



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Clonación de un gen de *Streptomyces peucetius*
var. *caesius*, involucrado en el transporte de
azúcares, utilizando los oligonucleótidos
diseñados con base en la secuencia *glcP1* de
Streptomyces coelicolor

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGO

P R E S E N T A:

GEORGINA YOALHY RAMÍREZ VILLALOBOS

TUTOR: DR. SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL



México, D. F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**Con admiración
A todos los hombres
comprometidos
consigo mismos, conscientes de
su
naturaleza, situación y potencial,
en búsqueda continua de nuevos
retos y excelencia, que les
permitan sentirse satisfechos en
las
diferentes etapas y actividades
de su vida.**

RECONOCIMIENTOS

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

Se reconoce al jurado de examen profesional por la revisión y comentarios a este trabajo, el cual está conformado por:

Presidenta	Dra. Silvia Guzmán Beltrán	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
Vocal	Biól, Laura Angélica Escalante Dávila	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Secretario	Dr. Sergio Sánchez Esquivel	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Suplente	M. en Microbiología. Adán Chávez Castillo	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Suplente	Ing. Quim. Ángela Forero Forero	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Al Dr. Sergio Sánchez Esquivel, por darme la oportunidad de ingresar al laboratorio de Microbiología Industrial y desarrollar este proyecto; por escucharme y ayudarme siempre, lo admiro por ser una excelente persona.

A la Dra. Silvia Guzmán Beltrán, por el gran apoyo brindado para el desarrollo de esta tesis.

A la Biol. Laura Escalante Dávila, del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, por su colaboración técnica durante la realización de este proyecto.

A la Dra. Gloria Soberón, por el apoyo brindado con equipo.

Este trabajo fue apoyado en parte por el donativo 46469-Z del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México.

Agradecimientos

Este trabajo está dedicado a una persona muy especial en mi vida, que me enseñó que la vida es una lucha imparabable por conseguir lo deseado y que cada persona es capaz de lograr lo que se proponga, siempre y cuando se esfuerce día a día hasta obtenerlo. A ti papá, que aunque ya no estás conmigo y ya no puedo verte día a día, tu sigues presente en mi vida, porque cada día recuerdo tus palabras diciéndome "yo soy la inteligencia", por que gracias a tu apoyo y a tu constante estímulo hoy pude lograr este pequeño, pero a la vez gran paso en mi vida. Gracias a ti, por enseñarme que el amor a los tuyos es tan grande que te hizo alejarte de nosotros; por enseñarme a valorar lo que tengo, porque cuando uno lo tiene todo no se da cuenta de lo afortunado que es; sin embargo, hoy ya no te tengo, ya no puedes verme ni yo a ti, pero sé que algún día nos volveremos a encontrar. Gracias a tu ejemplo, hoy mantengo las fuerzas para seguir adelante, de seguir estudiando y ser una persona de éxito.

Gracias papá por todo tu apoyo, amor, enseñanzas y por creer en mi siempre; tu partida dejó una herida muy grande en mi corazón, que nunca logrará cerrar por completo; pero el tiempo y Dios me han enseñado a vivir sin ti. Aunque te fuiste, sigues presente en mi corazón, en mi mente y en mis oraciones día con día. Que Dios te bendiga papá, desde donde quiera que estés.

Gracias a mi otro gran apoyo, a mi mamá que aunque a veces nos enojamos, aquí seguimos juntas en el camino. Gracias por preocuparte por mí, por todo tu amor, por esforzarte día a día para que nunca me hiciera falta algo, gracias por creer en mí, por toda tu confianza, por tus consejos y por enseñarme a ser una persona de valores. Y aunque a veces soy poco expresiva, nunca olvides que te amo y que te necesito conmigo siempre.

A la Hormiga, gracias por estar conmigo en los momentos más difíciles de mi vida, por todas esas cosas que haces por mi y por mi familia; pero sobretodo por hacer más feliz mi vida. Tu me enseñaste a observar mis virtudes, el amor sincero y la amistad desinteresada; gracias por todo tu amor, enseñanzas y por todos esos momentos tan divertidos que hemos pasado juntos. Gracias por levantarme siempre que he tropezado y ayudarme a seguir adelante; por estar allí siempre que te necesito; y por tantas cosas que tu sabes. Te amo.

Lau, en buena onda, necesitas ayuda especializada para controlar esas violencias que no te van a dejar nada bueno. Gracias por tu apoyo, por regalarme mi primera computadora, justo en el momento en que más la necesitaba, gracias por darme a Wendy, por divertirme cuando era pequeña y por todas esas cosas que has hecho por mí. Recuerda que nunca es demasiado tarde para poder hacer aquello que en algún tiempo dejaste pendiente o que deseabas hacer; más que tiempo, lo que necesitas son ganas para poder lograr lo que te propongas. Gracias por estar siempre al pie del cañón con mi mamá y conmigo; nunca olvides que siempre vas a contar con nosotras.

Lolis, gracias por todo tu apoyo, por cuidarme cuando era pequeña, por jugar conmigo y por enseñarme que cuando tienes un propósito debes

colocarlo entre ceja y ceja hasta conseguirlo; así me lo dijiste. Gracias por enseñarme con tu ejemplo que la paciencia es una gran virtud en una persona. Ya no seas tan codinche, a fin de cuentas el \$\$ va y viene.

Liz, hoy me doy cuenta que tenías razón, todo esfuerzo tiene su recompensa, gracias por apoyarnos en lo momento difíciles, por esas super vacaciones decembrinas que año con año nos invitas y por el cachorro; en verdad que me hiciste muy feliz. Y ya no seas tan gritona, recuerda que también el ruido contamina.

Cheli, gracias por recordarme que en los momentos de tragedia no debemos de olvidarnos de Dios. Después de todos los problemas que tuvimos cuando viniste a vivir con nosotros, me enseñaste que debo ser tolerante y perdonar de corazón. Gracias por aguantar mis bromas pesadas, por escuchar mis traumas, por conseguir los boletos en el Auditorio y por tantas cosas. Hoy solo te puedo desear éxito y lo mejor en tu nueva vida de casada junto a tus bebés.

Tengo un sobrino adicto al videojuego, adicto, adicto, al videojuego! Gracias Toñito, porque tu mudanza con nosotras me hizo ser más feliz y saber que siempre hay alguien que espera por ti. Gracias por todas las risas que me haces pasar y te prometo que trataré de ya no hacer bilis. Recuerda que eres un niño muy inteligente, no te dejes vencer, yo sé que tú puedes, así que échale todas las ganas a la escuela; sabes de antemano que cuentas con Jorge y conmigo para lo que sea.

A mis sobrinas Monse, Vero y Gloria por todos esos buenos momentos. A los chiquitos, Itzani, Diego, Aaron, Mateo, Coques y Richie; por que sus ocurrencias me arrancan más de una carcajada y sus travesuras más de un enojo.

Coques y Richie, me da un orgullo muy grande saber que son niños de excelencia académica, recuerden que siempre van a contar conmigo. Muchas gracias por todo su cariño y amor; los amo mucho.

A mis cuñados; Toño, gracias por todo tu apoyo en los momentos más difíciles; Humbert, esa incomodidad no te deja; Alex, aún me acuerdo cuando salíamos a jugar y nos divertíamos en grande; y Raúl, todavía me acuerdo de cheetos.

A Carlos, Manuel, Pepe, y todos los Emiliano, gracias por su apoyo. A ti Manuel, por recordarme el compromiso pendiente que tenía con mi papá; finalmente, salgo de eso.

A los verdaderos amigos, tan difíciles de encontrar, como una aguja en un pajar:

A mi hada Silvia, muchas gracias por todos tus consejos y tu apoyo incondicional siempre. Si no fuera por ti, yo creo que aún seguiría aislando RNA. Gracias por todas esas risas compartidas, te admiro mucho.

A Lauris, por ser una gran persona, por escucharme y por tu ayuda en todo momento; eres un ejemplo a seguir, una gran mujer trabajadora que se

esfuerzo día a día. Gracias por toda tu sabiduría que siempre compartes conmigo.

Mariana, gracias por ser parte de este logro y por apoyarme a lo largo de la carrera. Gracias por todas las cosas divertidas que hemos vivido. Eres una gran amiga y persona; te quiero y te admiro mucho por ser como eres.

Alfredo, muchas gracias por todos tus consejos y sugerencias no solo en el laboratorio.

Samuel, gracias por todas esas cosas divertidas que hemos pasado, por seguir presente en mi vida y por tu amistad.

Gracias a todos los miembros del laboratorio por sus consejos y apoyo durante mi estancia en éste; así como a toda la gente de Biomédicas que nunca se negó a darme su apoyo durante la realización de este proyecto: Dr. Sergio Sánchez, Lalo, Adán, Forero, Caty, Alfredo, Hugo, Jesús, Mauricio, Oliver, Paola, Ricardo, Sara, Susana, Tania, Yolis, Dra. Gloria Soberón, Dra. Ma Elena Flores y MAO.

Pero sobre todo, gracias a Dios por concederme el milagro de vivir, de tener una gran familia junto a mí y por darme el consuelo y la resignación en los momentos difíciles.

Clonación de un gen de *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, involucrado en el transporte de azúcares, utilizando los oligonucleótidos diseñados con base en la secuencia glcP1 de *Streptomyces coelicolor*

1.	RESUMEN.....	8
2.	ABREVIATURAS.....	9
3.	ANTECEDENTES.....	9
3.1.	Características generales de <i>Streptomyces</i>.....	10
3.1.1.	Ciclo de vida.....	10
3.1.2.	Genética.....	11
3.1.3.	Ecología.....	12
3.1.4.	Importancia económica.....	12
3.2.	<i>Streptomyces peucetius</i> var. <i>Caesius</i>.....	13
3.3.	Transporte en bacterias.....	14
3.3.1.	Transporte Activo.....	14
3.3.1.1	Translocación de grupo.....	15
.		
3.3.1.2	Sistema ABC.....	16
.		
3.3.2.	Sistemas de transporte de carbohidratos en <i>Streptomyces</i>	16
3.3.2.1	Transporte de Glucosa.....	17
.		
3.4.	Represión catabólica por carbono en <i>Escherichia coli</i>.....	19
3.5.	Represión catabólica por carbono en bacterias Gram-positivas de bajo contenido de G-C.....	20
3.6.	Represión catabólica por carbono en el género <i>Streptomyces</i>.....	21
4.	JUSTIFICACIÓN.....	24
5.	HIPÓTESIS.....	24
6.	OBJETIVO GENERAL.....	24
6.1	Objetivos Particulares.....	24
7.	METODOLOGÍA.....	25
7.1.	Cepas bacterianas.....	25
7.2.	Aislamiento de DNA genómico de <i>Streptomyces</i>.....	25
7.3.	Amplificación del gen glcP1 de <i>S. coelicolor</i> M145 y su homólogo en <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i> por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	26
7.4.	Clonación de los fragmentos de PCR obtenidos en el plásmido pGEM-T easy.....	28
7.5.	Preparación de células electro competentes.....	30
7.6.	Transformación.....	30
7.7.	Extracción del plásmido.....	31
7.8.	Análisis del inserto por restricción.....	32
8.	RESULTADOS.....	33

8.1.	Purificación del DNA genómico de <i>Streptomyces peucetius</i> var. <i>caesius</i> y <i>Streptomyces coelicolor</i>.....	33
8.2.	Amplificación del gen de interés de <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i> mediante la reacción en cadena de la polimerasa.....	33
8.3.	Purificación del fragmento.....	33
8.4.	Clonación de <i>glcP1</i> de <i>Streptomyces</i> en el plásmido pGEM®- T Easy Vector.....	35
8.5.	Análisis teórico de la secuencia.....	35
9.	DISCUSIÓN.....	41
10.	CONCLUSIONES.....	42
11.	PERSPECTIVAS.....	42
12.	REFERENCIAS.....	43

1. RESUMEN

Streptomyces tiene la capacidad de utilizar un sinnúmero de polisacáridos presentes en la materia orgánica, inclusive se ha demostrado que poseen múltiples mecanismos de incorporación de carbohidratos. Sin embargo, la presencia de fuentes de carbono fácilmente metabolizables como la glucosa, evitan la expresión de genes involucrados en la utilización de otros carbohidratos, así como la síntesis de diversos metabolitos secundarios. Cabe resaltar que el metabolismo de glucosa o cualquier fuente de carbono represora se inicia con su incorporación a la célula, lo que genera un aumento en los niveles intracelulares de este azúcar. Posteriormente se observa un incremento significativo de los intermediarios metabólicos derivados de su catabolismo, los cuales son elementos claves para generar la represión catabólica y con ello cambio en la función celular general. Por tal motivo, se sugiere que el transporte de glucosa puede ser un paso determinante para el destino celular de la misma y por ello se justifica su caracterización bioquímica y molecular. Para ello se llevó a cabo la amplificación por PCR y la clonación del producto generado en el plásmido pGEM-T-Easy en *Escherichia coli*. Posteriormente, se realizó la secuenciación y su análisis teórico. Los resultados sugieren que el inserto clonado podría codificar para una proteína de transporte de azúcares de 515 residuos de aminoácidos, un PM de 54.7 kDa y con punto isoeléctrico teórico de 9.00. Cabe resaltar que esta proteína es conservada en el género *Streptomyces*, ya que se encontraron secuencias homólogas en *Streptomyces coelicolor* (SCO2889) y *Streptomyces avermitilis* (SCO5186).

2. ABREVIATURAS

ABC	Proteínas de unión a ATP
ADP	Difosfato de adenosina
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
ATP	Trifosfato de adenosina
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
NADP	Nicotin adenin dinucleótido fosfato
ONPG	<i>o</i> -nitrofenil- β -galactopiranosido
<i>oriC</i>	Origen de replicación
PEP	Fosfoenol piruvato
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
Vol	Volumen

3. ANTECEDENTES

3.1. Características generales de *Streptomyces*

Este género está constituido por bacterias Gram-positivas con alto contenido de G-C. Además este grupo es de gran interés biotecnológico, ya que produce una gran gama de compuestos bioactivos de interés en la medicina (Hodgson, 2000).



Figura 1. Colonias de *S. coelicolor* (foto izquierda) y micelio aéreo septado de *S. peucetius* (foto derecha). (Tomada de <http://template.bio.warwick.ac.uk/staff/dhodgson/strep/coelicolor.gif>).

3.1.1. Ciclo de vida

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



Figura 2. Ciclo de vida de *Streptomyces*.

3.1.2. Genética

A diferencia de otras bacterias, este género posee un cromosoma lineal (Lin *et al.*, 1993). La región central es flanqueada por dos brazos, los cuales están sujetos a intensa variabilidad genética.

La región central del cromosoma (aprox. 6.5 Mb) está altamente conservada en diversas especies de *Streptomyces*. Además, se ha demostrado que los genes que están localizados en esta región son esenciales para la vida de la bacteria (Ikeda *et al.*, 2003).

El tamaño promedio del cromosoma de *Streptomyces* es de aproximadamente 9.0 Mb. Las fracciones terminales son secuencias invertidas repetidas (TIR) o regiones teloméricas. Las regiones TIR son variables en secuencia y tamaño, que van del rango de 20 a 500 kb. Además, están protegidas por proteínas terminales (TPs), las cuales se encuentran covalentemente unidas a las regiones TIR (Yang *et al.*, 2002).

En el centro del cromosoma de *Streptomyces*, se localiza el origen de replicación (*oriC*), indicando que el proceso de replicación es bidireccional hacia la región telomérica. Los extremos de la molécula están unidos por proteínas de unión a DNA (Huang *et al.*, 1998). Cabe resaltar que

recientemente se determinó la secuencia del genoma de *S. peucetius* ATCC27952 y aunque la información no está aún disponible, se sabe que es de 8.7 Mb (Parajuli *et al.*, 2004).

3.1.3. Ecología

El género *Streptomyces* está ampliamente distribuido en ambientes terrestres y acuáticos. Sin embargo, es más abundante en el suelo. Este grupo bacteriano participa activamente en el reciclaje del carbono, degradando la materia orgánica derivada de plantas y animales, ya que producen diversas enzimas extracelulares que actúan sobre polímeros insolubles como el almidón, xilano, celulosa, quitina, etc., para generar productos solubles que pueden ser absorbidos y utilizados para su desarrollo (Hodgson, 2000).

A pesar de que la mayoría son saprofitos estrictos, existen algunas asociaciones parásitas con animales y plantas. Por ejemplo *Streptomyces somaliensis* ha sido asociado con actinomicetomas de animales. *Streptomyces scabies* es patógeno de plantas, causa descamaciones de la raíz debido a que penetra en la superficie y causa proliferación verrugosa en la dermis (Hodgson, 2000).

Este género también forma simbiosis con otras plantas por su capacidad de crecer ampliamente en la rizosfera, puede proteger las raíces de diversas plantas del ataque de hongos, ya que puede inhibir su crecimiento por la producción de antifúngicos, contribuyendo al control de hongos patógenos (Murray *et al.*, 1985).

3.1.4. Importancia económica

Los estreptomicetos son productores de una gran variedad de compuestos bioactivos útiles en la industria. Este género produce diversas enzimas extracelulares como: celulasas, xilanasas, pectinasas, amilasas, etc. Además producen una gran gama de metabolitos secundarios con actividad antibiótica como: cloranfenicol producido por *Streptomyces venezuelae*; estreptomycin producido por *Streptomyces griseus*; así como inhibidores de β -lactamasas, como el ácido clavulánico producido por *Streptomyces*

achromogenes var. *streptozoticus*. Herbicidas como bialafos, producido por *Streptomyces hygroscopicus*. Agentes inmunosupresores como Fk506 producido por *Streptomyces tsukabiensis*. Antiparásitarios como avermectina producida por *Streptomyces avermitilis* y compuestos con actividad anticancerígena como daunorrubicina (DNR) y doxorrubicina (DXR) producida por *Streptomyces peucetius* y *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, respectivamente (Hodgson, 2000).

3.2. *Streptomyces peucetius* var. *caesius*

S. peucetius var. *caesius* fue obtenido por tratamiento mutagénico (Arcamone *et al.*, 1969) a partir de *S. peucetius*. Como ya se ha mencionado, esta mutante produce DXR (C₂₇H₂₉NO₁₁.HCl) un antibiótico policétido del grupo de las antraciclinas, cuyo peso molecular es de 579.99 g/mol. Este antibiótico tiene actividad contra diversos tipos de cáncer como el de mama, ovario, estómago, tiroides, sarcoma de Kaposi, leucemia y linfomas (Vandamme, 1984; Grein, 1987; Hershberger *et al.*, 1989).

El mecanismo de acción de la DXR es por medio de la unión al DNA de cadena doble, esto evita la síntesis de DNA y RNA (Di Marco *et al.*, 1975). También se ha reportado que induce rompimientos en los ácidos nucleicos e inhibe a la topoisomerasa II (Simpkins *et al.*, 1984; White & Strohane, 1984). Se ha propuesto la existencia de un mecanismo adicional, ya que este compuesto es citotóxico para las células de leucemia sin necesidad de entrar a éstas (Tritton & Yee, 1982).

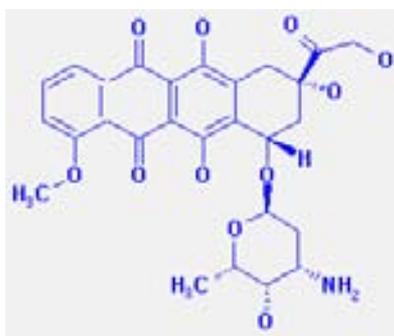


Figura 3. Estructura química de la Doxorrubicina (DXR); (Tomada de <http://www.chem-online.org/generic-pharmaceutical/doxorubicin.htm>).

En *S. peucetius* var. *caesius*, la producción de este anticancerígeno se lleva a cabo en presencia de diversas fuentes de carbono como: glucosa,

manosa, celobiosa, lactosa, fructosa, maltosa y almidón; siendo la primera, la más empleada en la producción de antibióticos (Dekleva *et al*, 1985). Sin embargo, la síntesis de DXR, así como la de otros metabolitos secundarios, se encuentra controlada negativamente por glucosa. Se sabe que la detección de los nutrientes y la generación de las señales como estímulo para evitar la síntesis de DXR y otros metabolitos secundarios, está fuertemente ligada a los respectivos sistemas de transporte y a su posterior metabolismo.

3.3. Transporte en bacterias

Las membranas celulares intactas no permiten la difusión pasiva de ciertas moléculas polares, pero son capaces de atravesarlas mediante diversos procesos y se llegan a concentrar 1,000 veces en el interior respecto a la concentración que existe en el exterior, gracias a la acción de las proteínas de transporte de membrana (Madigan *et al*, 2000).

Se han identificado 3 tipos de transportadores; los denominados uniportadores, son proteínas capaces de mover un soluto en un solo sentido a través de la membrana, los otros dos tipos de transportadores mueven sustancias de un lado a otro de la membrana de forma conjunta. Por lo tanto son denominadas co-transportadores; por un lado, los simportadores transportan dos sustancias en la misma dirección y por otro lado, los antiportadores, tienen la capacidad de mover dos solutos en direcciones opuestas (Figura 4).

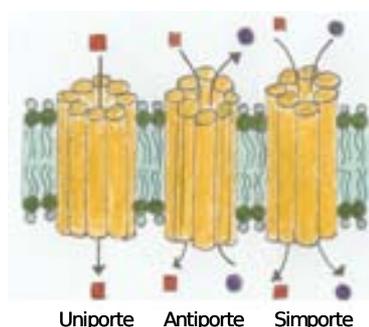


Figura 4. Sistemas de transporte en bacterias (Tomada de Madigan *et. al.*, 2000).

3.3.1. Transporte Activo

Los mecanismos de transporte activo implican consumo de energía, lo que hace posible que las células acumulen solutos en contra del gradiente de

concentración; una característica de los procesos de transporte mediados por proteínas. La energía puede proceder de compuestos fosforilados de alta energía, como la adenosina trifosfato (ATP) o del consumo de un gradiente preexistente de protones o de sodio. Los gradientes de iones se forman mediante reacciones celulares que liberan energía, y pueden usarse como energía potencial que facilita el transporte de solutos en contra de gradientes de concentración.

Se conocen dos tipos de sistemas asociados al consumo de energía; primero, el transporte que depende de ATP, en cual se puede acumular moléculas en altas concentraciones en el interior sin sufrir ninguna modificación química; y segundo, el transporte que al incorporar una molécula, simultáneamente se modifica químicamente, generalmente mediante fosforilación, llamada transporte por translocación de grupo (Madigan *et al.*, 2000).

3.3.1.1. Translocación de grupo

En este tipo de incorporación se genera modificación química del compuesto mientras atraviesa la membrana. Dado que el producto que se encuentra en el interior de la célula es diferente del que se encuentra en el exterior, el transporte del producto genera un gradiente de concentración. El sistema de fosfotransferasa dependiente de fosfoenol piruvato (PTS) en uno de los mecanismos más comunes para transportar carbohidratos simples. Sin embargo, en algunas bacterias se pueden incorporar purinas, pirimidinas y ácidos grasos (Madigan *et al.* 2000).

El PTS además de ser un mecanismo de transporte de nutrientes, es regulador negativo de otros sistemas de incorporación de carbohidratos que no son incorporados vía PTS. Es un complejo multienzimático, constituido por dos fosfotransferasas generales: Enzima I (EI) y HPr (proteína que contiene una histidina transportadora de fosfato) y un grupo de proteínas transportadoras membranales específicas para cada carbohidrato, llamadas Enzimas II (EIIA, EIIB y EIIC). La transferencia de fosfato procede de fosfoenol piruvato (PEP) vía EI, HPr, EIIABC hasta el azúcar (Potsma *et al.*, 1993).

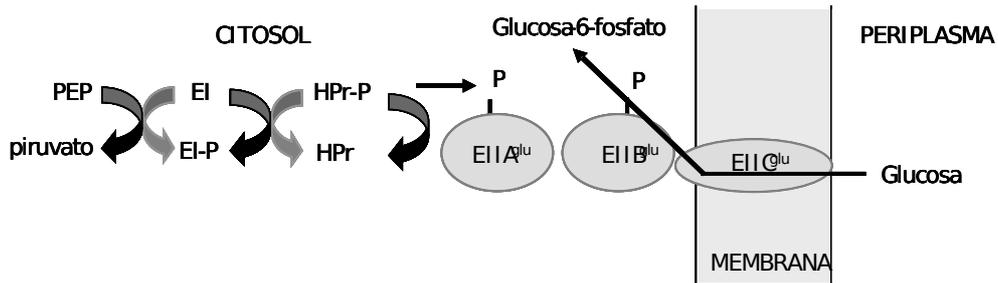


Figura 5. Cadena de fosforilación del sistema PTS, desde el fosfoenol piruvato (PEP) vía EI, HPr, EIIABC hasta la glucosa (Modificado de Potsma *et al.*, 1993).

3.3.1.2. Sistema ABC

Este sistema depende de ATP y la denominación de "transportadores ABC", se debe a que en todos ellos existe una o dos proteínas periféricas, de membrana citoplásmica que poseen un dominio conservado evolutivamente, denominado "casete de unión a ATP" (por sus siglas en inglés *ATP-binding cassette*). Es un sistema de varios componentes, en el que existen proteínas periplásmicas que captan el sustrato con gran afinidad (dominio E) y lo llevan hasta una proteína de membrana, constituida por dos dominios F y G (llamada MT "membranal transporter"), las cuales, acoplan el paso de dicho sustrato hasta el citoplasma con la ayuda del dominio de unión a ATP (constituido por dos subunidades K), el cual activa la hidrólisis de ATP y acopla la energía para el paso de la molécula al citoplasma (Davidson y Maloney, 2007).

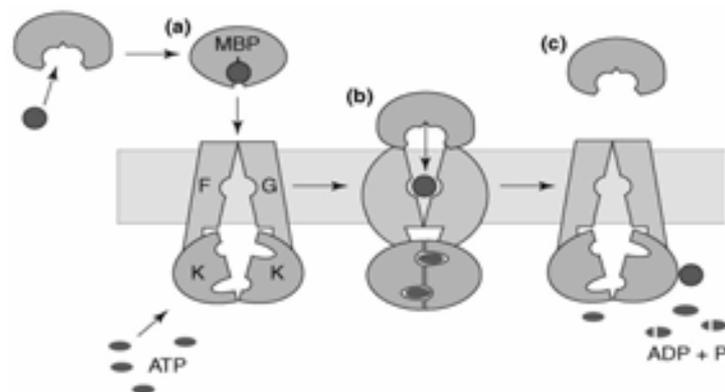


Figura 6. Modelo del sistema ABC. (a) La proteína de unión a maitosa (MBP) acarrea el azúcar hacia el dominio transmembranal (TM) constituido por F y G. (b) Posteriormente hay una Interacción de MBP, TM y el dominio de unión a ATP, formado por subunidades llamadas K (ATP casete). ...sta ultima estabiliza el cambio conformacional en todo el sistema

transportador, lo que activa la hidrólisis de ATP y la incorporación simultánea del carbohidrato. (c) Finalmente MBP, TM y el dominio de unión a ATP se liberan. Figura tomada de (Davidson y Maloney, 2007).

3.3.2. Sistemas de transporte de carbohidratos en *Streptomyces*

En *S. coelicolor* recientemente se realizó un análisis *in silico*, en el cual, se predijo la existencia de diversos mecanismos para la incorporación de carbohidratos como: el PTS, los sistemas de transporte ABC, el simporte y el transporte facilitado. Esta gran diversidad de mecanismos para la incorporación de carbohidratos refleja la capacidad tan alta de los estreptomicetos para utilizar un sinnúmero de polisacáridos presentes en la materia orgánica (Bertram *et al.*, 2004). El PTS permite la incorporación de fructosa y N-acetil-glucosamina. El ABC incorpora maltodextrinas, xilósidos, glucósidos, quitobiosa, lactosa, ribosa, etc. El transporte facilitado es empleado para la incorporación de galactosa y glicerol; y el simporte para glucosa. En la figura 7 se esquematiza los sistemas antes descritos (Bertram *et al.*, 2004).

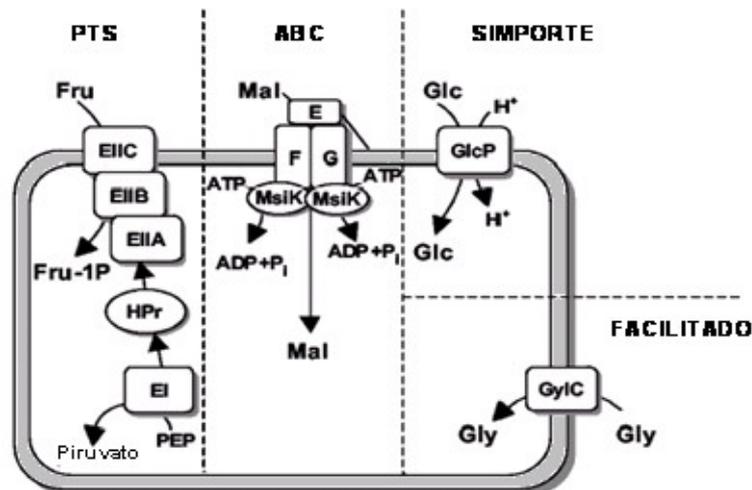


Figura 7. Esquema de los sistemas representativos de incorporación de carbohidratos en *S. coelicolor*. PTS para fructosa (Fru), ABC para maltosa (Mal), Simporte para glucosa (Glc) y difusión facilitada para glicerol (Gly). Abreviaturas: E, MalE; F, MalF; G, MalG; EIIA, enzima IIA; EIIB, enzima IIB; EIIC, enzima IIC; PEP, fosfoenol piruvato (Tomada de Bertram *et al.*, 2004).

3.3.2.1. Transporte de Glucosa

La glucosa es la fuente de carbono más fácilmente metabolizable en *Streptomyces* y su presencia es capaz de evitar la expresión de genes involucrados en el transporte de otros carbohidratos, así como la síntesis de diversos metabolitos secundarios de interés industrial. Por ello, la incorporación de este azúcar y su posterior metabolismo han sido estudiados exhaustivamente. Al respecto se ha demostrado que su transporte es inducido por glucosa (Ramos *et al.*, 2004; Bertram *et al.*, 2004; Guzmán *et al.*, 2005).

En estudios "teóricos" se ha detectado que el sistema de incorporación está codificado por los genes *glcP1* (SCO5578) y *glcP2* (SCO7153). Ambos genes presentan un 99% de identidad y codifican un producto idéntico (Wezel *et al.*, 2005). El gen *glcP1* se localiza en la parte central del genoma; mientras que el gen *glcP2* se localiza en el brazo derecho, lo que corresponde a la región variable, aparentemente este último se originó por duplicación del gen *glcP1*. Cabe mencionar que en *S. avermitilis* existe un gen homólogo a *glcP1* (SAV2657) con 68% de identidad en la secuencia de aminoácidos.

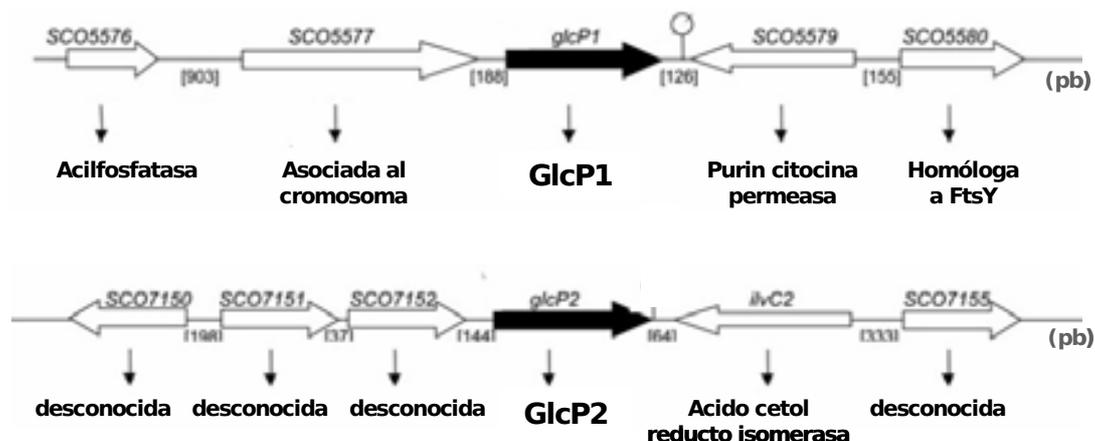


Figura 8. Mapa de la organización genética de *glcP1* y *glcP2* ubicados en el cósmido SC7A1 y SC9A4, respectivamente (Tomada de Wezel *et al.*, 2005).

Como se muestra en la figura anterior, ambos genes *glcP* no están relacionados metabólicamente con los genes adyacentes. Cabe mencionar que *glcP1* está flanqueado por un gen que codifica para una proteína que se asocia al DNA (SCO5577) y una permeasa de purinas (SCO5579). Por otro lado, río arriba de *glcP2* se localizan dos proteínas hipotéticas con función desconocida y río abajo se encuentra una isomerasa (*ilvC2*). Mientras que

río arriba de *glcP2* se localizan dos proteínas hipotéticas con función desconocida y río abajo se encuentra una isomerasa (*ilvC2*, SCO7154).

Por otro lado, se ha demostrado que GlcP pertenece a la superfamilia de permeasas MSF (Major Facilitator Superfamily). Recientemente se demostró que es un transportador de alta afinidad para glucosa, el cual es indispensable para mantener un crecimiento óptimo; ya que mutaciones en ambos genes, generan una disminución significativa en el transporte de glucosa, fenotipo que a su vez sugiere un sistema alternativo (Wezel *et al.*, 2005).

Además, se llevó a cabo la expresión heteróloga de *glcP* en *E. coli*, donde se sugiere que es una proteína simportadora dependiente de H⁺. En análisis de hidrofobicidad se predijo que la topología consta de seis segmentos transmembranales interrumpidos por un segmento citoplásmico largo. Estos datos concuerdan con la clasificación de GlcP como miembro de la familia MFS. En este mismo estudio, se demostró que GlcP es capaz de transportar a 2-desoxiglucosa, un análogo de la glucosa no metabolizable, pero que es incapaz de transportar fructosa, lo que lo hace un sistema específico para glucosa (Wezel *et al.*, 2005).

Se ha mencionado anteriormente que la glucosa es esencial para sostener una tasa de crecimiento alto; por ello, se ha sugerido que esta bacteria posee más de un mecanismo para incorporar este azúcar. Con relación a esto, se ha demostrado la presencia de un sistema de transporte de baja afinidad en *S. coelicolor* y *S. violaceoruber* (Sabater y Asensio 1972; Hodgson, 1982, Wezel *et al.*, 2005). Por ejemplo, en *S. lividans* también se ha demostrado la presencia de un sistema de alta y otro de baja afinidad como en *S. coelicolor*; mientras que *S. clavuligerus* posee un sistema de transporte de azúcares generalizado, el cual depende de la fuerza protón motriz (García-Domínguez *et al.*, 1989).

3.4. Represión catabólica por carbono en Escherichia coli.

La enzima EIIA del PTS tiene un papel central en la regulación por fuente de carbono, ya que transmite señales vía fosforilación a varios blancos celulares. Durante el transporte de azúcares mediado por el PTS, el grupo

fosfato es transferido del PEP hasta el azúcar. Cuando otras fuentes de carbono son importadas, la EIIA^{Glu} esta en su forma no fosforilada. Inclusive, se ha demostrado que durante el crecimiento de *E. coli* en lactosa o glucosa 6-fosfato, cambia el estado de fosforilación de EIIA^{Glu}; probablemente controlado por la relación PEP/Piruvato. Los niveles de EIIA^{Glu}/EIIA^{Glu}-P reflejan el estado fisiológico de la célula y permiten transmitir las señales de control global (Titgemeyer y Hillen, 2002).

La enzima EIIA^{Glu} en su forma fosforilada es capaz de estimular a la adenilato ciclasa (Cya), produciendo adenina monofosfato cíclico (AMPC), el cual es requerido por la proteína de control catabólico (CAP) para formar un complejo (CAP-AMPC) y así, activar genes sensibles a regulación (Titgemeyer y Hillen, 2002). Por otro lado, EIIA^{Glu} no fosforilada es capaz de bloquear permeasas específicas para incorporar lactosa, maltosa, melibiosa y rafinosa, evitando la formación de los inductores y también la activación de los genes necesarios para su utilización. Además, inhibe alostéricamente varias proteínas citoplásmicas como la glicerol cinasa; previniendo la formación del inductor (glicerol-3-fosfato) (Titgemeyer y Hillen, 2002).

Dentro de los elementos que se conocen que están involucrados en la regulación por carbono, se encuentra la proteína HPr; la cual regula a la glucógeno fosforilasa, coordinando el consumo o almacenaje de glucosa (Seok *et al.*, 2001). La enzima EI-PTS no fosforilada evita la activación de la proteína quimiotáctica CheA, al prevenir su fosforilación. Así, controla negativamente la respuesta quimiotáctica para el movimiento del flagelo (Lux *et al.*, 1995).

3.5 Represión catabólica por carbono en bacterias Gram-positivas de bajo contenido de G-C.

En estas bacterias, las enzimas HPr, la HPr cinasa/fosfatasa (HPrK/P) y la enzima de control catabólico (CcpA), son las que censan el estado fisiológico de la célula y regulan el metabolismo general. En presencia de la fuente de carbono represora, la HPr es fosforilada en un sitio de regulación específico (serina 46) exclusivamente por HPrK/P. El balance entre HPr-his-P y HPr-ser-P se determina por el sistema PTS dependiente de PEP, el cual, produce HPr-

his-P, que es necesaria para mediar el transporte de diversas fuentes de carbono (Reizer *et al.*, 1999; Bolotin *et al.*, 2001; Hoskins *et al.*, 2001).

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

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

Otra enzima que tiene un papel esencial en la regulación global es la CcpA, ya que tiene actividad de represor/activador. La activación de CcpA requiere su unión al correpresor HPr-ser-P; juntos se unen al operador *cre* (elementos de respuesta catabólica) de genes sensibles a regulación por carbono. La enzima EI-PTS también participa en la RCC, en presencia de glucosa regula negativamente las señales quimiotácticas por interacción de EI-P con CheA (Brückner y Titgemeyer, 2002).

3.6. Represión catabólica por carbono en el género *Streptomyces*

La regulación catabólica por fuente de carbono, controla el metabolismo primario; como la expresión de los genes necesarios para la utilización de fuentes de carbono complejas (almidón, celulosa, etc.); así como el

metabolismo secundario, tal como la síntesis de antibióticos, pigmentos etc. (Hodgson, 2000). Cabe resaltar que en este género se ha identificado el sistema PTS en tres especies de *Streptomyces*. Sin embargo, este sistema no está involucrado en la RC por glucosa (Sabater *et al.*, 1972; Novotná y Hostálek, 1985; Titgemeyer *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2002). Además, no se ha detectado actividad de cinasa/fosfatasa (HPrK/P), como ocurre en *B. subtilis* (Gersh *et al.*, 1980; Chatterjee y Vining, 1982). Estos resultados sugieren que el mecanismo de RCC es radicalmente diferente al que existe en *E. coli* y en otras bacterias Gram positivas de bajo contenido de G-C (Postma *et al.*, 1993; Postma *et al.*, 1996).

Por otro lado, en *Streptomyces* se ha sugerido que la detección de los nutrientes y la generación de las señales, como estímulo para producir la RCC, está fuertemente ligada a los respectivos sistemas de transporte y a su posterior activación por fosforilación, vía glucosa cinasa (Glc). En *S. coelicolor* y *S. peucetius* var. *caesius* se ha propuesto que la Glc tiene una función regulatoria, además de su capacidad catalítica, en la RCC; ya que mutantes insensibles a regulación por carbono (RCC⁻) muestran fenotipo Glu⁻ y Glc⁻; pero al complementarlas con el gen que codifica para Glc (*glcA*), se recupera el fenotipo silvestre (Ikeda *et al.*, 1984; Kwakman & Postma, 1994; Angell *et al.*, 1992; 1994). Además, estas mutantes aún presentan insensibilidad a RC en presencia de fuentes de carbono represoras diferentes a la glucosa como: fructosa, arabinosa, etc., (Angell *et al.*, 1994; Segura *et al.*, 1996).

Es importante mencionar que existen otros elementos que participan en la RC por glucosa. Ingram *et al.*, (1995) aislaron y caracterizaron una mutante de *S. coelicolor*, *ccrA1*, la cual afecta la expresión de varios operones regulados por glucosa como *galP1* (galactosa), *gyl* (glicerol) y *chi63* (quitina). Fenotípicamente, la mutante *ccrA1*⁻, es capaz de utilizar glucosa como única fuente de carbono y es sensible a DOG. También se observó que esta cepa muestra desregulación en la expresión de *galP1* y *gyl*, ya que aumenta aproximadamente de 4 a 5 veces en forma constitutiva. Además, la expresión de *chi63* es muy baja en la cepa silvestre, sin embargo en presencia de la mutación *ccrA1* aumentó considerablemente, aunque *chi63* aún está sujeta a RCC. Estos resultados sugieren que la mutación *ccrA1* es

pleiotrópica, ya que afecta un gen cuyo producto puede estar involucrado en el mecanismo general de regulación por carbono en *S. coelicolor* (Ingram y Westpheling, 1995).

Otras mutantes de *S. coelicolor* incapaces de producir hifas aéreas, son conocidas como *bld* (calvas del inglés "bald"), en las cuales se han reportado al menos 10 genes (*bldA*, *bldB*, *bldC*, *bldD*, *bldF*, *bldG*, *bldH*, *bldI*, *bldK* y *bld261*). Además, algunas mutantes *bld* también pierden la capacidad de producir antibióticos y sensibilidad a RCC (Champness, 1988; Pope *et al.*, 1996).

También se ha reportado que en *Streptomyces*, existen elementos *trans* que participan directamente en la RCC como MalR de *S. coelicolor* A3(2); la cual, codifica para una proteína represora homóloga a la familia LacI/GalR. La transcripción de *malE* (gen requerido para la utilización de maltosa) es inducida por maltosa y reprimida por glucosa. La interrupción o delección del gen *malR*, provoca una expresión constitutiva e insensibilidad a glucosa de *malE* (Wezel *et al.*, 1997). La proteína MalR parece ser un regulador de la inducción por sustrato y de la represión por glucosa en el metabolismo de la maltosa (Wezel *et al.*, 1997). GylR es un represor transcripcional del operón *gyl* (para la utilización de glicerol) el cual, esta sujeto a RC. GylR contiene sitios de unión a DNA y tiene similitud con represores transcripcionales. Cabe mencionar que otras mutaciones como *glkA*, *ccrA1* y *bld* afectan la RC del operón *gyl*. Al parecer, la regulación de dicho operón requiere de diversos reguladores tanto específicos como generales (Hindle y Smith, 1994).

Recientemente, se ha reportado que en *S. coelicolor* y *S. peucetius* var. *caesius*, existe una proteína (codificada por un gen adyacente a *glkA*, llamado SCO2127 por su ubicación en el genoma de *S. coelicolor*) que podría controlar pleiotrópicamente el metabolismo de glucosa (Angell y col., 1994; Guzmán y col. 2005a). Se ha propuesto que dicha proteína en presencia de altas concentraciones de glucosa, estimula la expresión de la Glk y aumenta el transporte de glucosa (Guzmán, 2005). Con base en esto, se propone que en presencia de altas concentraciones de glucosa, esta proteína podría unirse a reguladores transcripcionales, los cuales podrían

estimular positivamente la expresión de la Glk y el transporte de glucosa. De esta manera, aumenta la glucólisis y por ello la presencia de metabolitos intermediarios. Estos últimos pudieran unirse a represores (aporrepresores) formando complejos de regulación, que eviten la expresión de genes sensibles a RCC en *S. peucetius* var. *caesius*, tal como sucede en *Bacillus* (Jault *et al.*, 2000).

4. JUSTIFICACIÓN

S. peucetius var. *caesius* es una bacteria de interés industrial; ya que produce doxorubicina, un anticancerígeno, el cual está regulado negativamente por glucosa. Por ello, es de vital importancia conocer el mecanismo de incorporación de glucosa así como su papel en la represión catabólica ejercido por dicha azúcar. Por ello, creemos que al clonar el sistema de transporte nos permitirá caracterizar dicho sistema, así como establecer claramente su papel en la RCC.

Por otro lado, sugerimos que *S. peucetius* var. *caesius*, al estar emparentado genéticamente con *S. coelicolor* y tener un metabolismo de glucosa y sistema de regulación similar, proponemos la clonación del gen homólogo de GlcP para secuenciarlo y compararlo con el gen de *S. coelicolor*.

5. HIPÓTESIS

Dado que *S. coelicolor* y *S. peucetius* var. *caesius* son microorganismos emparentados genéticamente, se espera que en *S. peucetius* var. *caesius*, exista un homólogo a glcP de *S. coelicolor* y por ello, que sea posible su amplificación utilizando como base la secuencia de *S. coelicolor*.

6. OBJETIVO GENERAL

Determinar si *S. peucetius* var. *caesius* posee el gen homólogo a *glcP1* de *S. coelicolor*.

6.1 Objetivos Particulares

1. Amplificar el gen homólogo a *glcP* de *S. peucetius* var. *caesius*, utilizando oligonucleótidos diseñados con base en la secuencia de *glcP1* de *S. coelicolor*.
2. Clonar el gen *glcP1* de *S. peucetius* var. *caesius* en el plásmido pGEM®- T Easy Vector.

Verificar mediante un análisis *teórico* si la secuencia obtenida corresponde al gen homólogo de *glcP1* en *S. peucetius* var. *caesius*.

7. METODOLOGÍA

7.1 Cepas bacterianas

Las cepas que se utilizaron fueron *S. coelicolor* M145 (Hopwood *et al.*, 1985), *S. peucetius* var. *caesius* NRRL B-5337 (Arcamone *et al.*, 1969) y *E. coli* TOP10 (invitrogen). Estas cepas son mantenidas en la colección de cultivos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM (World Data Center, UNAM-48).

7.2 Aislamiento de DNA genómico de Streptomyces

Se inocularon dos matraces con 25 ml de medio TSB (3 g de triptona de soya comercial, disponible por Oxid No. CM129, en 100 ml de agua destilada) con una asada de *S. peucetius* var. *caesius* y de *S. coelicolor*, respectivamente; y se incubaron a 29° C con agitación durante 48 h. Posteriormente se lavó 2 veces el micelio; para ello, el cultivo se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 min, luego se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 5 ml de solución salina isotónica (0.85%, NaCl) y se repitió el procedimiento. Posteriormente se tomó 1 ml de la suspensión celular y se inocularon dos matraces con 50 ml de medio TSB mas 0.5% de glicina y se dejó incubar a 29° C durante 48 h.

Transcurrido este tiempo, el micelio se lavó dos veces con 20 ml de sacarosa al 10.3% y se resuspendió en 15 ml de amortiguador de fosfatos a pH 7.2 (Sacarosa, 10.3%; K₂SO₄, 0.025%; MgCl₂.6H₂O, 0.202%; 0.2 ml de solución de elementos traza [KH₂PO₄, 0.5%; MgCl₂.6H₂O, 2.5 M; CaCl₂, 0.25 M]) complementado con KH₂ PO₄, 0.05%; CaCl₂.2H₂O, 3.68%; Buffer TES, 5.73% y lisozima 2.0 mg/ml. Se incubó a 37 °C durante 60 min, mezclando por inversión cada 15 min, luego se centrifugó durante 10 min a 8,000 rpm; se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón en 10 ml de sacarosa al 10.3%, 200 µl de EDTA 0.5 M y 1 ml de SDS al 20%; se mezcló hasta que se observó homogéneo y se adicionaron 10 ml de fenol-cloroformo (v/v) y 15 ml de NaCl 5 M. Se mezcló por inversión y se dejó 10 min a temperatura ambiente; se centrifugó durante 12 min a 10,000 rpm y la fase superior fue transferida a un tubo nuevo y se adicionó un volumen de isopropanol. Con ayuda de una pipeta Pasteur se realizó el spooling del DNA y se transfirió a un tubo nuevo; se resuspendió con un volumen de 4 a 5 ml de agua

ultrapura y se agregó 20 µg de RNasa/ml de DNA y se incubó durante 1 h a 50° C.

Posteriormente la solución se transfirió a tubos Eppendoff de 1.5 ml y se adicionó un volumen de fenol-cloroformo (v/v) y se homogenizo por inversión durante 1 min; se centrifugó 10 min a 10,000 rpm y la fase acuosa fue transferida a otro tubo y se le adicionó un vol de cloroformo; se mezcló con vortex durante 1 min y nuevamente se centrifugó; luego se separó la fase acuosa y se adicionó 1/10 de vol de NaCl 5 M y 2 vol de etanol absoluto; se centrifugó y se decantó el sobrenadante. El botón se dejó secar en el horno a 50° C y finalmente fue resuspendido en 500 µl de agua ultrapura. El DNA se guardó en refrigeración hasta su posterior uso. El DNA se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1 % para verificar la calidad del DNA total (modificado de Sambrook *et al.*, 1989).

7.3. Amplificación del gen *glcP1* de *S. coelicolor* M145 y su homólogo en *S. peucetius* var. *caesius* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los genes se amplificaron por PCR usando como templado DNA total de *S. coelicolor* M145 como control, y de *S. peucetius* var. *caesius*. Los cebadores utilizados se diseñaron con base en la secuencia *glcP1* reportada para *S. coelicolor*, mostrada en la figura 9 (Wezel *et al.*, 2005); los cuales cubren la región codificante del gen.

```
GCGTCAGCCCTGAACCCTCGTTCTTCAAGACTTGAACACATAACCACTTCAGCTCCCCTGAAAG
TCACAGCTCTCGCCCTCTTGACTTCGATACTTGAAGGCATAGTCTCTGCAACGTTGCTTTTACC
TTCAGGTTCCCTTCGTTGGCACCTCGAAGGGTGAACCGCCCGGGCAGCGTTGCCGGTAGCCCGAG
GAGTACACGTGGCCAGCACATCGCAGGCGCCAGTCCAGGAGCCGGGACGGCTCATCCCATCA
TCTCGGGCACGTCATCTTCATCGCGGCGGGCGCGATGGGCGGTTTCTGTTTCGGTTACGAC
AGTTCCGTGATCAACGGTTCGGTTCGAGGCGATCCGGGACCGCTACGACGTCGGTTCCGCGGTGC
TGGCGCAGGTCATCGCCGTGGCTCTGATCGGCTGTGCCATCGGTGCCGCGACCGCGGGCCGTAT
CGCGGACCGTATCGGCCGTATCCGCTGCATGCAGATCGCCGCGGTCTGTTACGGTGAGCGCC
GTCGGCTCCGCGCTGCCCTTCGCGCTGTGGGACCTGGCCATGTGGCGGATCATCGGCGGCTTCG
CGATCGGCATGGCCTCGGTGATCGGCCCCGCTACATCGCCGAGGTGTCCCCGCCCGCCTACCG
CGGCCGGCTCGGTTCCCTTCCAGCAGGCCGCGATCGTCATCGGCATCGCCGTCTCCAGCTGGTC
AACTGGGGTCTGCTGAACGCCCGCGGGTGACCAGCGGGCGAGCTGATGGGCTGGAGGCCT
GGCAGGTCATGCTCGGCGTCATGGTGATCCCGGCCGTCTGTACGGCCTGCTGTCTTCGCCAT
```

CCCCAGTCCCCCGCTTCTGATCTCGGTGGGCAAGCGGAGCGCGCCAAGAAGATCCTCGAG
 GAGGTCGAGGGCAAGGACGTGGACTTCGACGCCCCGCGTCACCGAGATCGAGCACGCCATGCACC
 GCGAGGAGAAGTCTCCTTCAAGGACCTCTCGGCGGCAGCTTCTTCTTCAAGCCGATCGTGTG
 GATCGGTATCGGCCTGTGGTCTTCCAGCAGTTCGTGGCATCAACGTCGCGTTCTACTACTCC
 TCGACGCTGTGGCAGTCGGTCGGCGTCGACCCCGCCGACTCGTTCTTCTACTCGTTCACGACGT
 CGATCATCAACATCGTCGGCACCGTGATCGCGATGATCTTCGTGGACCGCGTCGGCCGCAAGCC
 GCTCGCCCTGATCGGCTCCGTCGGCATGGTGATCGGGCTGGCGCTGGAGGCCTGGGCCTTCTCC
 TTCGACCTGGTCGACGGGAAACTCCCGGCCACCCAGGGCTGGGTGCGCCTGATCGCCGCCACG
 TCTTCGTCTCTTCTTCGCCCTGTGCGTGGGGTGTGGTTCGTGTGGGTCTTCTCGGCGAGATGTT
 CCCC AACCGGATCCGCGCCGCGCGCTGGGCGTGGCCGCTCCGCGCAGTGGATCGCCAACTGG
 GCCATCACCGCGAGCTTCCCGTCACTGGCCGACTGGAACCTCTCCGGCACCTACGTGATCTACA
 CGATCTTCGCCGCCCTCTCCATCCCCTTCGTCTTGAAGTTCGTGAAGGAGACCAAGGGCAAGGC
CCTGGAGGAAATGGGCTGACCCGCCCGCCCCGAACCCGGGAGGAGGGCCAAGTCCCCGCTGCC
 CCTTCCCCGTACCGTCCGCCGCCCGCCGGTTCGCATTCCGGGCGGGGCGGGCGGTGTGCCGGG
 ACCCGTTCGGCGTACGTACAGACGGTCACGGTCTCGGCCTCGGGCTGCTCGGCCCGCTCCGCGCG
 CGCATCCGGGACGATCAGCGCCGGCTT

Regiones esenciales del gen <i>glcP1</i>	
Región codificante	1419 pb
Estructura tallo asa	CCGGCAGCGTTGCCGG
Unión a ribosoma	AGGAGT
Forward	GTGGCCAGCACATCGCAG GCG
Reverse	TCAGCCCATTTCCTCCAGG
Estructura tallo asa de término	CCGCCGCCCGCCCGG CCGGGCGGGGCGGGCGG

Figura 9. Secuencia de la región codificante del transportador de glucosa *glcP1*, de *S. coelicolor* M145 (Wezel et al., 2005).

Los oligonucleótidos para amplificar ambos fragmentos fueron: Forward (GTGGCCAGCACATCGCAGGCG) y Reverse (TCAGCCCATTTCCTCCAGG). El producto esperado fue de **1419 pb**. El sistema de reacción se describe en la tabla 1.

Tabla 1. Sistema de Reacción

Componentes	Concentración final
DNA total de <i>Streptomyces</i>	100 ng
MgCl ₂	1.5 mM
Buffer 10X (Tris-HCl, 10 mM pH 8.3; KCl, 50 mM)	1X
Oligonucleótidos	
Forward (5')	0.2 μM
Reverse (3')	0.2 μM
DMSO (Dimetil sulfóxido)	10%
DNA polimerasa (Amplitaq de Applied Biosystems)	0.5 U
Volumen final	25 μl

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador Gene Amp PCR System 2400. Las condiciones de amplificación consistieron en: una exposición inicial a 94° C durante 5 min y treinta ciclos que comprenden: 1 min a 94° C para la desnaturalización, 1 min a 50, 52 o 70 y 72° C (según el experimento) para el alineamiento, 1 min a 72° C para la polimerización. Por último, una exposición final de 5 min a 72° C, para la extensión final.

Los fragmentos obtenidos fueron 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) y se verificó la pureza por electroforesis.

7.4. Clonación de los fragmentos de PCR obtenidos en el plásmido pGEM-T easy

El pGEM-T easy (Figura 10) es un plásmido de alto número de copias utilizado para clonar productos de PCR.

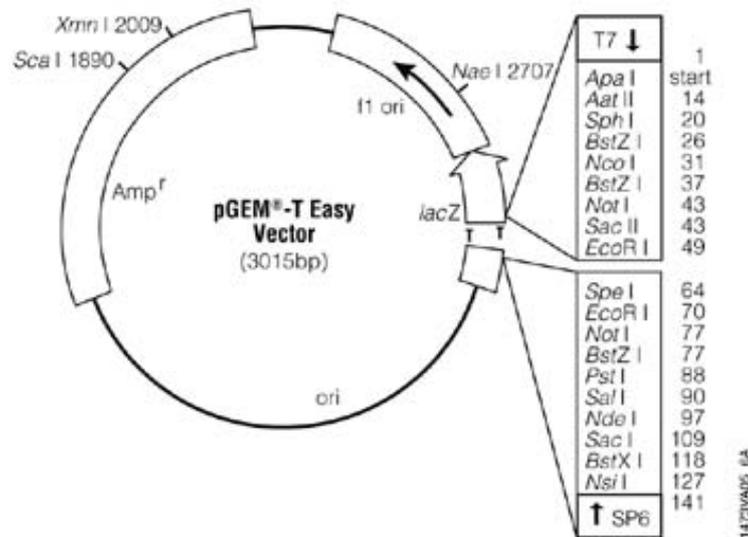


Figura 10. Mapa genético del plásmido pGEM®-T Easy Vector (Tomado de <http://www.promega.com/tbs/tm042/tm042.pdf>).

El sitio de inserción del fragmento está flanqueado de timina que se aparea con la adenina que ha sido añadida al fragmento amplificado por la AmpliTaq DNA polimerasa. Este sistema de clonación facilita la secuenciación, empleando los oligonucleótidos del fago M13, que flanquean al sitio múltiple de clonación (SMC) donde se encuentra insertado el fragmento. Cabe resaltar que el SMC esta inserto en el gen *lacZ*, (β -galactosidasa), el cual permite que la selección de las clonas positivas sea mas eficiente. Esto es debido a que la inserción del fragmento de interés genera la interrupción de *lacZ*. Esto permite identificar fenotípicamente a las clonas positivas. Dichas clonas se pueden seleccionar porque las colonias crecen blancas debido a que son incapaces de oxidar el X-gal (-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) a un compuesto azul insoluble (5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo). Además, en la tabla 2 se enlistan las características del vector.

Tabla 2. Características del vector pGEM®-T easy

	Secuencias de referencia
Inicio de la transcripción T7 RNA polimerasa	1
Sitio múltiple de clonación	10–113
Promotor SP6 de la RNA polimerasa (-17 to +3)	124–143
Sitio de iniciación SP6 de la transcripción de la RNA polimerasa	126
pUC/M13 Secuencia de unión del oligonucleotido Reverse	161–177
Codón de inicio de lacZ	165
Operador lac	185–201
Región codificante de la β-lactamasa	1322–2182
Región del fago f1	2365–2820
Secuencia del operón lac	2821–2981, 151–380
pUC/M13 Secuencia de unión del oligonucleotido Forward	2941–2957
Promotor T7 de la RNA polimerasa (-17 to +3)	2984–3

Para llevar a cabo la ligación del fragmento de interés, también se realizaron dos sistemas control para verificar que el proceso de clonación funciona. En la tabla 3 se describe el sistema de reacción.

Tabla 3. Sistemas de reacción utilizadas para la ligación

	Reacción de interés	Control Positivo	Control Negativo
Buffer de Ligación Rápida 2X para DNA Ligasa T4	5 µl	5 µl	5 µl
pGEM®-T Easy Vector (3018pb)	1 µl	1 µl	1 µl
Producto de PCR	5 µl	-	-
Inserto Control de DNA	-	2 µl	-
DNA Ligasa T4 (3 unidades/µl)	1 µl	1 µl	1 µl
Agua desionizada a un volumen final de	10 µl	10 µ	10 µ

Los componentes de reacción se mezclaron y se homogenizaron vigorosamente; posteriormente fueron incubados a 4° C toda la noche, para después ser utilizados en la transformación de células electrocompetentes de *E. coli* de la cepa TOP 10.

7.5. Preparación de células electro competentes

Se tomaron 50 μ l del cultivo semilla en 40% de glicerol de *E. coli* de la cepa TOP 10 y se transfirieron a 25 ml de medio de cultivo LB (triptona, 1%; extracto de levadura, 0.5%; NaCl, 0.5%; pH 7.0 ajustado con NaOH 1 N) y se incubaron 4 h a 37° C, con agitación de 200 rpm. Se tomó 1 ml de este cultivo y se inoculó un matraz de 250 ml que contenía 50 ml de medio LB y se dejó incubar durante toda la noche, bajo las condiciones anteriormente mencionadas.

Para obtener las células competentes se inocularon 500 ml de medio LB en un matraz Fernbach con 1/100 de vol del cultivo de toda la noche, y se incubaron en las mismas condiciones hasta que se alcanzó una densidad óptica (OD) de 0.500 a 540 nm. Las células se obtuvieron por centrifugación a 6,000 rpm durante 15 min a 4 °C, utilizando la centrífuga Beckman con un rotor JA-14.

El sobrenadante fue retirado y el botón celular se resuspendió en un vol total de 500 ml de agua ultrapura estéril y fría, y se homogenizaron. Posteriormente se repitió la centrifugación 3 veces pero ahora se resuspendiendo en 250 ml de agua, luego en 20 ml de glicerol al 10% y finalmente en 2 ml de la misma solución de glicerol; inmediatamente después, la suspensión celular se alicuotó en 50 μ l y se congelaron rápidamente utilizando un baño de etanol con hielo seco. Las células fueron almacenadas a -70° C.

7.6 Transformación

Las células competentes fueron descongeladas en hielo, luego se adicionaron 2 μ l de la reacción de ligación y se incubaron 5 min en hielo. La transformación se hizo por electroporación a 1,250 V 0.4 s, se adicionó 1 ml de medio SOC (triptona 2 %; de extracto de levadura 0.5 %; 1 ml de NaCl 1 M, 0.25 ml de KCl 1 M en 100 ml de H₂O destilada, complementado con 1 ml de una solución stock de Mg²⁺ 2 M [20.33 % MgCl₂ 6H₂O y 24.65 % MgSO₄ 7H₂O] y 1 ml de glucosa 2 M) y se incubaron 1 h a 37° C. Transcurrido este tiempo, se platearon 100, 200 y 300 μ l de cada una de las reacciones en cajas Petri que contenían medio LB, ampicilina (200 mg/ml), X-gal (40 mg/ml) e IPTG (500 mM). Dichas cajas fueron incubadas a 37° C durante 12

h. Las colonias blancas, las cuales contenían el inserto se resembraron nuevamente bajo las mismas condiciones.

7.7. Extracción del plásmido.

Para corroborar la presencia del gen amplificado dentro del plásmido pGEM-T-Easy, se aisló al plásmido recombinante en pequeña escala y se realizó un análisis de restricción. Para ello, se inoculó un tubo de ensaye que contenía 3 ml de medio LB estéril con una asada de una sola colonia y se incubó a 37° C durante toda la noche.

El contenido de los tubos de 3 ml se transfirió a tubos de 1.5 ml y se centrifugaron durante 20 segundos a 13,200 rpm, el sobrenadante se retiró con ayuda de una pipeta Pasteur y el botón se resuspendió en 100 µl de solución I (Glucosa, 50 mM; Tris 25 mM pH 8, EDTA 10 mM, pH 8). Posteriormente se agregó 200 µl de la solución II (NaOH 0.2 N en SDS 1%), se mezcló por inversión 5 veces y luego se colocó en hielo durante 5 min. Concluido este periodo, se agregaron 150 µl de la solución III (acetato de potasio 5 M, la cual se ajustó con ácido acético glacial hasta alcanzar un pH de 4.8); enseguida, los tubos se mezclaron por inversión y se incubaron en hielo durante 5 min. A continuación se centrifugó durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a tubos nuevos que contenían 800 µl de etanol absoluto, se homogenizaron y se mantuvieron durante 20 min a -20 °C.

Posteriormente se centrifugaron durante 1 min a máxima velocidad, se retiró el sobrenadante y el botón se lavó con 1 ml de etanol al 70%, se centrifugaron las muestras y el botón se dejó secar en el horno a 50° C durante 10 min. Finalmente se resuspendió el DNA plasmidico en 30 µl de agua ultrapura. Se agregó RNasa a una concentración final de 50 µg/ml y se incubó a 37° C durante 30 min, luego se agregó pronasa a 100 µg/ml; NaCl 100 mM y SDS al 0.4% y se incubó durante 1 h a 37° C; después de este tiempo, se agregó 1 vol de fenol y se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min; se extrajo la fase acuosa, a la que se le agregó 1 vol de una mezcla (1:1) de fenol/cloroformo. Luego, se centrifugó de la misma manera que con el fenol, y nuevamente se extrajo la fase acuosa a la que se le añadió 1 vol de cloroformo y se centrifugó de igual forma. Se extrajo la fase acuosa y se

adicionó 1/10 de vol de acetato de sodio 3 M y 2.5 vol de etanol absoluto y se centrifugó nuevamente.

El botón obtenido se limpió con 1 ml de etanol absoluto y se dejó secar en el horno de hibridación a 50° C. Finalmente se resuspendió el botón en 50 µl de agua ulltrapura.

7.8. Análisis del inserto por restricción

Se realizaron análisis de restricción para confirmar la presencia del fragmento. El plásmido aislado fue digerido con la enzima de restricción *Eco RI*, la cual reconoce dos sitios de corte en el plásmido pGEM® -T Easy Vector y por lo tanto, libera el fragmento del plásmido.

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

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

8. RESULTADOS

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

Para llevar a cabo la amplificación del fragmento de interés, se inició con el aislamiento del DNA genómico de ambas cepas de *Streptomyces*. Posteriormente se determinó su pureza y concentración. Además se evaluó la integridad del DNA genómico, para ello se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se pudo observar que no hubo degradación del ácido nucleico durante el proceso de purificación (Figura 11). La pureza del DNA fue aceptable, ya que la relación de absorbancias 260/280 fue mayor a 1.8, lo que indica una baja cantidad de proteínas.

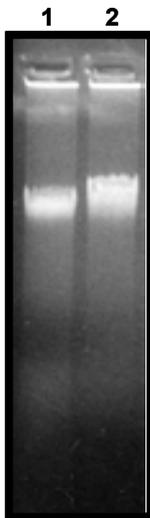


Figura 11. Análisis del DNA total de *S. peucetius* var. *caesius* (1) y de *S. coelicolor* (2). Fotografía del análisis electroforético en gel de agarosa al 1%.

8.2 Amplificación del gen de interés de *S. peucetius* var. *caesius* mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

Para amplificar el *glcp1* de *S. peucetius* var. *caesius*, se diseñó un par de oligonucleótidos con base en la secuencia de *S. coelicolor* reportada por Bertram *et al.* (2004). Las condiciones para la amplificación, se realizaron de acuerdo a experimentos previos realizados en el laboratorio, los cuales se describen en la metodología.

El tamaño estimado para el fragmento es de 1419 pb. En la figura 12 se muestran los resultados del patrón electroforético de los amplicones que

corresponden a *S. peucetius* var. *caesius* y a *S. coelicolor* utilizado como control positivo.

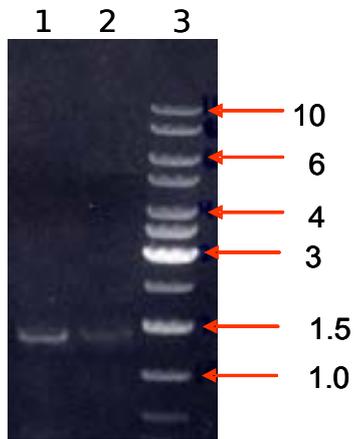


Figura 12. análisis electroforético del producto de PCR de de *S. coelicolor* (1) y de *S. peucetius* var. *caesius* (2), MPM 1 kb ladder de Fermentas (3).

Cabe resaltar que en ambos casos se obtuvo una sola banda; sin embargo, en *S. coelicolor* se obtuvo una banda más intensa, lo cual podría indicar que existen diferencias en la secuencia de ambas especies. Es importante señalar que previamente se llevaron diferentes protocolos de PCR para *S. peucetius* var. *caesius*, los cuales no amplificaron.

8.3 Purificación del fragmento

El producto de PCR obtenido de *S. peucetius* var. *caesius*, fue de 10 reacciones, las cuales se juntaron y posteriormente se purificaron por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1% a 70 V. En la figura 13 se muestra el resultado obtenido.

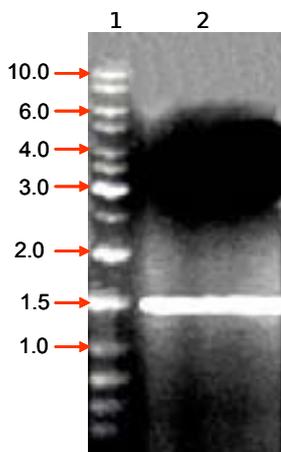


Figura 13. Análisis electroforético del producto de PCR de *S. peucetius* var. *caesius* (2), MPM 1 kb ladder de Fermentas (1).

La banda obtenida se cortó y aisló de acuerdo a las especificaciones del sistema "Qiaquick Gel Extraction Kit" de Qiagen. Posteriormente se hizo el análisis electroforético para corroborar la pureza y el tamaño del fragmento.

8.4 Clonación de *glcP1* de *Streptomyces* en el plásmido pGEM®- T Easy Vector.

Se purificaron los plásmidos de las clonas positivas (colonias blancas) y se llevó a cabo el análisis de restricción para confirmar la presencia del fragmento. El plásmido aislado fue digerido con la enzima de restricción *Eco RI*, la cual libera el inserto. Posteriormente se realizó el análisis electroforético. Como se puede observar en la figura 14, las clonas que se encuentran en los carriles 3 y 6, poseen el fragmento con el tamaño esperado (aprox. 1500 pb), el resto de las clonas muestran un inserto de 1700 pb aproximadamente, por ello se descartaron para la secuenciación y análisis. Mientras que las clonas positivas se utilizaron y se conservaron para posteriores estudios.

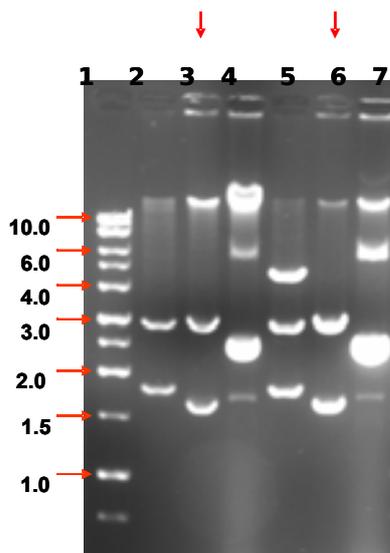


Figura 14. Análisis electroforético del plásmido de las clonas positivas. El plásmido fue digerido con *Eco RI*. Carril 1, MPM; Carril 2-7 muestras 1- 6.

8.5. Análisis teórico de la secuencia

La secuencia de nucleótidos fue obtenida de dos clonas independientes, secuenciadas por ambos extremos con los oligonucleótidos comerciales (SP6 y T7), citados previamente en la metodología. El fragmento obtenido muestra un 68% de G-C. Además, se predijo el posible marco de lectura abierto; en la figura 15 se muestra la secuencia de nucleótidos y aminoácidos obtenida.

```

1      ATGACAGCAGAAAACGTCGTCGTCGGGCTCGGTCCCCGCCTCCACCGGGACGGTCACCACG
20     M T A E T S S S G S V P A S T G T V T T
61     GCCGTCCCCGCCCGCCTGGACCGGCTGCCCTGGTCGCGCTGGCACTGGATGATCGTCATC
41     A V P A R L D R L P W S R W H W M I V I
121    GGCCTGGGCACCGTCTGGATCCTGGACGGCCTGGAAGTCACGATCGTCGGCAACGTCGCC
61     G L G T V W I L D G L E V T I V G N V A
181    GGACGCATCGCCGAGGACGGCAGCGGCCTGGACATCAGCTCCGCCAGATCACCGGCCTG
81     G R I A E D G S G L D I S S A Q I T G L
241    GCCGCCGCCCTGTACGTGGCCGGTGCCTGCTCCGGGGCCCTGTTCTTCGGCTGGCTGACC
101    A A A L Y V A G A C S G A L F F G W L T
301    GACCGGCACGGCCGCAAGAAGCTGTTTCATGCTGACGCTGGTGGTCTATCTGGCGGCCACC
121    D R H G R K K L F M L T L V V Y L A A T
361    GCGCTGACCGCGGTCTCCTTCGAGTCTGGTGGTTCCTCCTTCCTCCTCCGCTTCCTCACCGGC
141    A L T A V S F E S W W F F L F R F L T G
421    TTCGGCATCGGCGCGAGTACGCGGCGATCAACTCCGGATCGACGAGCTGATCCCGTCC
161    F G I G G E Y A A I N S A I D E L I P S
481    CACTACCGGGGCCGGGTCGACCTCATCATCAACGGCAGCTACTGGCTCGGCGCGATCGGC
181    H Y R G R V D L I I N G S Y W L G A I G
541    GCGCCCTGCTGTCCATCGTCATGCTGGACACCGACATCTTCGCCAAGGACGTCGGCTGG
201    G A L L S I V M L D T D I F A K D V G W
601    CGGCTCAGCTTCGCCCTCGGTGTGGTTCCTGGGCCTGGTGGTGTCTGCTGGTGGCGCGGCAC
221    R L S F A L G V V L G L V V L L V R R H
661    GTGCCGGAGAGCCACGCTGGCAGTTCATCCACGGCCAGGGCGAGAAGGGCGGACACCCTC
241    V P E S P R W Q F I H G Q G E K A D T L
721    GTCTCCTCCGTCGAACGGGAGATCGAGCGGGAGAAGGGCGGAAGCTGCCGCCCGCGGCC
261    V S S V E R E I E R E K G A K L P P P A
781    GGCGAGATCACCATCCACCAGCGCAAGTCCATCGGCTTCGGCCTGATCGCCAAGACCGTC
281    G E I T I H Q R K S I G F G L I A K T V
901    TTCGCCGCTACCCGCGCCGCGGTGCTCGGCCTGTCCCTTTTCATCGGCCAGGCACTTC
301    F R R Y P R R A V L G L S L F I G A C F
961    CTGTACAACCGGATCACCTTCGGCTTCGGCACCATCCTCATCACCTTCTTCGACGTGCCG
321    L Y N A I T F G F G T I L I T F F D V P
1021   ACCGGCAGCACCGGCTACTACTTCGCCGTATCGCCGCGGCAACTTCTGCGGCCCGCTG
341    T G S T G Y Y F A V I A A G N F C G P L
1081   CTCTCGGCCACCTCTTCGACACCGTCCGCCCGCGGATCATGATCTCCAGCACCTATCTG
361    L L G H L F D T V G R R I M I S S T Y L
1141   CTCTCGGCCGCTCTGCTCTTCGGCACGGCTGGCTCTTCGACCGGGGCTCGCTCACGGCG
381    L S G V L L F G T A W L F D R G S L T A
1201   ACGACATGACGGCCTGCTGCTGCGTGGTGTCTTCGCTTCGCGCTCGGCCGCGCCCTCCAGC
401    T T M T A C W C V V L F F A S A G A S S
1261   GCGTACCTGACGGTCTCCGAGATCTTCCCCATGGAGACCCGCGCCATGGCCATCGCCTTC
421    A Y L T V S E I F P M E T R A M A I A F
1321   TTCTACGCCCTCGGCACCGCCCGCGGGCATCAGCGGCCCGCTGCTCTTCGCCGACCTG
441    F Y A L G T A A G G I S G P L L F A D L
1381   ACGGAGTCCGGCGTGGTCCGGCAGACGGTCCCTGGCCTTCCAGATCGGCGCCGGGCTGATG
461    T E S G V V G D T V L A F Q I G A G L M
1441   TGCGCGGCCGGCCTGGTCCGGCGTTCCTGGCGGTGAAGGCGGAGCGCCGCTCGCTGGAG
481    C A A G L V A A F L A V K A E R R S L E
1501   GACATCGCGGAGCCGCTGTTCGACGGCGGTACCGGAGACGCCGGAACGGCGGGCCCCGGC
501    D I A E P L S T A V P E T P G T A G P G
1561   GCCAAGACCGGTTGTGCCCGGGCCATGGGACAGCTTGTCCCTGTGAAGGCATGTCCAC
521    A K T A L C P G H G T A C P C R R H V H
1621   TGTTCATGGCACCCGCAAGCGGTGTCTCTCTCTCAAGGTCAGTGA
541    C H G T R K R C R L S S Q G Q *

```

Figura 15. Secuencia de nucleótidos obtenida de *S peucetius* var. *caesius* y secuencia de aminoácidos teórica.

En el análisis teórico (realizado en www.expasy.com), la secuencia de aminoácidos está constituida por 515 residuos, con peso molecular de

54786.5 Da y un punto isoeléctrico teórico de 9.0. La composición de aminoácidos es la siguiente:

Aminoácido	Composición	Porcentaje
Ala (A)	60	11.7%
Arg (R)	31	6.0%
Asn (N)	7	1.4%
Asp (D)	15	2.9%
Cys (C)	10	1.9%
Gln (Q)	8	1.6%
Glu (E)	19	3.7%
Gly (G)	60	11.7%
His (H)	11	2.1%
Ile (I)	34	6.6%
Leu (L)	57	11.1%
Lys (K)	11	2.1%
Met (M)	8	1.6%
Phe (F)	30	5.8%
Pro (P)	19	3.7%
Ser (S)	37	7.2%
Thr (T)	40	7.8%
Trp (W)	11	2.1%
Tyr (Y)	11	2.1%
Val (V)	36	7.0%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%

Con base en el análisis *in silico*, se logro determinar otras características del polipéptido obtenido, éstas se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Otras características del polipéptido teórico			
Fórmula:	C ₂₄₉₃ H ₃₉₀₁ N ₆₆₇ O ₆₈₇ S ₁₈		
Composición atómica:	Carbono	C	2493
	Hidrógeno	H	3901
	Nitrogeno	N	667
	Oxígeno	O	687
	Azufre	S	18
Numero total de átomos:	7766		
Tiempo de vida media:	10 horas en bacterias (<i>Escherichia coli</i> , <i>in vivo</i>). Además es considerada como estable.		

Por otro lado, en el análisis comparativo de la secuencia de aminoácidos de *S. peucetius* var. *caesius*, se determinó que presenta 98% (475/484 aa) de identidad y de similitud con una proteína hipotética de *S. coelicolor* (SCO2889), cuyo peso molecular es 53163 Da y punto isoeléctrico de 6.16.

Debido a su alta identidad (98%) en ambas especies, se consideran homólogas. Además, se predice que ésta secuencia podría codificar para una proteína de transporte de azúcares en *S. coelicolor*. Es importante destacar que en *S. avermitilis* existe también una proteína hipotética (SAV5186) de secuencia homóloga, cuyo peso molecular es de 53619 Da y punto isoelectrico de 6.16, la cual presenta 85% (397/466) de identidad y 90% (423/466) de similitud con la secuencia de *S. peucetius var caesius*. En la figura 16 se muestra el alineamiento múltiple entre las tres secuencias. Cabe mencionar que la secuencia no mostró identidad con ninguna otra proteína. Además, tiene similitud del 25 % con la permeasa Glcp1; este resultado podría atribuirse al azar, ya que este género posee alto contenido de G-C en su secuencia.

Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos

SPEVC
MTAETSSSSGVPASTGTVTTAVPARLDRLPWSRWHSTIVIGLGTWVILDGLEVTIVGFVA
SCO
MTAETSSSSGVPASTGTVTTAVPARLDRLPWSRWHMIVIGLGTWVILDGLEVTIVGNVA
SAV MSASAP-
QAHGPAATGTVTTDVPARLDRLPWSRWHMIVIGLGTWVILDGLEVTIVGNIA
. . **.****** *****
**.*

SPEVC
GRIAEDGSGLDISSAQITGLAAALYVAGACSGALFFGWLTDRHGRKKLFMLTLVVYLAAT
SCO
GRIAEDGSGLDISSAQITGLAAALYVAGACSGALFFGWLTDRHGRKKLFMLTLVVYLAAT
SAV
GRLSEDGSGLSITSAQVTGVAAALYVAGACAGALFFGWLTDRFGRKKLFMVTLLVYLSAT
.**** *.***.**.******.*****
*****.*****.**

SPEVC
ALTAVSFESWWFFLFRFLTGFYGIGGEYAAINSAIDELIPSHYRGRVDLIINGSNWLGAIG
SCO
ALTAVSFESWWFFLFRFLTGFYGIGGEYAAINSAIDELIPSHYRGRVDLIINGSYWLGAIG
SAV
ALTALSFNSSWWFFLFRFLTGFYGIGGEYAAINSAIDELIPAKYRGRVDLIINGSYWLGAIG
.* **.* ** *****.

SPEVC
GALLSNVMLDTDIFAKDVGWRLSFALGVVLGLVLLVRRHVPESPRWQFIHGQGEKADTL
SCO
GALLSIVMLDTDIFAKDVGWRLSFALGVVLGLVLLVRRHVPESPRWQFIHGQGEKADTL
SAV
GALLSIVMLDTSIFPKDLGWRLTFALGVVLGLVLLVRRHVPESPRWQFIHGRGEDAEAL
***** ***** **
.****.*****.*****.* **.*

SPEVC
VSSVEREIEREKGAKLPPPAGEITIHQRKSIQFGLIAKTVFRRYPRAVLGLSLFIGQAF
SCO
VSSVEREIEREKGAKLPPPAGEITIHQRKSIQFGLIAKTVFRRYPRAVLGLSLFIGQAF
SAV
VSSVEREIEQEKGEPLPRAESEITIEQRKSIQFGLIAKTVFGRYPKRAVLGLLFIGQAF
*****.* **.* **.* ***** *****
.***.*****

SPEVC
LYNAITNGFGTILITFFDVPTGSTGYFVAVIAAGNFCGPLLLGHLFDTVGRRIMISSTYL
SCO
LYNAITFGFGTILITFFDVPTGSTGYFVAVIAAGNFCGPLLLGHLFDTVGRRIMISSTYL
SAV
LYNAITFGFGAILTTFFDVPTGGTGYFVAVIAAGNFIGPLLLGKLFDTVGRRIMIASTYL
***** **.* **.* ***** *****
*****.*****.****

SPEVC
LSGVLLFGTAWLFDGRSLTATTMTACWCVVLFASAGASSAYLTVSEIFPMETRAMAIAI
SCO
LSGVLLFGTAWLFDGRSLTATTMTACWCVVLFASAGASSAYLTVSEIFPMETRAMAIAF

```

SAV
LSGLLLFGTAWLFDGRSLSAMTLTACWCAVLFFASAGASSAYLTVSEVFPMETRAMAIAF
          ***.*****. * *.***** **
*****.*****

SPEVC          FYALGTAAGGISG-----
QIGAGLMCAAFLVAAFLAVKAERRSLE
SCO
FYALGTAAGGISGPLLFADLTESGVVGD TVLAFQIGAGLMCAAGLVAAFLAVKAERRSLE
SAV
FYALGTAAGGISGPLVFAADLTESGVVGD TVLAFQIGAGLMCAAGLVAAFLAVNAERRSLE
          ***** *****
*****

SPEVC
DIAEPLSTAVPETPGTAGPGAKTALCPGHGTACPCRRHVHCHGTRKRCRLSSQGQ
SCO
DIAEPLSTAVPETPGTAGPGAKTA-----
SAV
DIAEPLSVAQTTAPAPASASGT-----
          ***** * . * *

```

Figura 16. Alineamiento múltiple de la secuencia obtenida de *S. peucetius* var. *caesius* (SPEVC) con *S. coelicolor* (SCO) y *S. avermitilis* (SAV). (*) Aminoácido presente en las tres especies; (•) Aminoácido que difiere en las tres especies; (-) Aminoácido desconocido.

Finalmente, se realizó un análisis comparativo de la organización genética de la secuencia homóloga en *Streptomyces*. Al parecer, las secuencias son conservadas, ya que se predice que codifican para proteínas con función similar, con un porcentaje alto de identidad (>80%). En la figura 17 se ilustra el análisis comparativo.

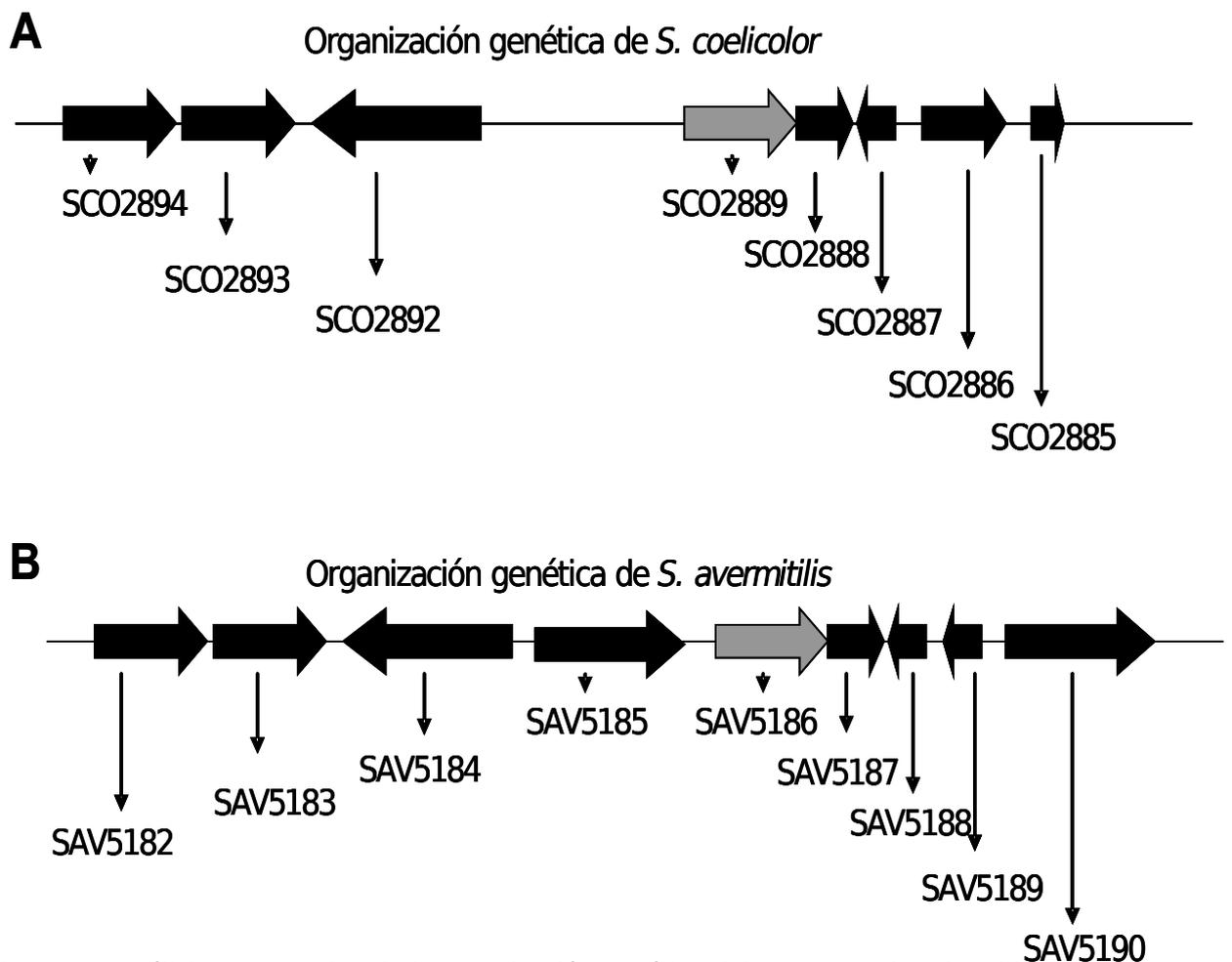


Figura 17. Análisis comparativo de la organización genética del transportador obtenido en *S. peucetius* var. *caesius* en el género en *Streptomyces*. En la figura se ilustran con flechas los genes adyacentes al transportador homólogo en varias especies, los cuales han sido reportados en el genoma completo. La secuencia homóloga del transportador en *S. coelicolor* es SCO2889 (A1 y A2); en *S. avermitilis* es SAV5186 (B) y en *S. scabies* es 1890. El nombre asignado a cada gen corresponde al orden en el genoma de cada especie. El análisis se realizó en http://avermitilis.ls.kitasato-u.ac.jp/gview/view_map.cgi.

9. DISCUSIÓN

Recientemente en *Streptomyces*, se han dado evidencias de diversos mecanismos para la incorporación de carbohidratos, esto refleja la capacidad tan alta de este grupo bacteriano para utilizar un sinnúmero de polisacáridos presentes en la materia orgánica (Sabater y Asensio 1972; Bertram *et al.*, 2004, Guzmán *et al.*, 2005b; Van Wezel *et al.*, 20007).

Por otro lado, la glucosa es la fuente de carbono más fácilmente metabolizable en *Streptomyces* y su presencia es capaz de evitar la expresión de genes involucrados en el transporte de otros carbohidratos, así como la síntesis de diversos metabolitos secundarios. El metabolismo de glucosa inicia con su incorporación a la célula, generando el aumento de los niveles de sus intermediarios metabólicos, los cuales, podrían determinar si se ejerce represión catabólica. Por ello se ha sugerido que el transporte de glucosa podría ser un paso determinante para ejercer su efecto. Por esta razón, es esencial la caracterización bioquímica y molecular del sistema de incorporación de glucosa.

Por otro lado, se ha demostrado en *S. coelicolor*, que GlcP es una proteína simportadora dependiente de H⁺, la cual pertenece a la superfamilia de permeasas MSF. Es un transportador de alta afinidad específico para glucosa, aunque puede incorporar 2-DOG y es indispensable para mantener un crecimiento óptimo. Además este microorganismo posee dos copias del gen, los cuales codifican para proteínas idénticas. En análisis *in silico*, se ha demostrado que este gen esta conservado en *S. avermitilis* y *S. scabies*, por ello se planteó clonar el gen homólogo de *glcP* en *S. peucetius var caesius* para su posterior caracterización bioquímica y determinar el papel que tiene en la represión por glucosa. El primer paso fue amplificar el gen por PCR, donde se diseñaron cebadores con base a la secuencia reportada para *S. coelicolor*. Posteriormente se llevo a cabo la clonación del fragmento en un sistema heterólogo (*E. coli*). De acuerdo a la secuencia obtenida, se pudo clonar un fragmento de DNA; el cual podría codificar para una proteína de transporte de azúcares, la cual resultó tener homología en *S. coelicolor* (SCO2889) y *S. avermitilis* (SCO5186) y resultó diferente a *glcP1*.

Con relación a lo anterior, cabe resaltar que se ha reportado que en varias especies de *Streptomyces* existe más de un sistema de incorporación de glucosa. Por ejemplo, se ha caracterizado un sistema de baja afinidad y uno de alta afinidad e inclusive sistemas generalizados capaces de incorporar diversos azúcares (Sabater y Asensio, 1972; Hodgson, 1982; Hurtubise et al., 1995; Van Wezel et al., 2007). Por ello, el hallazgo obtenido en este trabajo es de vital importancia ya que podría llevarse a cabo la caracterización completa del sistema de transporte, con el fin de determinar su función y su papel en la RC por glucosa.

Por otro lado, la secuencia obtenida generó una proteína teórica que posee 515 residuos de aminoácidos y un PM de 54.7 kDa con pI de 9.00. Es importante señalar que se realizó un análisis comparativo con GlcP y no hay homología con la secuencia obtenida para *S. peucetius var caesius*, dicha secuencia de aminoácidos posee solo 25% de identidad con GlcP. Es importante señalar que a pesar de que la amplificación de dicha secuencia se diseñó con base a la secuencia de *glcp1* de *S. coelicolor*, no se pudo amplificar en *S. peucetius var caesius*. Esto puede ser debido al alto contenido de G-C en el genoma de *Streptomyces* y eso generó menor especificidad. Aunque no se clonó la secuencia esperada, se aisló un fragmento que podría codificar un transportador de azúcares, el cual comparte similitud con la familia MSF. Aunque es importante determinar la funcionalidad del producto génico, esto sugiere que *S. peucetius var. caesius*, al igual que *S. coelicolor* y otras especies emparentadas, posee sistemas conservados y alternativos para transportar glucosa.

10. CONCLUSIONES

Se pudo clonar un simportador de azúcares altamente conservado, ya que el análisis teórico realizado permitió determinar que el producto génico posee 89-98% de identidad con otros transportadores de carbohidratos en el género *Streptomyces*.

La secuencia homóloga en *S. coelicolor*, *S. avermitilis* y *S. scabies* se encuentra en la región central del genoma, la cual es muy conservada en este género y posee una organización genética similar en ambas especies.

11. PERSPECTIVAS

Determinar si el producto es funcional y determinar sus características bioquímicas.

Esto se puede realizar por medio de la expresión heteróloga en un sistema bacteriano y determinar sus características cinéticas.

Conocer el efecto de la delección de dicho gen en *S. coelicolor* y en *S. peucetius* var. *caesius*, en el transporte de glucosa y la posible repercusión en la represión catabólica ejercida por glucosa. Para ello se pueden obtener mutantes dirigidas con un sistema diseñado recientemente para la interrupción de genes que permiten eliminar fragmentos de DNA de interés sin repercusión en sitios adyacentes llamado "PCR targeting system de *S. coelicolor*" propuesto por Gust *et al.* (2001). Posteriormente evaluar el transporte de glucosa y el efecto sobre la RCC.

12. REFERENCIAS

- **Angell S., Schwartz E. & Bibb M. (1992).** The glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2): its nucleotide sequence, transcriptional analysis and role in glucose repression. *Mol. Microbiol.* **6**, 2833-2844.
- **Angell S., Lewis G., Buttner M. & Bibb M. (1994).** Glucose repression in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a likely regulatory role for glucose kinase. *Mol. Gen. Genet.* **244**, 135-143.
- **Arcamone F., Cassinelli G., Fantini G., Grein A., Orezzi P., Pol C. & Spalla, C. (1969).** Adriamycin, 14-Hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol. Bioeng.* **11**, 1101-1110.
- **Bertram R., Schlicht M., Mahr K., Nothaft H., Saier Jr. H. & Titgemeyer F. (2004).** *In silico* and transcriptional analysis of carbohydrate uptake systems of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* **186**, 1362-1373.
- **Bolotin A., Wincker P., Mauger S., Jaillon O., Malarne K., Weissenbach J., Ehrlich D., Sorokin A. (2001).** The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.* **11**(5), 731-53.
- **Brückner R. & Titgemeyer F. (2002).** Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiol. Lett.* **209**, 141-148.
- **Champness W. (1988).** New loci required for *Streptomyces coelicolor* morphological and physiological differentiation. *J. Bacteriol.* **170**, 1168-1174.
- **Chater K. (1998).** Taking a genetic scalpel to the *Streptomyces* colony. *Microbiol.* **144**, 1465-1478.
- **Chatterjee S., & Vining C. (1982).** Catabolite repression in *Streptomyces venezuelae*. Induction of β -galactosidase, chloramphenicol production, and intracellular cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate concentrations. *Can. J. Microbiol.* **28**, 311-317.
- **Davidson A. L. & Maloney. P. C. (2007).** ABC transporters: how small machines do a big job. *Trends in Microbiology.* **15**, 10.

- **Dekleva M., Titus A. & Strohl R. (1985).** Nutrient effects on anthracycline production by *Streptomyces peucetius* in a defined medium. *Can. J. Microbiol.* **31**, 287-294.
- **Di Marco A., Arcamone F. & Zunino F. (1975).** Daunomycin (daunorubicin) and adriamycin and structural analogs: biochemical activity and mechanism of action. J. W. Corcoran, F. E. Hahn (eds.), *Antibiotic*. Vol. 3. Ed. Springer Verlag, New York. 101-128.
- **Garcia-Dominguez, M., Martin, J.F., and Liras, P. (1989).** Characterization of sugar uptake in wild-type *Streptomyces clavuligerus*, which is impaired in glucose uptake, and in a glucose utilizing mutant. *J. Bacteriol.* **171**, 6808– 6814.
- **Gersch D., Romero W., Bocker H. & Thrum H. (1980).** Variations in cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate and cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate in antibiotic-producing strains of *Streptomyces hygroscopicus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **3**, 39-41.
- **Grein A. (1987).** Antitumor anthracyclines produced by *Streptomyces peucetius*. *Adv. Appl. Microbiol.* **32**, 203-215.
- **Gust B., Kieser T. & Chater K. (2001).** PCR targeting system in *Streptomyces coelicolor* A3(2). John Innes Foundation, Centre, Norwich Research Park, Colney, Norwich. pp. 42
- **Guzmán S; Carmona A; Escalante L; Imriskova I; López R; Rodríguez-sanoja R; Ruiz B; Servín-Gonzalez L; Sánchez S; Langley E. (2005a).** 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.
- **Guzmán S; Ramos I; Moreno E; Ruiz B; Rodríguez-Sanoja R; Escalante L; Langley E; Sánchez S. (2005b).** Sugar uptake and sensitivity to carbon catabolite repression in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **69**, 200-206.
- **Guzmán Silvia. (2005).** Efecto pleiotrópico del gen SCO2127 en la incorporación de glucosa, actividad de glucosa cinasa y en la represión catabólica por glucosa en *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. Tesis de doctorado en Ciencias (Bioquímicas). Facultad de Química.

- **Hershberger C., Queener S. & Hegeman G. (1989).** *Genetics and molecular biology of industrial microorganism*. Ed. American Society for Microbiology. USA.
- **Hindle Z. & Smith P. (1994).** Substrate induction and catabolite repression on the *Streptomyces coelicolor* glycerol operon are mediated through the GylR protein. *Mol. Microbiol.* **12**, 737-745.
- **Hirsch F. & McCann-McCormick P. (1985).** Biology of *Streptomyces*. En: *Biology of Industrial Microorganisms*. Demain, A., Solomon, N. Ed. Butterworths. USA, **10**, 241-309.
- **Hodgson D. (1982).** Glucose repression of carbon uptake and metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its perturbation in mutants resistant to 2-deoxyglucose. *J. Gen. Microbiol.* **128**, 2417-2430.
- **Hodgson D. (2000).** Primary metabolism and its control in *Streptomyces*: A most unusual group of bacteria. *Adv. in Microbiol. Physiol.* **42**, 47-238.
- **Hoskins J., Alborn WE., Arnold J., Blaszcak LC., Burgett S. & DeHoff BS. et al. (2001).** Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J. Bacteriol.* **183**(19), 5709-17.
- **Huang C., Lin Y., Yang Y., Huang S. & Chen C. (1998).** The telomeres of *Streptomyces* chromosomes contain conserved palindromic sequences with potential to form complex secondary structures. *Mol. Microbiol.* **28**, 905-926.
- **Hurtubise, Y., Shareck, F., Kluepfel, D., and Morosoli, R. (1995).** A cellulase/xylanase-negative mutant of *Streptomyces lividans* 1326 defective in cellobiose and xylobiose uptake is mutated in a gene encoding a protein homologous to ATP-binding proteins. *Mol Microbiol.* **17**, 367-377.
- **Ikeda H., Seno E., Bruton C. & Chater K. (1984).** Genetic mapping cloning and physiological aspects of the glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Gen. Genet.* **196**, 501-507.
- **Ikeda H., Ishikawa J., Hanamoto A., Shinose M., Kikuchi H., Shiba T., Sakaki Y., Hattori M., Omura S. (2003).** Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial

microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature Biotechnology*. **21**, 526–531.

- **Ingram C., Delic I. & Westpheling J. (1995)**. ccrA1: mutation in *Streptomyces coelicolor* that affects the control of catabolite repression. *J. Bacteriol.* **177**, 3579-3586.
- **Ingram C. & Westpheling J. (1995)**. The glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor* is not required for glucose repression of the chi63 promoter. *J. Bacteriol.* **177**, 3587-3588.
- **Jault J-M., Fieulaine S., Nessler S., Gonzalo P., Di Pietro A., Deutscher J. & Galinier A. (2000)**. The HPr kinase from *Bacillus subtilis* is a homo-oligomeric enzyme which exhibits strong positive for nucleotide and fructose 1,6-bisphosphate binding. *J. Biol. Chemistry*. **275** (3), 1773-1780.
- **Kieser T., Bibb M., Buttner M., Chater K., & Hopwood D. (2000)**. *Practical Streptomyces Genetics*. The John Innes Foundation, Norwich.
- **Kwakman J. & Postma P. (1994)**. Glucose kinase has a regulatory role in carbon catabolite repression in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **176**, 2694-2698.
- **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.
- **Lux R., Jahreis K., Bettenbrock K., Parkinson J. & Lengeler J. (1995)**. Coupling the phosphotransferase system and the methylaccepting chemotaxis protein-dependent chemotaxis signalling pathways of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 11583–11587.
- **Madigan M. T., J. M. Martinko y J. Parker. (2000)**. Brock Biología de los microorganismos. Omega. México. 1064 p.
- **Murray R., Williams & Wilkins. (1985)**. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 2 Ed. Seath P. Los Angeles, USA.
- **Novotná J. & Hostálek Z. (1985)**. Phosphorylation of hexoses in *Streptomyces aureofaciens*: evidence that the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system is not operative. *FEMS Microbiol. Lett.* **28**, 347-350.

- **Parajuli N., Basnet DV., Chan-Lee H., Kyung-Sohng J & Liou K. (2004).** Genome analyses of *Streptomyces peucetius* ATCC 27952 for the identification and comparison of cytochrome P450 complement with other *Streptomyces*. *Arch. Biochem. Biophysics*. **425**, 233–241.
- **Pope M., Green B. & Westpheling J. (1996).** The bld mutants of *Streptomyces coelicolor* are defective in the regulation of carbon utilization, morphogenesis and cell-cell signalling. *Mol. Microbiol.* **19**, 747-756.
- **Postma P., Lengeler J & Jacobson G (1993).** Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**, 543–594.
- **Postma P., Lengeler J. & Jacobson G. (1996).** Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria En: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Cellular and Molecular Biology*. Neidhardt, F.C. Ed. Washington, DC: *American Society for Microbiology*, pp. 1149-1174.
- **Ramos I., Guzmán S., Escalante L., Imriskova I., Rodríguez-Sanoja R., Sánchez S. & Langley E. (2004).** The glucose kinase alone cannot be responsible for carbon source regulation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Res. Microbiol.* **155**, 267-274.
- **Reizer J., Bachem S., Reizer A., Arnaud M., Saier M. Jr. & Stülke J. (1999).** Novel phosphotransferase system genes revealed by genome: analysis the complete complement of PTS proteins encoded within the genome of *Bacillus subtilis*. *Microbiology.* **145**, 3419–3429.
- **Sabater B., Sebastian J. & Asensio C. (1972).** Identification and properties of an inducible and highly specific fructokinase from *Streptomyces violaceoruber*. *Biochim. Biophys. Acta.* **284**, 414-420.
- **Sambrook J., Fritsch E. & Maniatis T. (1989).** *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.
- **Segura D., González R., Rodríguez R., Sandoval T., Escalante L. & Sánchez S. (1996).** *Streptomyces* mutants insensitive to glucose repression showed deregulation of primary and secondary metabolism. *Asia. Pac J. Mol. Biol. Biotechnol.* **4**, 30-36.

- **Seok Y., Koo B., Sondej M. & Peterkofsky A. (2001).** Regulation of *E. coli* glycogen phosphorylase activity by HPr. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**(3), 385–393.
- **Simpkins H., Pearlman L. & Thompson L. (1984).** Effects of adriamycin on supercoiled DNA and calf thymus nucleosomes studied with fluorescent probes. *Cancer. Res.* **44**, 614-618.
- **Stülke J. & Hillen W. (2000).** Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 849–880.
- **Titgemeyer F., Walkenhorst J., Reizer J., Stuver M., Cui X. & Saier M. Jr, (1995).** Identification and characterization of phosphoenol-pyruvate: fructose phosphotransferase systems in three *Streptomyces* species. *Microbiology.* **141**, 51-58.
- **Titgemeyer F & Hillen W. (2002).** Global control of sugar metabolism: a Gram-positive solution. *Antonie van Leeuwenhoek.* **82**, 59-71.
- **Tritton T. & Yee A. (1982).** The anticancer agent adriamycin can be actively cytotoxic without entering cell. *Science.* **217**, 248-250.
- **Vandamme E. (1984).** *Biotechnology of industrial antibiotics.* Vol. 22. Marcel Dekker Inc. New York.
- **G. P. Van Wezel, M. König, K. Mahr, H. Nothaft, A. W. Thomas, M. Viv., F. Titgemeyer. (2007).** A new piece of an old jigsaw: glucose kinase is activated posttranslationally in a glucose transport-dependent manner in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology.* **12**, 67–74
- **Wang F., Xiao X., Saito A. & Schremp H. (2002).** *Streptomyces olivaceoviridis* possesses a phosphotransferase system that mediates specific, phosphoenolpyruvate-dependent uptake of N-acetylglucosamine. *Mol. Genet. Genomics.* **268**, 344-351.
- **Wezel G., White J., Young P., Postma P. & Bibb M. (1997).** Substrate induction and glucose repression of maltose utilization by *Streptomyces coelicolor* A3(2) is controlled by malR, a member of the lacI-galR family of regulatory genes. *Mol. Microbiol.* **23**, 537-549.
- **Wezel G, Mahr K., Köning M., Traag B. & Pimentel-Schmitt E. (2005).** GlcP constitutes the major glucose uptake system of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol.* **55**(2), 624–636.

- **White R. & Stroshane R. (1984).** Daunorubicin and adriamycin: properties, biosynthesis and fermentation. E. J. Vandamme Ed. *Biotechnology of Industrial Antibiotics, vol. 22. Marcel Dekker, Inc., New York.* pp. 569-594.
- **Yang C., Huang C., Li C., Tsay Y., Lee S. & Chen C. (2002).** The terminal proteins of linear *Streptomyces* chromosomes and plasmids: a novel class of replication priming proteins. *Mol. Microbiol.* **43**(2), 297.