer L (Sacarosa, 10.3%; Amortiguador TES, 5.73%, pH 7.2; K_2SO_4 , 2.5%; Solución de elementos traza; KH_2PO_4 , 0.5%; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 2.5 M; $CaCl_2$, 0.25 M), adicionado con lisozima (1.5 mg/ml) y se incubó a 29° C hasta la formación de protoplastos (1 h aproximadamente). Se adicionaron 10 ml de buffer P y se homogenizó el tubo por inversión (5 veces). Los protoplastos se filtraron 2 veces por el sistema de filtración (ver figura 10), después las células se concentraron por centrifugación (3000 rpm por 10 min), se descartó el sobrenadante y los protoplastos se resuspendieron en 1 ml de buffer P, los cuales fueron separados en 4 tubos Eppendorf de 1.5 ml con 250 μ l de suspensión de protoplastos (1×10^9 células/ml aproximadamente).

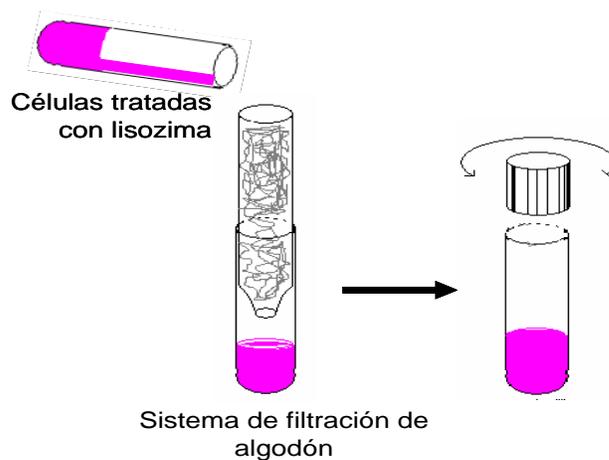


Figura 10. Proceso de filtración para separar los protoplastos de los restos del micelio

7.4.2 Transformación y regeneración de protoplastos.

Para la transformación se utilizaron 250 μ l de protoplastos, los cuales fueron concentrados en 50 μ l de buffer P. Se adicionaron hasta 10 μ l de DNA (2 μ g) en buffer TE (Tris-HCl, 10 mM; EDTA 1mM) y se mezcló. Inmediatamente se adicionaron 200 μ l de buffer T (Sacarosa, 10.3%; agua destilada; solución de elementos traza; K_2SO_4 , 2.5%; $CaCl_2$, 5 M; Tris-maléico) con PEG-1000 (3:1) y se volvió a homogenizar suavemente (modificado de Hopwood *et al.*, 1985).

La regeneración de protoplastos se llevó a cabo en medio R6 (Baltz & Mutsushima, 1981) plateando 100 μ l de suspensión de protoplastos y se incubaron 40 h a 29° C. Después del periodo de regeneración se adicionó 1 ml de sacarosa (10.3%) con 50 μ g de tioestreptón para mantener la presión de selección y la incubación se continuó 48 horas más.

7.5 Determinación de la actividad de Glk

7.5.1. Obtención de polvos de acetona

Los cultivos se realizaron a partir de un precultivo en medio YMG (antes descrito). El micelio obtenido de un cultivo de 48 h, se lavó tres veces con SSI, el cual se utilizó para inocular los matraces Fernbach de 2.8 L que contenían 500 ml de medio YMG (extracto de levadura, 0.3%; extracto de malta, 0.3%; glucosa 1.8%; pH 7.2) y 10 perlas de vidrio. Posteriormente al tiempo de incubación (40 h, 29° C y 180 rpm), el cultivo se filtró en un embudo al vacío y se emplearon filtros Whatman #40 para el proceso. El micelio obtenido se lavó con SSI y posteriormente se deshidrataron con 50 ml de acetona. Los polvos de acetona obtenidos se almacenaron a -20° C por lo menos 24 h (Imriskova *et al.*, 2001).

7.5.2. Obtención de extracto libre de células

Para la obtención de los extractos enzimáticos se trituraron los polvos de acetona en un mortero con hielo seco para romper las células, el micelio triturado se resuspendió en 3 ml de buffer Tris-HCl, 50 mM pH de 7.2. La separación de los restos celulares se realizó por ultracentrifugación a 45,000 rpm durante 1.15 h (Beckman L8-55M, empleando el rotor SW 50.1). Posteriormente el sobrenadante se almacenó en alícuotas de 1 ml en tubos eppendorf de 1.5 ml y se conservaron a -20° C. La concentración de proteína total de las muestras se determinó por el método de Lowry (1959), usando como estándar albúmina sérica bovina.

7.5.3. Cuantificación de la actividad enzimática

Se determinó a partir de los extractos libres de células, midiendo espectrofotométricamente la reducción de NADP+ ($\epsilon = 6.22 \text{ cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$) a 340 nm en una

reacción acoplada con glucosa 6-fosfato deshidrogenasa. 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. Para calcular la actividad específica de la enzima, se midió la cantidad de proteína por el método de Lowry (1959). La actividad fue expresada en unidades definida como moles de NADP reducidos por minuto a 25° C. En la figura 11 se ilustra la reacción para la determinación de la Glk.

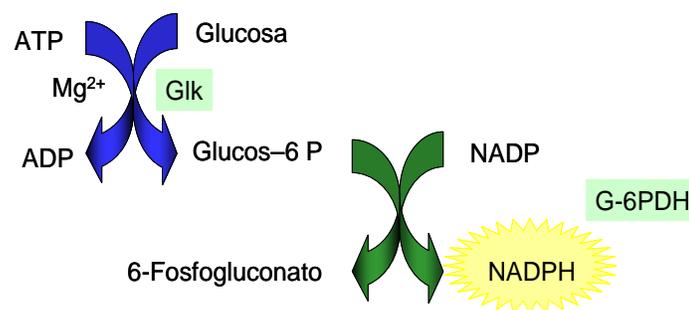


Figura 11. Reacción acoplada para la determinación de la Glk.

7.6. Cuantificación de proteína por el método de Lowry

Para esto se tomó 1 ml del cultivo, se separaron las células por centrifugación y se adicionó 1 ml de ácido tricloroacético al 10% (TCA) para romper las células. Las muestras fueron congeladas a -20° C durante 24 h; posteriormente las muestras fueron descongeladas y se centrifugaron para eliminar el TCA, al pellet se le adicionó un volumen de NaOH 0.4 N y se incubaron a 37° C durante 2 h, se tomó 0.1 ml del hidrolizado y se llevó a un 1 ml con agua destilada. Posteriormente se adicionaron 5 ml del reactivo de Lowry, mezclando perfectamente y dejando reposar durante 10 min. Posteriormente se adicionaron 500 µl del reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu diluido 1:3, se homogenizó perfectamente y se dejó reaccionar durante 30 min a temperatura ambiente, se cuantificó la absorbancia a 595 nm ajustando a cero con un blanco de 1 ml de agua, tratado de igual manera que las muestras, se interpolaron las lecturas obtenidas para cada caso en una curva estándar de albúmina sérica bovina (ABS) (Lowry, 1959).

7.7 Transporte de Glucosa

La incorporación de glucosa se determinó a partir de cultivos de 36 horas, precrecidos en matraces Fernbach de 2.8 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 glucosa 100 mM (Escalante et al., 1999).

El cultivo se lavó dos veces con SSI y se eliminó el exceso de líquido sobre papel filtro. Posteriormente se pesaron 250 mg de peso húmedo de micelio. Posteriormente se transfirió a 4.5 ml de SSI y se incubó a 29° C durante 10 min. La cuantificación inició por la adición de una mezcla de 5 µCi de D-[U-14^C]-glucosa (3.00 Bq mmol⁻¹) (Amersham) en 475 µl de glucosa 10 mM fría (sistema de reacción). A cada tiempo (10, 20, 30 y 60 s), la muestra se filtró en membranas de 0.45 µm (Millipore, tipo HA) e inmediatamente se lavó con glucosa 10 mM fría para detener la reacción. La radioactividad se determinó en solución de centelleo comercial (EcoLite(+)) de ICN (Modificado de Escalante *et al.*, 1999).

7.7.1 Cuantificación de peso seco

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).

7.8. Sensibilidad a represión catabólica por glucosa

7.8.1 Cuantificación de antraciclinas

Con el objetivo de conocer la sensibilidad a RC por glucosa en las cepas, se monitoreó la producción de antraciclinas, la cual se llevó a cabo en cultivos crecidos en medio YM sólido en condiciones represoras (500 mM) y no represoras de glucosa (100 mM).

Para obtener el micelio se raspo directamente del cultivo crecido en medio sólido. A 50 mg de micelio se le añadió 1 ml de una solución de extracción [acetona: H₂SO₄ 0.1 N (4:1)], agitando en vórtex durante 1 min. Posteriormente se centrifugó la muestra, conservando la solución de extracción en un tubo aparte; este proceso se repite hasta que el micelio se torne blanco. Las antraciclinas extraídas se cuantificaron espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 495 nm usando un coeficiente de extinción molar de 220 (modificado de Dekleva *et al.*, 1985).

Para conocer la producción específica, se hizo una relación con respecto a la cantidad de micelio (50 mg de peso húmedo), la cual se determinó por proteína total por el método de Lowry (1959).

7.9. Reproducibilidad de los resultados.

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

8. RESULTADOS

8.1 Análisis del vector pSG290.

Para llevar a cabo la amplificación de los genes *SCO2127* y *glkA* de *S. coelicolor*, se utilizó como templado el plásmido pSG290. Dicha vector se obtuvo por subclonación en pUC18 de un fragmento de 6.0 kb a partir del plásmido pIJ513, que contiene los genes de interés. El plásmido pSG290 se purificó y se digirió con *Eco RI* para su posterior análisis por electroforesis (ver figura 12).

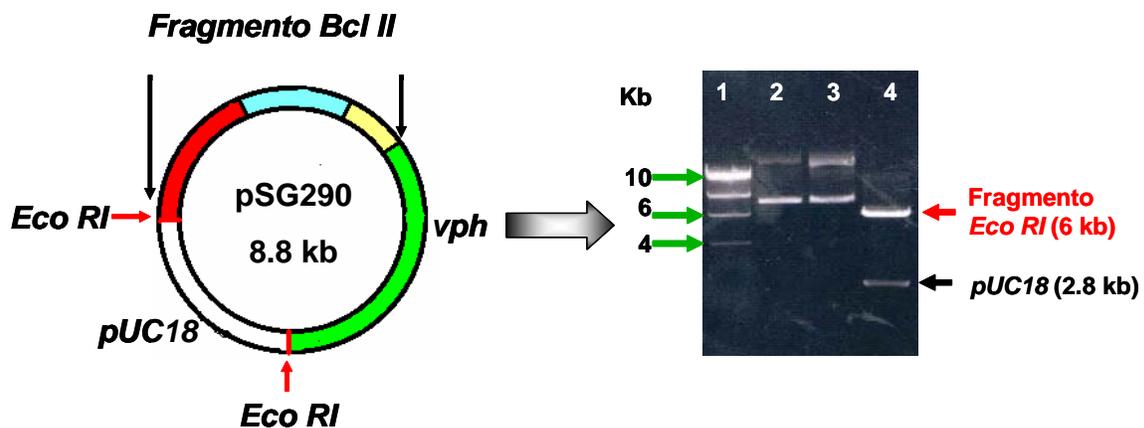


Figura 12. Purificación del vector pSG290. A la izquierda se ilustra el mapa de la construcción genética obtenida. En el plásmido pUC18 se subclonó el inserto *Eco RI* (6.0 kb) proveniente de pIJ513, el cual contiene un fragmento de 2.9 kb de *S. coelicolor* (*SCO2128*, *SCO2127* y *al gen de glkA*). A la derecha se muestra la fotografía del análisis electroforético; (1) el marcador de peso molecular; (2 y 3), pSG290 y (4), pSG290 cortado con *Eco RI*.

8.2. Amplificación y clonación de los genes *SCO2127* y *glkA* juntos y por separados de *S. coelicolor*.

Para la amplificación de los fragmentos de interés, se sintetizaron oligonucleótidos que cubren la región promotora y la parte codificante de cada uno de los genes utilizando al vector pSG290 como templado. El tamaño estimado para los fragmentos *SCO2127* y *glkA* corresponden a 694 pb y 1122 pb respectivamente, mientras que el fragmento que abarca ambos genes es de 1800 pb. En la figura 13 se muestran los resultados del patrón electroforético de los amplicones.

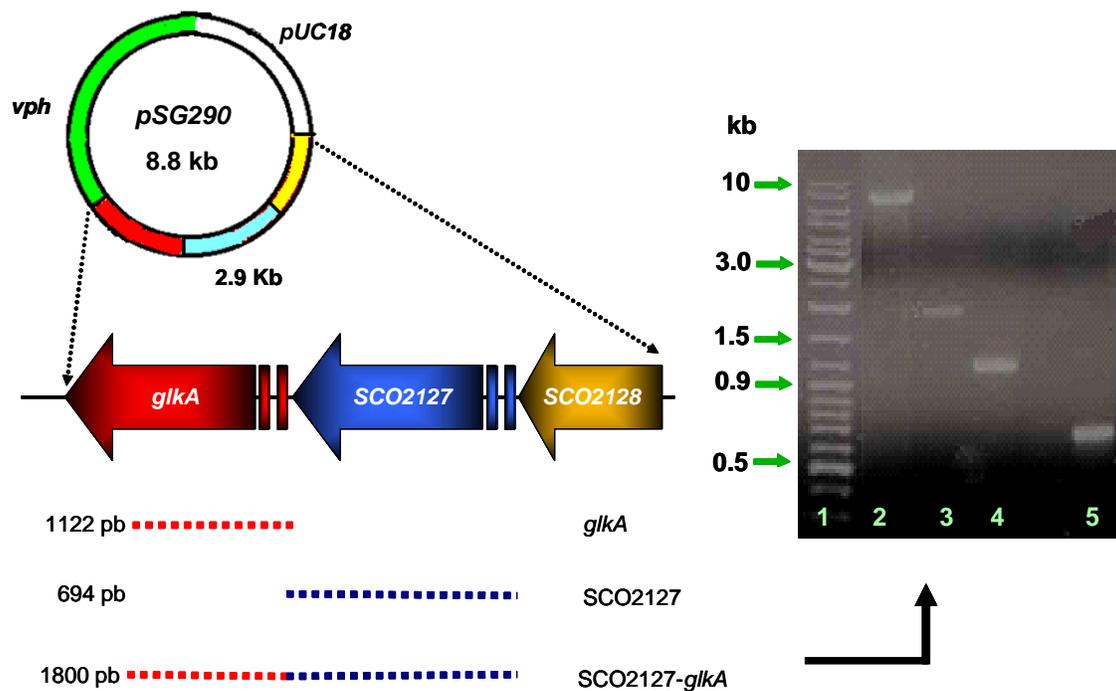


Figura 13. Amplificación de los genes *SCO2127* y *glkA* juntos y por separado de *S. coelicolor*. Estos genes se subclonaron en el vector pJ486. A la izquierda se muestra la figura de la amplificación y a la derecha la fotografía de los amplicones analizados por electroforesis. En los carriles: (1), MPM; (2), pJ486; (3-5) Los fragmentos generados por PCR correspondiente a los genes *SCO2127-glkA*, *glkA* y *SCO2127* respectivamente.

Los fragmentos generados se clonaron por separado en el plásmido pIJ486, obteniéndose las construcciones pSG200 (*glkA*), pSG210 (*SCO2127*) y pSG220 (*glk-SCO2127*), respectivamente.

8.3. Transformación de *S. peucetius* var. *caesius* insensibles a RCC.

Los protoplastos de la cepa silvestre y de la mutante Dog^R se transformaron con los plásmidos pSG200, pSG210 y pSG220. Las cepas generadas (ver la Tabla 5) se platearon en medio R6 y se incubaron durante 48 h, posteriormente se adicionó 1 ml de sacarosa al 10.3% con 50 µg de tioestreptón y se incubaron durante 48 h más. Posteriormente las recombinantes se reseleccionaron en medio completo (YMG) bajo presión selectiva (tioestreptón). Después de varias generaciones los plásmidos (pSG200, pSG210 y pSG220) fueron recuperados.

Tabla 5. Cepas recombinantes obtenidas		
Cepas recombinantes	Plásmido (fragmento)	Cepa parental
ORI-1	pSG200 (<i>glkA</i>)	Original
ORI-3	pSG220 (<i>glkA- SCO2127</i>)	
SDR-1	pSG200 (<i>glkA</i>)	Dog ^R
SDR-2	pSG210 (<i>SCO2127</i>)	
SDR-3	pSG220 (<i>glkA-SCO2127</i>)	

8.4. Análisis y caracterización de las recombinantes de *S. peucetius* var. *caesius*.

Para conocer el efecto de la inserción de dichos genes en la cepa original y en la mutante Dog^R, se evaluó la actividad de glucosa cinasa, la incorporación de glucosa y la sensibilidad a represión catabólica evaluada sobre la producción de antraciclinas.

8.4.1. Actividad de glucosa cinasa.

Basados en la relación que existe entre la Glk y la RCC en *S. coelicolor*, se cuantificó la actividad de Glk, en *S. peucetius* var. *caesius* y se monitoreó el efecto de la sobreexpresión de *glkA* y *SCO2127* en la RC por glucosa, en la cepa original y en la mutante Dog^R (ver figura 14).

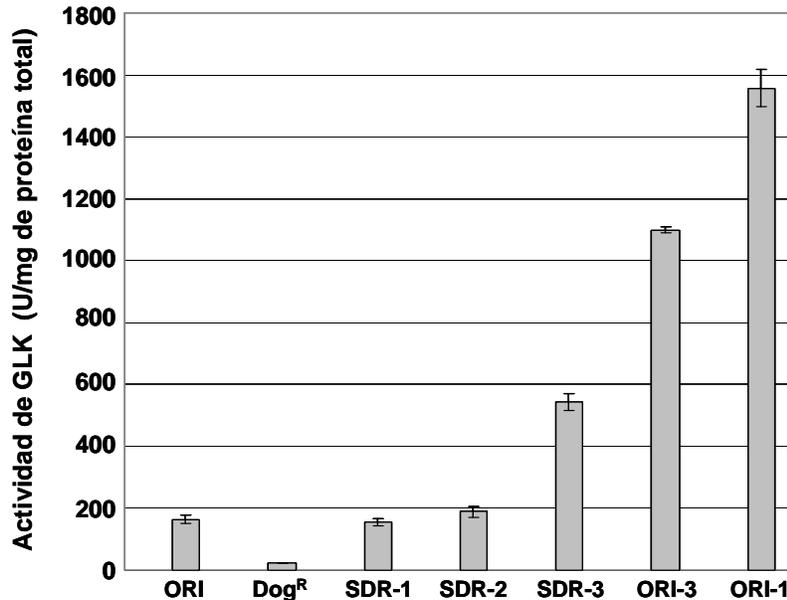


Figura 14. Actividad de Glk. Se determinó en micelio cultivado durante 48 horas en medio YM complementado con 100 mM de D-glucosa. (ORI), *S. peucetius* var. *caesius*; (Dog^R) mutante derivada de *S. peucetius* var. *caesius*; (SDR-1), Dog^R + *glkA*; (SDR-2), Dog^R + *SCO2127*; (SDR-3) Dog^R + *glkA-SCO2127*; (ORI-1) ORI + *glkA*; (ORI-3) ORI + *glkA-SCO2127*. Donde la U, se define como nmol de NADP reducidos por minuto en 1 mg de proteína.

Como puede observarse en la figura anterior (14), la cepa original muestra un valor de actividad de 163 U/ mg de proteína y la mutante Dog^R de 24 U/ mg de proteína, lo que equivale al 100% y al 15% respectivamente. Por otro lado, las recombinantes de Dog^R ; SDR-1(*glkA*) y SDR-2 (*SCO2127*) aumentaron 6.3 y 7.6 veces con respecto a la parental. Sin embargo en SDR-3 (*glkA-SCO2127*) se observó un aumento de 22 veces, posiblemente hay un efecto sinérgico cuando están presentes ambos genes.

En lo que respecta a las recombinantes de la original: ORI-1(*glkA*) y ORI-3 (*glkA-SCO2127*), mostraron aumento con respecto a la cepa parental, 6.5 y 9.6 veces, respectivamente.

8.4.2 Incorporación de glucosa.

Considerando que el metabolismo de la glucosa inicia con su incorporación a la célula, investigamos la posible relación entre el transporte de este carbohidrato y la RCC en las recombinantes. Adicionalmente se observó como afecta la sobre-expresión de los genes *SCO2127* y *glkA*, juntos y por separado en las cepas Dog^R y en la original de *S. peuceetius* var. *caesius*. Para ello se monitoreó la incorporación de D-[U-14^C]-glucosa a distintos tiempos. En la figura 15 se puede observar que en todas las cepas obtenidas, la presencia de *glkA* no modifica la tasa de incorporación de glucosa, ya que los valores obtenidos no muestran diferencias con respecto a cepa parental. En cambio, la presencia de *SCO2127* se observa un incremento en todas las cepas con respecto a su contraparte no transformada.

Para fines comparativos se hizo el análisis del transporte a los 60 S, en el cual, se pudo observar que en las recombinantes de Dog^R; SDR-2 (*SCO2127*) y SDR-3 (*SCO2127-glkA*) mostraron aumento de 1.48 y 1.53 veces. En cambio la original con el fragmento *SCO2127-glkA* (ORI-3) aumento 1.12 veces.

Cabe mencionar que el efecto de *SCO2127* sobre el transporte de glucosa fue significativamente menor (1.2-1.4 veces) que con respecto a la actividad de Glk (3-22 veces). Este efecto puede ser a que el sistema de transporte se inhibe por la glucosa intracelular. Mientras que la actividad de Glk se activa en presencia de glucosa, tal efecto se ha observado en *S. coelicolor* (Wezel *et al.*, 2007).

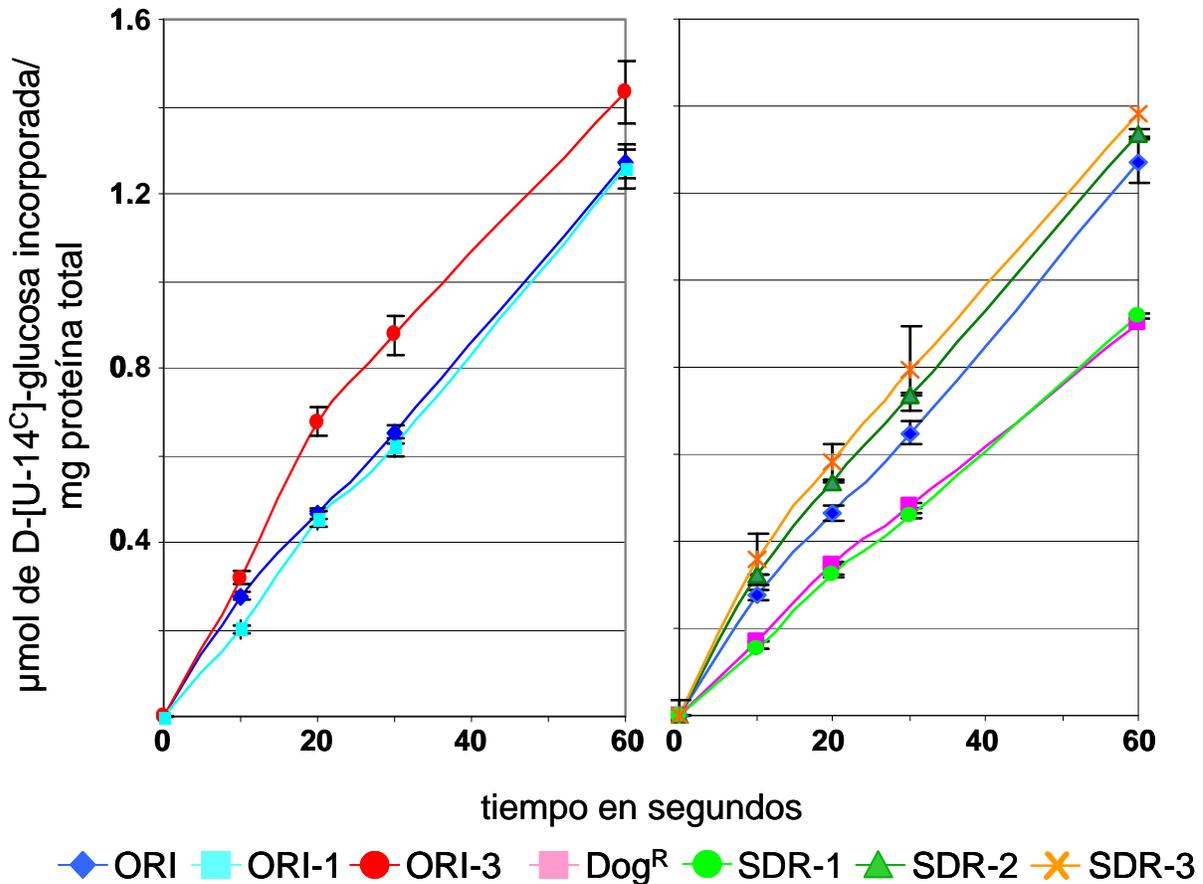


Figura 15. Incorporación de D-[U-14^C]-glucosa en las cepas de *S. peucetius* var. *caesi*us. Se utilizó micelio de 36 h, cultivado en medio CD complementado con 100 mM de D-glucosa. Se monitoreo la incorporación de glucosa cada 10 s hasta un minuto. (ORI), *S. peucetius* var. *caesi*us; (Dog^R) mutante derivada de ORI; (SDR-1), Dog^R + *glkA*; (SDR-2), Dog^R + *SCO2127*; (SDR-3) Dog^R + *glkA-SCO2127*; (ORI-1) ORI + *glkA*; (ORI-3) ORI + *glkA-SCO2127*.

8.4.3. Sensibilidad a represión por glucosa

Se ha demostrado que la utilización de glucosa afecta la expresión de una gran gama de genes, los cuáles se encuentran involucrados en el transporte y en la utilización de fuentes de carbono alternativas como la lactosa (Hodgson, 1982), así como la síntesis de enzimas extracelulares y metabolitos secundarios (Servin-González *et al.*, 1994; Segura *et al.*, 1996). En *Streptomyces peucetius* var. *caesi*us, la síntesis de antracilinas se ve afectada negativamente por la concentración de glucosa (mayor a 350 mM), fenómeno que fue demostrado anteriormente por Segura *et al.*, 1996 y Escalante *et al.*, 1999.

Para conocer si las recombinantes muestran cambios en la sensibilidad a RCC con respecto a las cepas parentales, se realizaron cultivos en medio YM, en altas (500 mM) y bajas (100 mM) concentraciones de glucosa y se cuantificó la producción de antraciclinas. En la tabla 6 se observa la producción de antraciclinas de todas las cepas. Podemos deducir que la original, cultivada en 500 mM de glucosa muestra el 5% de producción con respecto al cultivo a 100 mM, lo que indica que es sensible a altas concentraciones de glucosa. En cambio en la mutante Dog^R muestra disminución relativa en la producción de antraciclinas aproximadamente de 50%, además presenta 5 veces más producción comparada con la original cultivadas a 100 mM de glucosa.

Con lo que respecta a las recombinantes derivadas de la cepa original (ORI-1 y ORI-2), la presencia de la *glkA* y *SCO2127-glkA*, muestran hipersensibilidad mostrando valores similares de producción de antraciclinas en ambas concentraciones de glucosa. Cabe resaltar que inclusive a 100 mM de glucosa muestran solo el 20 % de producción de antraciclinas, comparada con la cepa parental, lo que puede sugerir hipersensibilidad por glucosa.

Por otro lado, las recombinantes derivadas de Dog^R (SDR-1, SDR-2 y SDR-3), muestran sensibilidad a RCC similar entre ellas, inclusive en ambas concentraciones de glucosa. Es importante señalar que los valores de producción de las recombinantes son significativamente menores en los cultivos crecidos a 100 mM de glucosa (5.0-45 de μg de antraciclinas/mg de proteína) comparados con la cepa parental (547), lo que representa hipersensibilidad a glucosa, para la producción de antraciclinas.

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		100.31 \pm 5.06	5.60 \pm 0.04	S
ORI-1	<i>glkA</i>	17.67 \pm 1.01	4.77 \pm 0.33	S ⁺⁺
ORI-3	<i>SCO2127+glkA</i>	21.69 \pm 0.85	3.64 \pm 0.45	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 ⁺⁺

La sensibilidad a RCC se determinó sobre la producción de antraciclinas en cultivos crecidos en medio YM mas glucosa en altas (500 mM) y bajas concentraciones (100) mM, en cultivos de 120 h. Sensibilidad (S), Resistencia (R). (+) Nivel de sensibilidad cualitativo.

9. DISCUSION

En *S. coelicolor* se ha sugerido que la Glk es un elemento clave en la RCC, la cual pudiera interactuar con catabolitos generados en presencia de glucosa y ejercer represión. En apoyo a esta hipótesis se ha observado que mutantes capaces de crecer en DOG (Dog^R), presentan disminución en la actividad de Glk y resistencia a RCC (Hodgson, 1982). Estas mutantes al ser complementadas con un fragmento que contiene el gen que codifica para la Glk (*glkA*), recuperan dicha actividad y restituyen la sensibilidad a RC a niveles similares de la cepa parental.

En análisis de secuencia posteriores se demostró que el fragmento que complementa la función tenía dos genes completos, *glkA* y *SCO2127*. Con base en esto, se realizaron estudios de complementación de mutantes Dog^R, Glu⁻ (incapaces de incorporar glucosa), Glk⁻ (incapaces de utilizar la glucosa) e insensibles a RCC, solamente con el gen *glkA* y se observó que dichas recombinantes ahora eran capaces de crecer en DOG (Dog^R), recuperan la actividad de Glk y restituyen parcialmente la sensibilidad a RC a niveles parciales comparada con la cepa parental (Angell *et al.*, 1994). Esto sugirió que la Glk sola no es suficiente para ejercer el efecto de RCC en *S. coelicolor*.

Por otro lado, Kwakman y Postma (1994) demostraron que la sobreexpresión de *glkA*, en estas mutantes (Dog^R, Glu⁻, Glk⁻), mostraban un fenotipo Dog^S, Glk⁺, Glu⁺, pero pierden la

sensibilidad a RCC, aparentemente niveles altos de Glk causa insensibilidad a RCC (1994). Sin embargo otras investigaciones han demostrado que la Glk no es necesaria para el efecto de represión por glucosa en la expresión de *chi63* (quitinasa) (Ingram & Westpheling., 1995) o en la expresión de la α -amilasa en *S. kanamyceticus* (Flores *et al.*, 1993). Con base en lo anterior, aún no se tienen evidencias concretas que relacionen directamente a la Glk, en la RC por glucosa en *S. coelicolor*.

Por otro lado, en mutantes de *S. peucetius* var. *caesius* (Dog^R), resistentes a RCC muestran un fenotipo diferente a las encontradas en *S. coelicolor*, ya que presentan deficiencias en la actividad de Glk y además baja incorporación de glucosa, fenotipo que podría ser la causa de la resistencia ejercida por glucosa (Segura *et al.*, 1999; Escalante *et al.*, 1999). Posteriormente, estas mutantes Dog^R fueron sometidas a un proceso de enriquecimiento aislando una serie de mutantes seleccionadas por su sensibilidad a Dog (Dog^S), mismas que mostraron una relación diferencial en cuanto a actividad de Glk/transporte de glucosa, y no se encontró una relación directa entre la actividad de Glk y la sensibilidad a RCC como en *S. coelicolor* (Ramos *et al.*, 2004).

De acuerdo a lo anterior nosotros trabajamos con la mutante Dog^R y la cepa original de *S. peucetius* var. *caesius*, mismas que fueron complementadas con los genes *glkA* y *SCO2127* juntos y por separado para establecer una relación entre el transporte de glucosa, la actividad de Glk y la RCC. Para fines comparativos, en la tabla siguiente (7) se resumen todos los parámetros cuantificados en todas las cepas.

Cepa	Inserto	% Transporte de Glucosa	% Actividad de Glk	Sensibilidad a Represion catabólica		
				Producción de antraciclinas		RCC
				Glu [100mM]	Glu [500mM]	
Original	Control	100	100	100.31±5.06	5.60± 0.04	S
ORI-1	<i>glkA</i>	98	671	17.67± 1.01	4.77± 0.33	S ⁺⁺
ORI-3	<i>glkA</i> - <i>SCO2127</i>	112	951	21.69± 0.85	3.64± 0.45	S ⁺⁺
Dog ^R	Control	100	100	547.08±22.58	235.45± 7.12	R
SDR-1	<i>glkA</i>	101	634	45.49± 4.67	7.39± 0.23	S
SDR-2	<i>SCO2127</i>	148	768	4.91± 0.34	5.38± 0.38	S ⁺⁺
SDR-3	<i>glkA</i> - <i>SCO2127</i>	153	2214	20.29± 0.60	14.05± 0.30	S ⁺⁺

Los valores obtenidos de transporte de glucosa (determinado a los 60s) y actividad de Glk están en porcentaje, dichos valores se calcularon comparando a cada cepa con la parental. S, S+ y S++, representan niveles cualitativos de sensibilidad a RCC, el cual se determinó como producción de antraciclinas en cultivos crecidos en altas concentraciones de glucosa (500 mM) y comparado con la original. RCC, Represión catabólica por carbono.

En el presente trabajo, se logró demostrar que la mutante Dog^R insensible a RCC, al ser transformada con el plásmido pSG210 (que contiene el gen *SCO2127*), es capaz de reestablecer la incorporación de glucosa, la actividad de Glk y sensibilidad a RC por glucosa, inclusive a condiciones no represoras (100 mM). Aunque es importante señalar que aún no se ha sido probado a que nivel está afectada la mutante Dog^R, pero nuestros resultados sugieren que es probable que sea a nivel de *SCO2127*, ya que al ser complementadas con este gen, se reestablecen el transporte y fosforilación de glucosa (vía Glk), así como la sensibilidad a RCC.

En esta misma mutante (Dog^R), pero transformada con pSG200 (*glk*), se observó recuperación en la sensibilidad a RCC y aumento en los niveles de glucosa cinasa, pero la incorporación de glucosa no presentó cambios. Esto último nos indica que la Glk y el transporte de dicho carbohidrato son eventos independientes, lo cual concuerda con lo antes descrito por Ramos *et al.* (2004).

La recombinante SDR-3 (Dog^R con *glkA*-SCO2127) presentó sensibilidad a RCC, un aumento en el transporte y fosforilación de glucosa, es importante señalar que la actividad de Glk aumentó 22 veces más que la parental, lo que puede sugerir que hay estímulo del gen SCO2127 sobre la expresión del gen endógeno y/o el heterólogo (*glkA* de *S. colicolor*), en análisis anteriores de expresión de *glk*, se pudo observar que dicha recombinante presenta niveles mayores de transcrito comparado con la parental (Guzmán *et al.*, 2005).

Por otro lado, en la cepa original con *glkA* (ORI-1) no hay diferencia en el transporte de glucosa, pero si hay un aumento de actividad de Glk, de aproximadamente 6.7 veces, además es hipersensible a RCC, ya que en bajas concentraciones de glucosa presentó 17% de producción de antraciclinas con respecto a la parental (ver la tabla 7). Este resultado es contrario a lo mostrado en *S. coelicolor*, ya que cuando *glkA* es sobreexpresada en la cepa silvestre, pierde la sensibilidad a RC por glucosa (Kwakman y Postma, 1994). Cabe la posibilidad en *S. peucetius* var. *caesius*, de un mecanismo diferente y en esta especie además de la presencia de Glk, se requieren de otros elementos para ejercer la represión por glucosa.

Por otro lado, la recombinante ORI-3 (Original con *glkA*-SCO2127) presentó hipersensibilidad a RCC a niveles similares que ORI-1, además aumentó el transporte (135%) y la actividad de Glk (951%) con respecto a la parental. Esto nos sugiere que el producto de SCO2127 estimula el transporte de glucosa y la actividad de Glk.

En general pudimos determinar que la Glk es un elemento importante en la RCC ya que la sobreexpresión genera hipersensibilidad, inclusive a bajas concentraciones de glucosa hay disminuye significativa de la producción de antraciclinas, en la cepa original y en la mutante Dog^R, esto apoya a lo que se ha descrito en el *S. coelicolor* (Ikeda *et al.*, 1984; Angell *et al.*, 1992; Angell *et al.*, 1994; Segura *et al.* 1996, Ramos *et al.*, 2004 y Guzman *et al.*, 2005a y 2005b).

Aunque se ha demostrado que la presencia de Glk es clave para ejercer la RCC, no se ha propuesto un mecanismo por el cual la Glk este participando. Además en estudios *in silico*, se corroboró que la Glk no posee sitios de unión a DNA, pero se ha detectado que se une a otra proteína de identidad aún desconocida (Mahr, 200), aunque posee un 52%,

55% y 52% de similitud en su secuencia de aminoácidos con proteínas regulatorias como *nagC*, *xyIR* de *B. subtilis* y *xyIR* de *Lactobacillus pentosus* (Angell *et al.*, 1992).

También demostramos que *SCO2127* tiene un efecto en la RCC, ya que por si solo recupera el transporte y fosforilación de glucosa (vía Glk). En *S. coelicolor* se observó que solo el fragmento *SCO2127-glk*, restablece la sensibilidad a RCC a niveles similares de la cepa silvestre. Para explicar este fenómeno Angell *et al.* (1994) proponen que el reestablecimiento total de la RCC en las mutantes de *S. coelicolor* puede ser ocasionado por la presencia del promotor adyacente a *SCO2127*, el cual aumenta el nivel de expresión Glk o posiblemente a que este gen pudiera participar en el transporte y metabolismo de la glucosa. Esto último parece poco probable, según los resultados de este trabajo y los obtenidos por Guzmán *et al.* (2005), ya que si hubiese existido un evento de recombinación entre el plásmido y el cromosoma de las recombinantes, entonces, no podría ser explicado el efecto estimulador de éste sobre el transporte de glucosa, ya que en *S. coelicolor*, el locus del gen responsable del transporte (*glcP1*), no se localiza próximo a *SCO2127*, sino en la región conservada del cromosoma, opuesto a este último (Bertram *et al.*, 2004).

Cabe mencionar que en *S. peucetius* var. *caesius* se ha determinado que el sistema de transporte es inducible por glucosa, ya que cuando son crecidas en presencia de otras fuentes de carbono (glutamato) no muestran una incorporación significativa de glucosa (Escalante *et al.*, 1999). Recientemente se ha observado que en *S. coelicolor*, la incorporación de glucosa es de tipo simporte dependiente de protones (H⁺) y también es inducible. Además existen dos genes que codifican para dicho transportador *glcP1* y *glcP2*, los cuales generan un producto idéntico (Wezel *et al.*, 2005).

Estudios recientes del genoma de *S. peucetius* demostraron la presencia de los genes homólogos a *SCO2127* y *glkA* de *S. coelicolor*. Se pudo constatar que dichos genes se encuentran adyacentes y en la misma dirección, lo cual indica que están organizados de la misma manera en ambas especies, el locus que corresponde a *SCO2127* y *glkA* en *S. peucetius* es *SP2562* y *SP2563* respectivamente. Para el homólogo de *glcP1* corresponde el locus *SP7066* (Jae Kyung Sohng datos no publicados).

Finalmente, aunque en el fenómeno de RCC se desconocen varios elementos importantes para poder así descifrar el mecanismo global, se ha logrado demostrar que

los productos de *glk* y *SCO2127*, actúan en forma sinérgica; aumentando la glucólisis, y con ello la producción de algunos metabolitos intermediarios como glucosa 6-fosfato y el PEP, los cuales se ha demostrado que poseen un efecto negativo sobre la síntesis de antraciclinas (Ramos *et al*, 2004) y que a su vez pudiesen unirse a un represor específico evitando así la expresión de genes sensibles a RCC en *S. peuceetius* var. *caesius*.

10. CONCLUSIÓN

La sobre-expresión del gen *glkA* en las cepas de *S. peucetius* var. *caesius* (SDR-1, SDR-3; ORI-1 y ORI-3) permitió la recuperación de la actividad de Glk pero no el transporte, esto evidencia que el transporte de glucosa es independiente a la actividad de Glk.

A diferencia de *S. coelicolor*, en nuestro modelo, la resistencia a RC por glucosa no depende solamente de la actividad de Glk.

La sobre-expresión de los fragmentos *glkA* y *glkA-SCO2127* generan hipersensibilidad a RC por glucosa en las cepa original y en la mutante Dog^R de *S. peucetius* var. *caesius*.

La expresión de *glkA* y *SCO2127* juntos y por separado en la mutante Dog^R restablece la actividad de Glk, la incorporación de glucosa y muestran hipersensibilidad a RCC.

El gen *SCO2127* posee un efecto sinérgico, cuyo producto génico favorece fenómenos claves como la incorporación favoreciendo el metabolismo de glucosa y la represión catabólica por carbono en *Streptomyces*.

11. PERSPECTIVAS

A pesar de que se ha demostrado el efecto de los genes *glk* y *SCO2127* en *S. peucetius* var. *caesius*, no se conoce el mecanismo por el cual éstos repercuten en la RCC, en la actividad de Glk y en la incorporación de carbohidratos, por ello se propone:

- a) La obtención de la cepa original con el gen *SCO2127* sobreexpresado, para observar el efecto de éste en la RCC, así como en la incorporación de glucosa y en la actividad de Glk.
- b) Clonar el gen homólogo a *SCO2127* en *S. peucetius* var. *caesius*, el cual corresponde al locus *SP2563*, de esta manera establecer si el efecto de dicho gen se presenta en el género *Streptomyces* de manera generalizada.
- c) Clonar el gen homólogo a *glcp* *S. coelicolor* en *S. peucetius* var. *caesius* (*SP7066*) y establecer su papel en la RC por glucosa en ambas especies.
- d) Conocer el efecto de mutaciones puntuales en los genes *SCO2127* y *glk* en *S. coelicolor* y en *S. peucetius* var. *caesius* (*SP2562* y *SP2563*) sobre la RCC, la incorporación de glucosa y la actividad de glucosa cinasa, con el fin de elucidar directamente su papel en dichos parámetros antes mencionados.

12. REFERENCIAS.

1. http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_scabies/
2. Angell S., Lewis C.G., Bibb M.J. (1994). Glucose repression in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a likely regulatory role for glucose kinase. *Mol. Gen. Genet.* 244:135-143.
3. Angell S., Schwarz E., Bibb M.J. (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.
4. Arcamone F., Cassinelli G., Fantini G., Grein A., Orezzi P., Poll C y Spalla C. (1969). Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor Antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biothechnol. Bioeng.* 11: 1101-1110.
5. Baltz H y Mutsushima P. (1981). Protoplast fusion in *Streptomyces*: conditions for efficient genetic recombination and cell regeneration. *J. Gen. Microbiol.* 127, 137-146.
6. Bentley *et al.* (2001). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature.* 417, 141-147.
7. Bertram R. *et al.* (2004). *In Silico* and Transcriptional Analysis of Carbohydrate Uptake Systems of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* 186: 1362-1373.
8. Blum R. H; y. Carter S. K. (1979). A new anticancer Drug with significant clinical activity. *Annals of Internal Medicine* 80:249 – 259.
9. Bolotin A., Wincker P., Mauger S., Jaillon O., Malarme K., Weissenbach J., Ehrlich D. y Sorokin A. (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.* 11(5):731-53.
10. Brückner R y 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.
11. Cárdenas M. L., Cornish-Bowden A., Ureta T. (1998). Evolution and regulatory role of the hexokinasas. *Biochimica et Biophysica Acta* 1401: 242 – 264.
12. Challis G.L y Hopwood D.A. (2003). Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *PNAS.* 100: 14555-14561.
13. Chen C. W; Huang C-H; Lee H-H; Tsai H-H y Kirby R. (2002). Once the circle has been broken: dynamics and evolution of *Streptomyces* chromosomes. *TRENDS in Genetics.* 18(10): 522 – 529.
14. Dary A. P. Martin; Wenner T; Leblond P. y Decaris B. (1999). Evolution of the linear chromosomal DNA in *Streptomyces*: is genomic variability developmentally modulated? *Res. Microbiology.* 150: 439 – 445.

15. Dekleva M., Titus A. y Strohl R. (1985). Nutrient effects on anthracycline production by *Streptomyces peucetius* in a defined medium. *Can. J. Microbiol.* 31, 287-294.
16. 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.
17. Görke B. y Rak B. (1999). Catabolite control of *Escherichia coli* regulatory protein BglG activity by antagonistically acting phosphorylations. *EMBO J.* 18, 3370–3379.
18. Escalante L., Ramos I., Imriskova I., Langley E. y Sánchez, S. (1999). Glucose repression of anthracyclines formation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, 572-578.
19. Flores M. E., Ponce E., Rubio M. y Huitron C. (1993). Glucose and glycerol repression of amylase in *Streptomyces kanamyceticus* and isolation of deregulated mutants. *Biotechnol. Lett.* 15, 595-600.
20. Guzmán S; Carmona A; escalante L; Imriskova I; López R; Rodríguez-sanoja R; Ruiz B; Servín-Gonzalez 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*. *Microbiol.* 151, 1718-1723.
21. Hershberger C., Queener S. y Hegeman G. (1989). Genetics and molecular biology of industrial microorganism. Ed. American Society for Microbiology. USA.
22. Hester K. L; Lehman J; Najjar F; Song L; Roe B. A; MacGregor C. H; Hager P. W; Phibbis P. V. y Sokatch J. R. (2000). Crc is involved in catabolite repression control of the *bkd* operons of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bac.* Feb 2000: 1144 - 1149.
23. Hodgson D. A. (1982). Glucose repression of carbon source uptake and metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its perturbation in mutants resistant to 2-deoxyglucose. *J. Gen. Microbiol.* (1982) 128: 2417 – 2430.
24. Hodgson D. (2000). Primary metabolism and its control in *Streptomyces*: A most unusual group of bacteria. *Adv. in Microbiol. Physiol.* 42, 47-238.
25. Hopwood D. A. (2003). The *Streptomyces* genome was been prepared! 2003. *Nature Biotech.* 21: 505 – 506.
26. 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 Foundation, Norwich. Inglaterra. pp 354.
27. Hoskins J., Alborn WE., Arnold J., Blaszcak LC., Burgett S. y DeHoff BS. *et al.* (2001). Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J. Bacteriol.* 183(19), 5709-17.

28. Hutchings M. I; Hoskinsson P. A; Chandra G; y Buttner M. J. (2004). Sensing and responding to diverse extracellular signals? Analysis of the sensor kinases and response regulators of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* 150: 2795–2806.
29. Huang C-H; Lin Y-S y Yang Y-L. (1998). The telomeres of *Streptomyces* chromosomes contain conserved palindromic sequences with potential to form complex secondary structures. *Mol Microbiol.* 28(5): 905 – 916.
30. Ikeda H; Ishikawa J; Hanamoto A; Shinose M; Kikuchi H; Shiba T; Sakaki Y; Hattori M y Omura S. (2003). Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature Biotech.* 21: 526 – 531.
31. Ikeda H; Seno E. T; Bruton C. J y Chater K. F. (1984). Genetic mapping, cloning and physiological aspects of the glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Gen. Genet.* 196: 501 – 507.
32. Imriskova I., Langley E., Arreguín-Espinoza R., Aguilar G., Pardo P. y Sánchez S. (2001). Purification and characterization of glucose kinase from *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Arch. Biochem. Biophys.* 394, 137-144.
33. Ingram C; Delic I; Westpheling J. (1995). *ccrA1*: A mutation in *Streptomyces coelicolor* that affects the control of catabolite repression. *J. Bac.* June 1995: 3579 – 3586.
34. Jault J-M., Fieulaine S., Nessler S., Gonzalo P., Di Pietro A., Deutchster J. y 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. Chemistry.* 275 (3) 1773-1780.
35. Kieser T., Bibb M., Buttner M., Chater K., y Hopwood D. (2000). Practical *Streptomyces* Genetics. The John Innes Foundation, Norwich.
36. Kwakman J.H.J. M; Postma P. W. (1994). Glucose kinase has a regulatory role in carbon catabolite repression in *Streptomyces coelicolor*. *J Bac.* May 1994: 2694 – 2698.
37. Langley E., Mascareñas N., Ruiz B. y Sánchez S. (2004). *Streptomyces peucetius* var. *caesius* glucosa kinase. NCBI Gen bank nucleotide. gi:50263005.
38. 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.
39. Lowry O., Rosebrough N., Farr A. & Randall R. (1959). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol Chemistry.* 193, 265-275.
40. Lux R., Jahreis K., Bettenbrock K., Parkinson J. y 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.

41. Mahr K., Hillen W. y Titgemeyer F. (2000). Carbon catabolite repression in *Lactobacillus pentosus*: analysis of the *ccpA* region. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 277–283.
42. Murray R., Williams y Wilkins. (1985). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 2 Ed. Seath P. Los Angeles, USA.
43. Parajuli N; Basnet D. B; Chan Lee H; Kyung Sohng J y Liou K. (2004). Genome analyses of *Streptomyces peuceitius* ATCC 27952 for the identification and comparison of cytochrome P450 complement with other *Streptomyces*. *Arch. Biochem. Biophys.* 425: 233 – 241.
44. Paulsen I.T. (1996). Carbon metabolism and its regulation in *Streptomyces* and other high GC Gram-positive bacteria. *14 th Forum in Microbiology.* 535 – 541.
45. Postma P., Lenger J. y Jacob G. (1993). Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.* 57: 243-594.
46. Reizer J; Reizer A; y Saier M. H. (1992). A new subfamily of bacterial ABC-type transport systems catalyzing export of drugs and carbohydrates. *Protein Science.* 1: 1326-1332.
47. Reizer J., Bachem S., Reizer A., Arnaud M., Saier M. Jr. y 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.
48. Saier M. H. (1997). Multiple mechanisms controlling carbon metabolism in bacteria. *Biotech. Bioeng.* 58: 170 – 174.
49. Sambrook J., Fritsch E. y Maniatis T. (2000). Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.
50. Segura D., González R., Rodríguez R., Sandoval T., Escalante L. y 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.
51. Seok Y., Koo B., Sondej M. y Peterkofsky A. (2001). Regulation of *E. coli* glycogen phosphorylase activity by HPr. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3(3), 385–393
52. Servin-González L., Jensen M., White J. y Bibb M. (1994). Transcriptional regulation of the four promoters of the agarase gene (*dagA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiol.* 140, 2555-2565.
53. Stülke J y Hillen W. (1999). Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr.Op Microbiol.* 2: 195 – 201.
54. Stülke J. y Hillen W. (2000). Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 849–880.

55. Titgemeyer F. y Hillen W. (2002). Global control of sugar metabolism: a Gram-positive solution. *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 59 – 71.
56. Titgemeyer F., Walkenhorst J., Reizer J., Stuiver M., Cui X. & Saier M. Jr, (1995). Identification and characterization of phosphoenol-pyruvate: fructose phosphotransferase systems in three *Streptomyces* species. *Microbiology*. 141, 51-58.
57. 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.
58. Ueda K; Matsuda K; Takano H; Beppu T. (1999). A putative regulatory element for carbon-source-dependent differentiation in *Streptomyces griseus*. *Microbiology* 145: 2265 – 2271.
59. Vandamme E. (1984). *Biotechnology of industrial antibiotics*. Vol. 22. *Marcel Dekker Inc.* New York.
60. Vicente M; Chater K. F. y de Lorenzo V. (1999). Bacterial transcription factors involved in global regulation. *Molecular Microbiology* 33(1):8 – 17.
61. Volff J-N; Altenbuchner J. (2000). A new beginning with new ends: Linearisation of circular chromosomes during bacterial evolution. *FEMS Microbiology Letters* 186:143 – 150.
62. Wang F ; Xiao X ; Saito A; Schrepf H. (2002). *Streptomyces olivaceoviridis* possesses a phosphotransferase system that mediates specific, phosphoenolpyruvate-dependent uptake of N-acetylglucosamine. *Molecular Genetic and Genomics* 268: 344 – 351.
63. Wezel G, Mahr K., Köning M., Traag B. y Pimentel-Schmitt E. (2005). GlcP constitutes the major glucose uptake system of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol.*
64. Wezel G., König, M., Mahr K., Nothaft H., Thomae A., Bibb M. y Titgemeyer F. (2007). A new piece of an old jigsaw: glucose kinase is activated posttranslationally in a glucose transport-dependent manner in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Mol. Microbiol Biotechnol.* 12:67–74.
65. Wolff J. MacGregor R., Eisenberg R. y Phibbs Jr. (1991). Isolation and characterization of catabolite repression control mutants of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *J. Bac.* 173(15), 4700-4706.
66. Yang C., Huang C., Li C., Tsay Y., Lee S. y 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.