



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Amplificación y clonación del gen que codifica
para el simportador de glucosa (*glcp1*) en
Streptomyces peucetius var. *caesius*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGO

P R E S E N T A:

JORGE ALEJANDRO VENEGAS REYES

TUTOR: DR. SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL



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.

Solamente esfuérzate y sé muy valiente, para cuidar de hacer conforme a toda la ley que mi siervo te mandó; no te apartes de ella ni a diestra ni a siniestra, para que seas prosperado en todas las cosas que emprendas. (Jos. 1:7)

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 de Química, UNAM
Vocal	M en C. Adán Chávez Castillo	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Secretario	Dr. Sergio Sánchez Esquivel	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Suplente	M en C. Ma. Dolores Ramírez	Instituto Nacional de Salud Pública
Suplente	Ing. Quim. Ángela Forero Forero	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Al Dr. Sergio Sánchez Esquivel, por permitirme ingresar al laboratorio de microbiología industrial y desarrollar este proyecto.

A la Dra. Silvia Guzmán Beltrán, por apoyo necesario en lo académico 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 éste 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.

ESTE TRABAJO ESTÁ DEDICADO A:

Dios por darme la vida que hoy puedo disfrutar en compañía de todos mis seres amados y con la que he podido realizar esto.

Mi Papá; gracias viejo por toda la confianza que has depositado en mi, por heredarme tu coraje y carácter férreo para hacer las cosas, por hacerme entender que no existen imposibles y por toda la sabiduría que me has transmitido en cada tarde; nada de esto se habría logrado sin tu apoyo tanto moral como económico; sabes cuanto te quiero y te admiro; eres un gran hombre, pero sobre todo eres un gran amigo.

Mi mamá por estar siempre allí, cuidándome, por consentirme tanto y por aguantar mi mal humor y mi neurosis; por desmañarte conmigo y cumplirme todos los caprichos; pero sobre todo te agradezco que me hayas llevado con el Dr. Daniel González aquella noche de 1982, porque si tu no me hubieras creído quizá yo estaría en algún hospital psiquiátrico o simplemente ya no estaría aquí.

Yoa, tú me hiciste conocer el amor sincero y desinteresado; gracias por no permitirme renunciar, por estar a mi lado, por apoyarme en todas las formas posibles y por amarme al límite durante estos ocho años. Todo esto también te pertenece; ya que con tu amor, tu entrega y tu dedicación me remolcaste cuando estaba cansado y aburrido. Gracias por llevarme de la mano paso a paso y por ayudarme a alcanzar algo que se veía tan lejano. Te Amo Hormiga.

Catos, has sido un excelente hermano; no olvido todas las veces que me defendiste cuando éramos niños, aunque a veces me desquicias, sabes que te quiero más allá de todos los problemas y diferencias que tenemos. Esto va por ti matador.

Silvia, tú mejor que nadie sabe que sin tu apoyo nada de esto hubiera sido posible. Gracias por todo, aun ya no estando en el laboratorio fuiste el hada madrina de los dos. Eres un gran ser humano y te mereces lo mejor.

Laurita, gracias por quitarme los ataques y las preguntas malintencionadas durante los seminarios; pero sobre todo te agradezco la sabiduría y los conocimientos que me transmitiste durante mi estancia en el laboratorio, eso no tiene precio. Eres una excelente persona.

Mónica, eres una gran mujer y te admiro por tu valentía y tu coraje, pero sobre todo por la nobleza que existe en tu corazón. Gracias por ser mi ángel de la guarda; por estar conmigo en las buenas, en las malas y en las peores; por escucharme y guardar mis secretos; y por tantas cosas que nunca terminaría de enumerar. Eres la mejor amiga que alguien pudiera tener. Tú sabes cuanto te quiero.

Los amigos que se cuentan con los dedos de una mano: Pao, Carlos, Dávila y Omar; por todo el apoyo incondicional, el cariño y la confianza que me han brindado durante tantos años, no los defraudaré.

A toda la gente de Biomédicas que de alguna u otra forma me apoyó durante la realización de este proyecto: Dr. Sergio Sánchez, Adán, Alfredo, Caty, Fore, Dra. Gloria Soberón, Hugo, Jesús, Lalo, MAO, Dra. Ma Elena Flores, Mauricio, Nayarit, Oliver, Paola, Ricardo, Sara, Susana, Tania y Yolis.

A todas las personas que hicieron lo humanamente posible por verme derrotado; porque lejos de hacer daño, me hicieron ver que tengo la casta y el coraje para superar cualquier tormenta.

Amplificación y clonación del gen que codifica para el simportador de glucosa (*glcP1*) en *Streptomyces peucetius* var. *caesius*.

1.	RESUMEN.....	5
2.	ABREVIATURAS.....	6
3.	ANTECEDENTES.....	7
3.1.	Características generales de <i>Streptomyces</i>.....	7
3.1.1.	Ciclo de vida.....	7
3.1.2.	Habitat.....	8
3.1.3.	Genética.....	8
3.1.4.	Importancia económica.....	9
3.2.	<i>Streptomyces peucetius</i> var. <i>caesius</i>.....	9
3.3.	Represión catabólica por carbono.....	10
3.3.1.	Represión catabólica por carbono en <i>Escherichia coli</i>	10
3.3.2.	Represión catabólica por carbono en bacterias Gram Positivas de bajo contenido de G-C.....	12
3.3.3.	Represión catabólica por carbono en el género <i>Streptomyces</i>	13
3.4.	Transporte en bacterias.....	15
3.4.1.	Transporte Activo.....	16
3.4.2.	Sistemas de transporte de carbohidratos en <i>Streptomyces</i>	17
4.	JUSTIFICACIÓN.....	20
5.	OBJETIVOS.....	20
6.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
6.1.	Cepas bacterianas.....	20
6.2.	Aislamiento de DNA genómico de <i>Streptomyces</i>	20
6.3.	Amplificación del gen <i>glcP1</i> de <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i> por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	22
6.4.	Clonación de los fragmentos de PCR obtenidos en el plásmido pGEM-T easy.....	23
6.5.	Transformación.....	25
6.6.	Extracción del plásmido.....	25
6.7.	Análisis del inserto.....	26
7.	RESULTADOS.....	27
7.1.	Purificación del DNA genómico de <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i>	27
7.2.	Amplificación del gen <i>glcP1</i> de <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i> mediante la reacción en cadena de la polimerasa.....	27
7.3.	Análisis de las clonas positivas.....	29
7.4.	Análisis in silico de la secuencia.....	30
8.	DISCUSIÓN.....	36
9.	CONCLUSIONES.....	37
10.	PERSPECTIVAS.....	38
11.	REFERENCIAS.....	39
	ANEXO.....	45

1. RESUMEN

Streptomyces habita con mayor abundancia en el suelo y participa activamente en el reciclaje del carbono degradando la materia orgánica derivada de plantas y animales. Esto es debido a que producen diversas enzimas extracelulares que actúan sobre polímeros insolubles como el almidón, xilano, celulosa, quitina, etc. Además es capaz de utilizar una gran gama de polisacáridos presentes en la materia orgánica. Con relación a esto, se ha demostrado que existen múltiples mecanismos para la incorporación de diversos carbohidratos. Sin embargo la utilización de carbono esta fuertemente controlada, cuando *Streptomyces* crece en presencia de varias fuentes de carbono simultáneamente, los azúcares fácilmente metabolizables, como la glucosa, evitan la utilización de otras fuentes de carbono alternativas, reprimiendo los genes involucrados en su incorporación y metabolismo, inclusive la glucosa reprime la síntesis del metabolismo secundario como la producción de antibióticos.

Con respecto al sistema de control transcripcional ejercido por glucosa, se sabe que los niveles intracelulares de este azúcar podrían determinar si se ejerce represión catabólica, y con ello cambiar la función celular general. Por lo que se sugiere que el transporte de glucosa puede ser un paso determinante para ejercer control metabólico. De este modo, resulta esencial la caracterización de dicho sistema.

Para llevar a cabo esto se clonó el gen *glcP* de *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, el cual codifica para una proteína simportadora de glucosa. Primero se amplificó por PCR utilizando como base la secuencia reportada para *Streptomyces coelicolor*. Se obtuvo un fragmento del tamaño esperado (2020 pb). Posteriormente se llevó a cabo su clonación heteróloga (en el plásmido pGEM-T-Easy en *Escherichia coli*) y se realizó la secuenciación y el análisis del fragmento obtenido. Dicho inserto podría codificar para una proteína simportadora de glucosa de 50.441 kDa y con punto isoeléctrico teórico de 7.76. Cabe resaltar que el producto génico presenta homología con *glcP1* y *glcP2* de *S. coelicolor* (SCO5578 y SCO5173); con SAV2157 de *S. avermitilis* (SAV2157, posible permeasa para L-arabinosa) y con SGR1890 de *S. griseus* (SGR1890, Glk P, posible permeasa de azúcares). Además, pudimos determinar que los genes adyacentes a *glcP* no están relacionados metabólicamente, ya que su función no esta relacionada. Finalmente la organización genética de los homólogos a *glcP* en *Streptomyces*, no es conservada en *S. coelicolor*, *Streptomyces avermitilis* y *Streptomyces griseus*.

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-bis-fosfato
G-6P	Glucosa 6-fosfato
G-6PDH	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
Gk	Glicerol cinasa
GIk	Glucosa cinasa
HPr	Proteína que contiene una histidina como transportadora de fosfato
HPrK/P	HPr cinasa/fosfatasa
NADP	Nicotin adenin dinucleótido fosfato
nt	Nucleotido (s)
ONPG	<i>o</i> -nitrofenil- -galactopiranosido
oriC	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

3. ANTECEDENTES

3.1 Características generales de *Streptomyces*

El género *Streptomyces* pertenece al orden Actinomycetales, el cual está constituido por bacterias miceliales 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).

3.1.1 Ciclo de vida

Este inicia cuando las esporas germinan para formar el micelio vegetativo, son hifas cenocíticas, crecen por extensión apical desarrollando micelio ramificado, el cual, se nutre de compuestos insolubles presentes en el suelo, mediante la producción de una variada gama de enzimas hidrolíticas extracelulares. Una vez que los nutrientes se han agotado, 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 enrollarse y a septarse para dar lugar a la formación de esporas, que generalmente adquieren pigmentación al madurar (Hirsch y col., 1985; Chater, 1998).

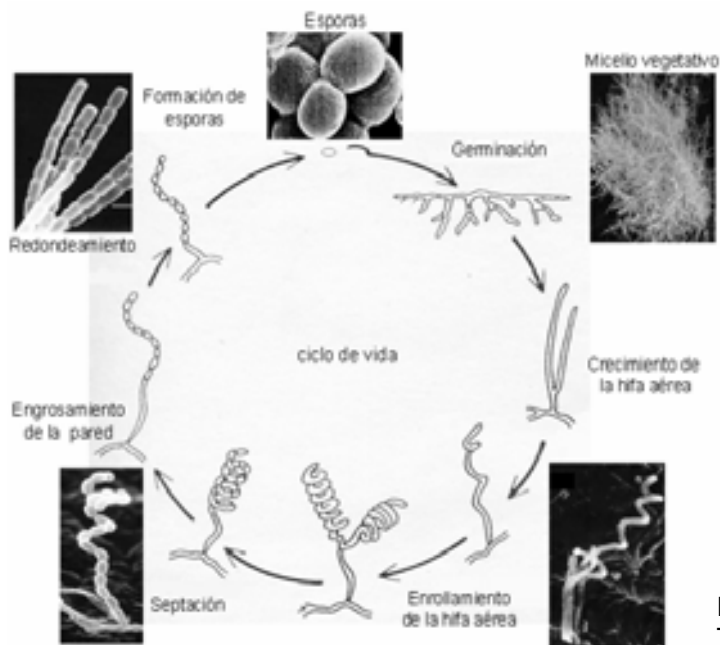


Figura 1. Ciclo de vida de *Streptomyces*. Tomada de Guzmán, 2005.

3.1.2. Habitat

El género *Streptomyces* está ampliamente distribuido en ambientes terrestres y acuáticos. 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 y col., 1985).

3.1.3. Genética

A diferencia de otras bacterias, este género posee un cromosoma lineal (Lin y col., 1993). El tamaño promedio del cromosoma de *Streptomyces* es aproximadamente de 9.0 Mb. La región central es flanqueada por dos brazos, los cuales están sujetos a intensa variabilidad genética. Mientras que la región central (aprox. 6.5 Mb) está altamente conservada en diversas especies de *Streptomyces*. Además se ha demostrado que los genes localizados en esta región son esenciales para la vida de la bacteria (Ikeda y col., 2003; Bentley y col., 2001). Por otro lado, 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 y col., 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 y col., 1998).

3.1.4. Importancia económica

Los actinomicetos son responsables de la producción de dos tercios del total de compuestos bioactivos comerciales utilizados actualmente. Cabe resaltar que dentro de este grupo, el género *Streptomyces* produce del 70 al 80% de estos compuestos (Tabla 1). Además producen

Tabla 1. Metabolitos secundarios producidos por el género *Streptomyces* de interés económico.

Especie	Metabolitos secundarios	Aplicaciones
<i>S. lavendulae</i>	MitimicinaC	Anti-HIV
<i>S. antibioticus</i>	Oleandomicina/Simociclinona	Antibacteriano/Antifungico
<i>S. avermitilis</i>	Filipina	Antifungico
<i>S. fradiae</i>	Tilosina	Antibacteriano
<i>S. hygroscopicus</i>	Rapamicina	Antibacteriano
<i>S. carzinostaticus</i>	Neocarcinostatina	Antitumoral
<i>S. griseolus</i>	7-etoxy coumarina	Antimicrobiano
<i>S. nanchangensis</i>	Nanchangicina	Anticoccidial
<i>S. natalensis</i>	Pimaricina	Antifungico
<i>S. nodosus</i>	Amfotericina	Antifungico
<i>S. noursei</i>	Nistatina	Antifungico
<i>S. tendae</i>	Nikkomicina	Insecticida
<i>S. peucetius</i>	Doxorrubicina	Antitumoral
<i>S. sp. Cepa C5</i>	Daunorrubicina	Antitumoral
<i>S. ansochromogenes</i>	Nikomicina	Insecticida
<i>S. clavuligerus</i>	Ac. Clavulinico	Antibacteriano
<i>S. caelestis</i>	Nidamicina	Antibacteriano
<i>S. cinnamomensis</i>	Monensina	Anticoccidial
<i>S. globisporus</i>	Antibiótico C-1027	Antitumoral
<i>S. narbonensis</i>	Narbomicina	Antifungico
<i>S. spheroides</i>	Novobiocina	Antibacteriano
<i>S. thermotolerans</i>	Carbomicina	Antibacteriano

Tabla tomada de Challis & Hopwood, 2003.

diversas enzimas extracelulares como: celulasas, xilanasas, quitinasas, pectinasas, amilasas, etcétera; con pequeñas contribuciones de otros géneros como *Saccharopolyspora*, *Amycolaptosis*, *Micromonospora* y *Actinoplanes* (Challis & Hopwood, 2003).

3.2. *Streptomyces peucetius* var. *caesius*

S. peucetius var. *caesius* fue obtenido por tratamiento mutagénico a partir de *S. peucetius* (Arcamone y col., 1969). Como ya se ha mencionado, esta mutante produce DXR (C₂₇H₂₉NO₁₁.HCl) un antibiótico policétido del grupo de las antraciclinas. Este antibiótico tiene actividad contra diversos tipos de cáncer como el de mama, ovario, estómago, tiroides, así como el sarcoma de Kaposi, leucemia y linfomas (Vandamme, 1984; Grein, 1987; Hershberger y col., 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 y col., 1975). También se ha reportado que induce rompimientos en los ácidos nucleicos e inhibe a la topoisomerasa II (Simpkins y col., 1984; White & Stroshane, 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).

La producción de DXR, se realiza en medios de cultivo en presencia de 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 y col., 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 y col., 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, que generalmente son los que más fácilmente se metabolizan. A través de este mecanismo de control transcripcional (Titgemeyer y Brückner, 2002), la célula coordina el metabolismo y la obtención de energía, lo cual le permite discriminar y elegir los substratos que le permitan obtener una mayor tasa de crecimiento cuando más de una fuente de carbono se encuentra presente en el medio de cultivo de manera simultánea (Stülke & Hillen, 1999). En los procariontes se ha encontrado que existen diversos mecanismos de RCC; sin embargo, el más común es el sistema de fosfotransferasa dependiente de fosfoenol piruvato (PTS).

3.3.1. Represión catabólica por carbono en *Escherichia coli*.

En *E. coli*, el sistema de fosfotransferasa dependiente de fosfoenol piruvato (PTS) tiene un papel central en la RCC (Saier y Reizer, 1996). El PTS 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 generales la enzima

I (EI) y Hpr. Así como 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 2).

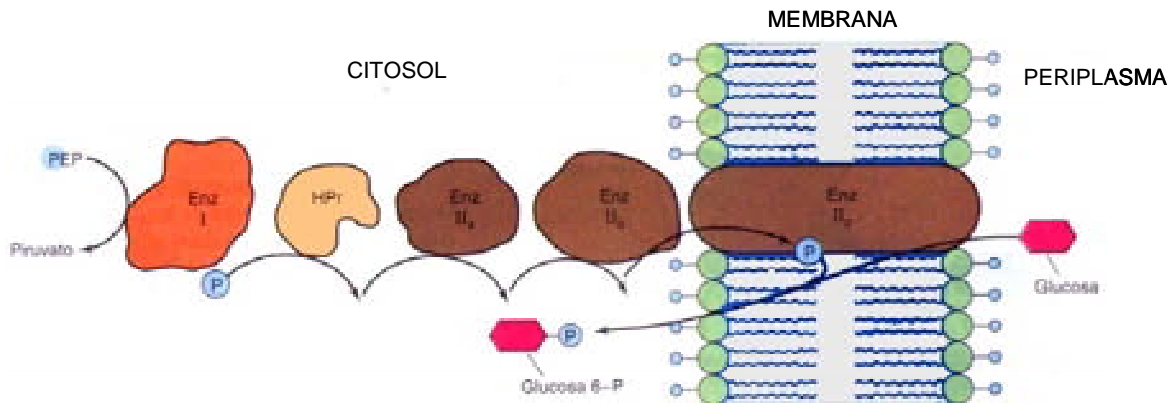


Figura 2. Cadena de fosforilación del sistema PTS, desde el fosfoenol piruvato (PEP) vía EI, HPr, EIIABC hasta la glucosa (Tomada de Madigan y col., 2000).

El PTS transmite señales vía fosforilación a varios blancos celulares, por ejemplo durante el transporte de azúcares mediado por el PTS, el grupo fosfato es transferido del PEP hasta el azúcar. Cuando otras fuentes de carbono son importadas, la $EIIA^{Glu}$ está en su forma no fosforilada. Incluso 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).

En ausencia de glucosa, la enzima $EIIA^{Glu}$ en su forma fosforilada es capaz de estimular a la adenilato ciclasa (Cya) produciendo monofosfato de adenosina 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 en presencia de glucosa, $EIIA^{Glu}$ no se encuentra fosforilada, de esta manera 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).

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

En estas bacterias las enzimas HPr, HPr cinasa/fosfatasa (HPrK/P) y la enzima de control catabólico (CcpA), son las que sensan 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 y col., 1999; Bolotin y col., 2001; Hoskins y col., 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 como GlcT de *Bacillus 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, 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. Además se han detectado otras proteínas como CcpB y CcpC que también participan en la RCC en *B. subtilis* (Brückner y Titgemeyer, 2002; Mahr y col., 2000).

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

En *Streptomyces*, la regulación catabólica por glucosa controla la expresión de genes involucrados en el transporte y en la utilización otras fuentes de carbono, así como la síntesis de enzimas extracelulares y genes del metabolismo secundario (Hodgson, 2000). A pesar de que se ha identificado el PTS en tres especies, éste no está involucrado en la RC por glucosa (Sabater y col., 1972; Novotná y Hostálek, 1985; Titgemeyer y col., 1995; Wang y col., 2002). Tampoco se han reportado fluctuaciones en los niveles de AMPc al cambio de fuente de carbono, como lo observado en *E. coli* (Hodgson, 1994). Además, no se ha detectado actividad de cinasa/fosfatasa (HPrK/P), como ocurre en *B. subtilis* (Gersh y col., 1980; Chatterjee y Vining, 1982). Estos resultados sugieren que el mecanismo de RCC es considerablemente diferente al que existe en *E. coli* y en otras bacterias Gram positivas de bajo contenido de G-C (Postma y col., 1993; Postma y col., 1996).

Por otro lado, se sabe que la detección de los nutrientes y la generación de las señales como estímulo para producir la RCC, está fuertemente ligada a los respectivos sistemas de transporte y a su posterior activación por fosforilación, vía glucosa cinasa (Glk). En *Streptomyces coelicolor* y *S. peuceitius var caesius* se ha propuesto que la Glk tiene una función clave en la RCC, ya que mutantes insensibles a regulación por carbono (RCC⁻) muestran fenotipo Glu⁻ y Glk⁻. Cuando se complementan con el gen que codifica para Glk (glkA) se recupera el fenotipo silvestre (Ikeda y col., 1984; Kwakman & Postma, 1994; Angell y col., 1992; 1994).

Es importante mencionar que existen otros elementos que participan en la RC por glucosa por ejemplo, Ingram y col. (1995) aislaron y caracterizaron la mutante *ccrA1* de *S. coelicolor*, misma que afecta la expresión de varios promotores de operones regulados catabólicamente como: *galP1* (galactosa), *gyl* (glicerol) y *chi63* (quitina) sensibles a glucosa. Fenotípicamente, la mutante (en el locus *ccrA1*), es capaz de utilizar glucosa como única fuente de carbono y es sensible a DOG. Esta mutante muestra alteraciones en la expresión de estos promotores, sin embargo no tienen efecto sobre los promotores insensibles a RCC como el promotor *galP2*. También se observó en estas cepas, que la transcripción de *galP1* y *gyl*, aumenta aproximadamente de 4 a 5 veces en condiciones de represión o no represión. La expresión de *chi63* es muy baja en la cepa silvestre, sin embargo en presencia de la

mutación *ccrA1* aumentó considerablemente, aunque *chi63* aún está sujeta a RCC (Ingram y Westpheling, 1995). Estos resultados sugieren que la mutación *ccrA1* afecta un gen cuyo producto puede estar involucrado en el mecanismo general de regulación por carbono en *S. coelicolor*.

Otras mutantes de *S. coelicolor* incapaces de producir hifas aéreas, conocidas como *bld* (del inglés "bald" que significa calvas), pierden la capacidad de producir antibióticos y sensibilidad a RCC (Champness, 1988; Pope y col., 1996).

También se ha reportado que en *Streptomyces*, existen elementos proteicos que participan directamente en la RCC como MalR de *S. coelicolor* A3(2), codifica para una proteína represora homóloga a la familia LacI/GalR. La transcripción de *malE* (gen requerido para la utilización de maltosa) es inducida por maltosa y reprimida por glucosa. La interrupción o delección del *malR* provoca una expresión constitutiva e insensibilidad a glucosa de *malE* (Wezel y col., 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 y col., 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).

A pesar de que la RC por glucosa no se ha caracterizado totalmente a nivel molecular, se sabe que la incorporación de este carbohidrato y su catabolismo generan señales que sirven como estímulo para generar regulación transcripcional negativa. En *S. coelicolor* y *S. peucetius* var. *caesius* se ha propuesto que además de la Glk, existe una proteína (codificada por un gen adyacente a *glkA*, llamado SCO2127 por su ubicación en el genoma de *S. coelicolor*) que podría controlar el metabolismo de glucosa (Angell y col., 1994; Guzmán y col. 2005a). Además se demostró 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, hay mayor incorporación y fosforilación del carbohidrato, aumentando los niveles de intermediarios glucolíticos.

Posiblemente estos metabolitos pudieran unirse a represores (aporrepresores) formando complejos de regulación, que eviten la expresión de genes sensibles a RCC en *S. peuceitius* var. *caesius*, tal como sucede en el género *Bacillus* (Jault y col., 2000). Con base a las evidencias conocidas acerca de los elementos que participan en la RC por glucosa se propuso un mecanismo general en *Streptomyces* (Guzmán, 2005). En la figura 3 se ilustran el modelo de la RCC en el género *Streptomyces*.

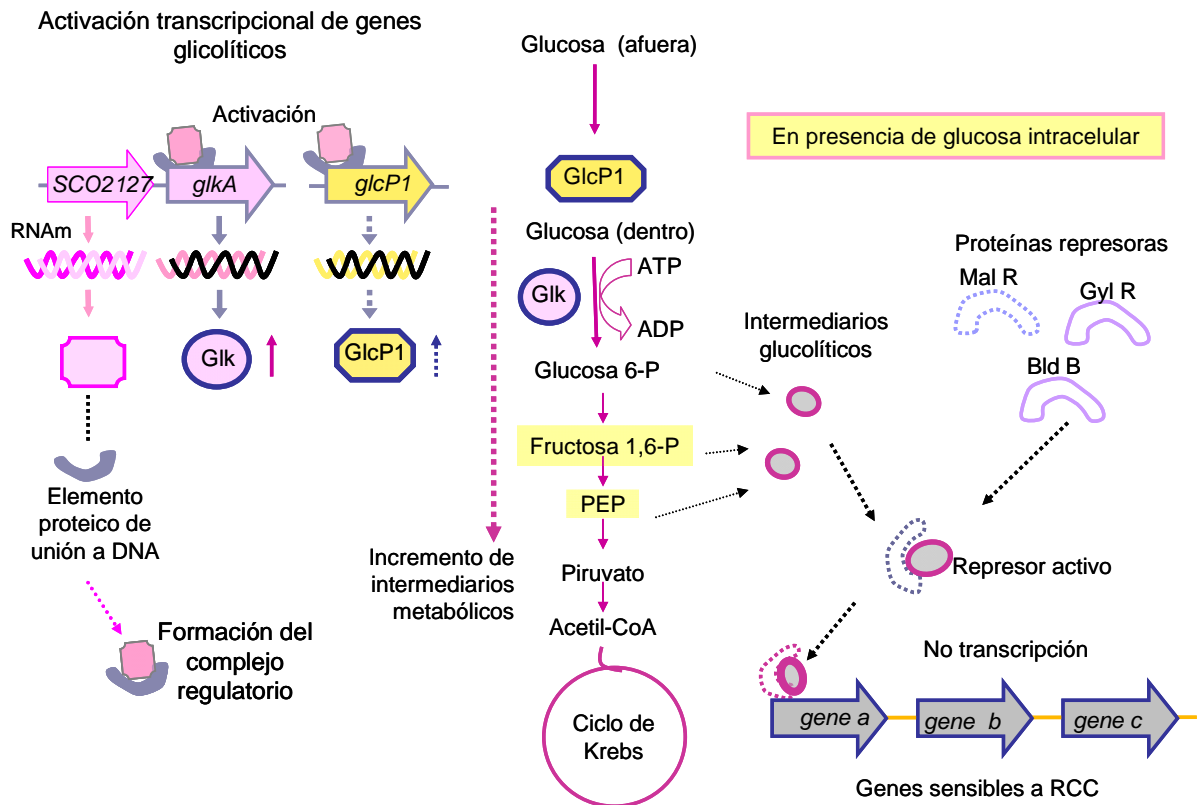


Figura 3. Modelo propuesto para explicar el mecanismo de RCC en *Streptomyces*. Las líneas sólidas representan los pasos que se tiene evidencia experimental y las líneas discontinuas representan posibles procesos presentes en la RCC. glk, glucosa cinasa; glcP1, simportador de glucosa, Mal R, represor de maltosa; Gyl R, represor de glicerol; Bld B, represor de diferenciación (Tomada de Guzmán, 2005).

3.4 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 y col, 2000). El transporte de moléculas a través de la membrana puede ser llevado a

cabo por difusión facilitada, el cual no requiere energía o el transporte activo, el cual involucra gasto de energía.

Existen diversos 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 ejemplo: los simportadores transportan dos sustancias en la misma dirección y los antiportadores tienen la capacidad de mover dos solutos en direcciones opuestas (Figura 4).

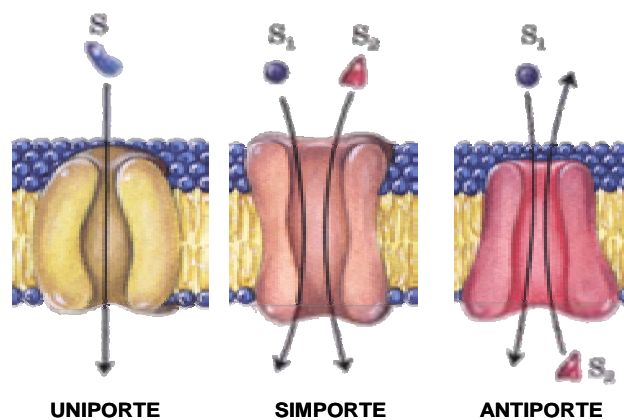


Figura 4. Sistemas de transporte en bacterias. (S₁ y S₂ = soluto). (Modificada de Nelson y Cox, 2000).

3.4.1. 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. La energía puede proceder de compuestos fosforilados de alta energía, como el trifosfato de adenosina (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.

Los dos sistemas asociados al consumo de energía son: el transporte que depende de ATP, en cual se puede acumular moléculas en altas concentraciones en el interior sin sufrir ninguna modificación química, llamado ABC y el transporte que al incorporar una molécula, simultáneamente se modifica químicamente, generalmente por fosforilación, llamada transporte por translocación de grupo, como el PTS que ya se ha descrito en detalle anteriormente (Madigan y col., 2000).

3.4.1.1. Sistema ABC

El sistema ABC (por sus siglas en inglés **ATP-Binding Casete**), esta conformado por un complejo protéico. Su nombre se debe a que posee un dominio periférico de membrana que presenta un sitio de unión a ATP muy conservado evolutivamente denominado, "cassette de unión a ATP". Además, esta constituido por otros componentes intramembranales que captan el sustrato con gran afinidad (dominio E) y lo llevan hasta otra 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), mismo que activa la hidrólisis de ATP y acopla la energía para el paso de la molécula al citoplasma (Davidson y Maloney, 2007)

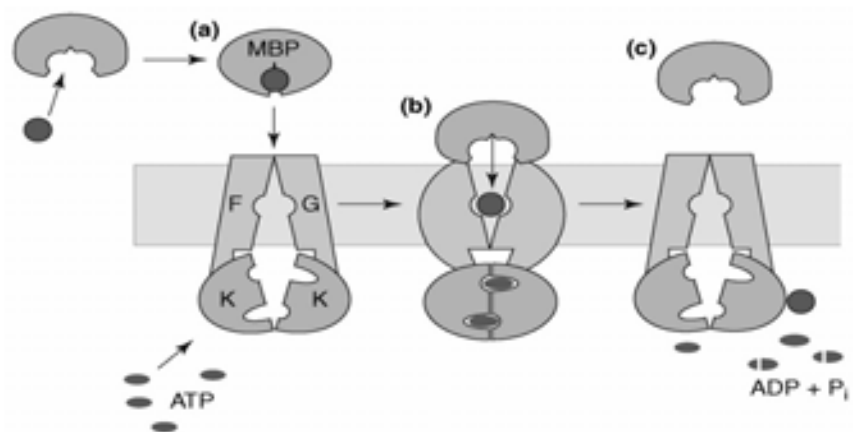


Figura 5. Modelo del sistema ABC. (a) La proteína de unión a maltosa (MBP) acarrea el azúcar hacia el dominio transmembranal (TM) constituido por F y G . (b) Posteriormente hay una Interacción de MBP, TM y el dominio de unión a ATP, formado por subunidades llamadas K (ATP casette). Ésta ultima estabiliza el cambio conformacional en todo el sistema transportador, lo que activa la hidrólisis de ATP y la incorporación simultanea del carbohidrato.(c) Finalmente MBP, TM y el dominio de unión a ATP se liberan. Tomada de (Davidson y Maloney, 2007).

3.4.2. Sistemas de transporte de carbohidratos en *Streptomyces*

Recientemente se realizó un análisis del genoma de *S. coelicolor*, en el cual, se predijo la existencia de diversos mecanismos para la incorporación de carbohidratos como: el PTS, el sistema ABC, el simporte y el transporte facilitado. El 60% de su genoma esta involucrado en el transporte de carbohidratos. Esta gran diversidad de mecanismos para la incorporación de carbohidratos refleja la capacidad tan alta de los

estreptomycetos, para utilizar un sinnúmero de polisacáridos presentes en la materia orgánica (Bertram y *col.*, 2004). El PTS permite la incorporación de fructosa y N-acetilglucosamina. El ABC transporta maltodextrinas, xilósidos, glucósidos, quitobiosa, lactosa, ribosa, etc, por último, el transporte facilitado para la incorporación de galactosa y glicerol y el simporte para glucosa. En la figura 14 se esquematiza los sistemas antes descritos (Bertram y *col.*, 2004).

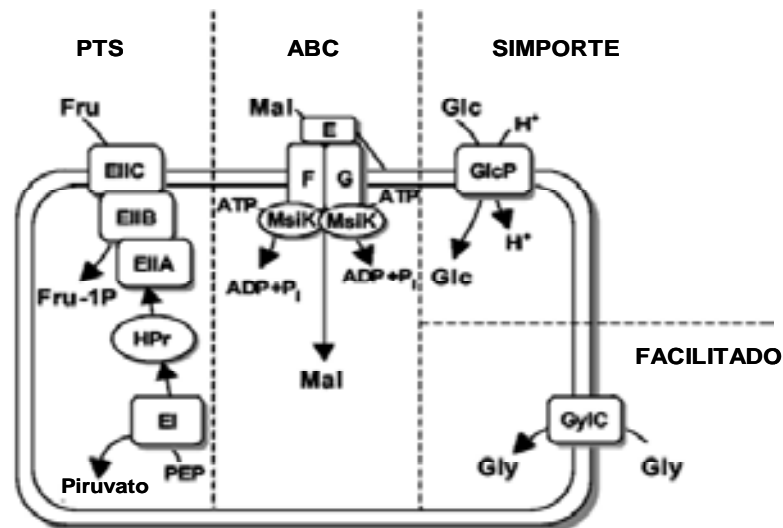


Figura 6. Esquema de los sistemas representativos de incorporación de carbohidratos en *S. coelicolor*. PTS para fructosa (Fru), ABC para maltosa (Mal), Simporte para glucosa (Glc) y difusión facilitada para glicerol (Gly). Abreviaturas: E, MalE; F, MalF; G, MalG; EIIA, enzima IIA; EIIB, enzima IIB; EIIC, enzima IIC; PEP, fosfoenol piruvato (Tomada de Bertram y *col.*, 2004).

3.4.2.1 Transporte de Glucosa

La glucosa es la fuente de carbono más fácilmente metabolizable en el género *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. (Ramos y *col.*, 2004; Bertram y *col.*, 2004; Guzmán y *col.*, 2005).

Al respecto se ha demostrado que su transporte es inducido por glucosa y al analizar el genoma 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 y *col.*, 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 gen se originó por duplicación de *glcP1*. Cabe mencionar que en *S. avermitilis* existe un gen homólogo a *glcP1* (SAV2657) con 68% de identidad en la secuencia de aminoácidos.

Cabe resaltar los *glcP* no están relacionados metabólicamente con los genes adyacentes. Por un lado, *glcP1* esta flanqueada por 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*).

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 genera una disminución significativa en el transporte de glucosa, esto ultimo sugiere un sistema alterno (Wezel y col., 2005).

Además, se llevó a cabo la expresión heteróloga de *glcP* en *E. coli*, donde las evidencias experimentales sugieren que es una proteína simportadora dependiente de H^+ . Además 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 2-desoxiglucosa, un análogo de la glucosa no metabolizable, pero es incapaz de transportar fructosa, lo que lo hace un sistema específico para glucosa (Wezel y col., 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 *Streptomyces violaceoruber* (Sabater y Asensio 1973; Hodgson, 1982, Wezel y col., 2005). Además, *Streptomyces lividans* también posee un sistema de alta y otro de baja afinidad como en *S. coelicolor*, mientras que en *Streptomyces clavuligerus* posee un sistema de transporte de azúcares generalizado que depende de la fuerza protón motriz (García-Domínguez y col., 1989).

4. JUSTIFICACIÓN

En *Streptomyces*, la presencia de altas concentraciones de glucosa intracelular, evitan la expresión de genes involucrados en el transporte de otros carbohidratos, así como la síntesis de diversos metabolitos secundarios de interés industrial. En nuestro grupo de trabajo se ha obtenido evidencia experimental que involucra a la enzima glucosa cinasa y al sistema de transporte de glucosa (GlcP) en el proceso de RCC (Ramos y col., 2004; Bertram y col., 2004; Guzmán y col., 2005).

Por otro lado GlcP es el sistema de transporte de glucosa más importante para mantener el crecimiento óptimo en *S. coelicolor*. Cabe resaltar que esta proteína está muy conservada en este género. Por esta razón en este trabajo se pretende clonar el gen homólogo de GlcP en *S. peucetius var. caesius* y hacer un análisis comparativo con otros estreptomicetos. Se piensa que la clonación del gen nos permitirá caracterizar a nivel molecular la proteína, su regulación y establecer claramente su relación con la RCC.

5. OBJETIVOS

- i. Amplificar y clonar el gen *glcP* de *S. peucetius var. caesius* en el plásmido pGEM®-T Easy Vector.

- ii. Analizar de la secuencia de *glcP* y hacer un estudio comparativo con otros *Streptomyces*

6. MATERIAL Y MÉTODOS.

6.1 Cepas bacterianas

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

6.2 Aislamiento de DNA genómico de *Streptomyces*

Se inoculó un matraz (125 ml) con 25 ml de medio TSB (triptona de soya 3 g [Obtenido de Oxid No. CM129] en 100 ml de agua destilada) con una asada de *S. peucetius* var. *caesius* y se incubó a 29° C con agitación constante (200 rpm) durante 48 h. Posteriormente se lavó el micelio 2 veces con solución salina isotónica, esto se llevó a cabo centrifugando el cultivo a 10,000 rpm durante 15 min, después se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 5 ml de solución salina al 0.85% y se repitió el procedimiento. A continuación se homogeneizó el pellet con 5 ml de TSB y se tomó 1 ml de la suspensión celular para inocular dos matraces de 250 ml con 50 ml de medio TSB mas 0.5% de glicina y los cultivos se dejaron incubar a 29° C durante 48 h para la extracción de DNA total (Modificado de Kieser y col., 2000).

Transcurrido el tiempo de incubación, el micelio se lavó dos veces con 20 ml de sacarosa al 10.3% y se resuspendió en 15 ml de amortiguador P, pH 7.2 (Sacarosa, 10.3%; K₂ SO₄, 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 KH₂PO₄, 0.05%; CaCl₂.2H₂O, 3.68%; Buffer TES, 5.73% y lisozima 2.0 mg/ ml. La suspensión anterior se incubó a 37 °C durante 60 min, mezclando por inversión cada 15 min, luego se centrifugó durante 10 min adicionales a 8000 rpm; se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet 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 homogeneidad 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, adicionando un vol 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 vol de 4 a 5 ml de agua ultrapura y se agregó RNasa en una relación de 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, se adicionó un vol de fenol-cloroformo (v/v) y se homogeneizó 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 volúmenes de etanol absoluto; se centrifugó y se decantó el sobrenadante. El pellet 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 y col., 1989).

6.3. Amplificación del gen *glcP1* de *S. peucetius* var. *caesius* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los genes se amplificaron por PCR usando como templado el DNA total de *S. peucetius*. Los cebadores utilizados se diseñaron con base en la secuencia proporcionada por el Dr. Sohng (datos no publicados), mostrada en la figura siguiente; los cuales cubren la región codificante del gen (1.422 kb).

GTGACCAGCACTGCGCAGCCGCCACCGGCATCGGGAGCCCGCTCGGCCCGGCCGAACACCTCGGGCAGGTCATCTTCATCACGGCCGCCCGCGATGGGCGGCTTCTCTTCGGTTACGACAGTTCGGTGATCAACGGCGCCGTCGAAGCCATCCGGGACCGCTACGACATCGGCTCCGGGACGCTCGCCCAGGTCATCGCCATCGCCCTGATCGGCTGCGCCATCGGCGCCGCCACCGCCGGCCGGATCGCCGACCGCATCGGACGCATCCGGTGCA TGCAGATCGCGGCCGTGCTCTTACCCTCAGCGCCGTCGGCTCGGCGCTCCCGTTCGCGCTGTGGGACCTCGCCCTGTGGCGGATCGTTCGGCGGCTTCGCCATCGGCATGGCCTCCGTCATCGGCCCGCCCTACATCGCGGAGGTCTCCCCGCCCGCTACCGCGGACGCTCGCCTCCTTCCAGCAGGCCGCGATCGTCATCGGCATCGCCGTCTCCAGCTGGTGAACCTACGCCATCCTGCAGCTCGCCGACGGTGAGCAGCGCGGTGAGATCGGCGGCCTCGAGGGCTGGCAGTGGATGCTCGGGCGTGATGGTTCGTCGCCGGCCGTGCTCTACGGCCTGCTGTCTTCGCCATCCCCGAGTCCCCCGCTTCTTCATCTCCGTTCGGCAAGGTCGACAAGGCGAAGCAGGTCCTCTCCGAGGTCGAGGGCAAGAAGCTCGACCTCAACGCCCGCATCATCGAGATCGACCACGCGATGCGCCGCGAGCA CAAGTCCGCGTTCAAGGACCTGCTCGGCAGCCGCTTCGGCTTCTGCCCATCGTCTGGGTGGGCATCGGGCTCTCGGTCTTCCAGCAGCTCGTTCGGCATCAATGTCGCCCTTCTACTACTCGGCGACCCGTGTGGCAGTCGGTGGCGCTCGACCCGTCCAGCTCGTTCCTTACTCGTTCACCACGTCGATCATCAACATCATCGGCACCGTGATCGCGATGGTGGTGGTGGACCGGATCGGCCGAGGCCGCTCGCGCTCATCGGCTCCACCGGTATGGCGATCGCGCTGGCCCTGGAGGCTGGGCCCTTCTCCGCCGACCTCGTTCGACGGCAAGCTGCCGAGACCCAGG GCATCGTCCCGCTGATCGCCGCCACGCTTTCGTGCTCTTCTTCGCGCTCTCGTGGGGCGTCTGTGGTCTGGTCTTCTTCGGCGAGATGTTCCCGAACCGGATCCGCGCCGAGCCCTCGGCGTCCCGCCTCCGCGCAGTGGATCGGAACTGGGCCATCACCGCGAGCTTCCCGAGCCTCGCGGACTGGAACCTCTCCGGCACCTACGTGATCTACACGGTCTTCGCCGTGCTCTCGATCCCCCTTCGTACTCAGGTACGTCAAGGAGACGAAGGGCAA GGCGTTGGAGGAGATGGGC**TAA**

Figura 7. Secuencia de la región codificante del transportador de glucosa de *S. peucetius*, el cual es homólogo a *glcP1* de *S. coelicolor*

La región amplificada cubrió 300 pb de ambos extremos del inicio de la traducción. El producto esperado fue de 2.022 kb. Los oligonucleótidos que se utilizaron fueron: Forward (GAGGTCGCGGACGCCCTGTA) y Reverse (CGGCGAGCACTTCCTGCACG). El sistema de reacción se describe en la tabla 2.

Tabla 2. 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 55, 56, 58, 60 y 62 °C para el alineamiento, 1 min a 72°C para la polimerización. Por último, una exposición adicional de extensión de 5 min a 72°C.

Los fragmentos obtenidos fueron analizados por electroforesis en condiciones estándar (Sambrook y col., 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.

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

El pGEM-T easy (ver anexo), es un plásmido de alto número de copias utilizado para clonar productos de PCR. El sitio de inserción del fragmento está flanqueado de timina que aparea con la adenina que ha sido añadida al fragmento amplificado por la AmpliTaQ DNA polimerasa. Además 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 está insertado en el gen *lacZ*, (β-galactosidasa), el cual permite que la selección de las clonas positivas sea más 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).

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
Amortiguador 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	X 5 µl*	-	-
Inserto Control de DNA	-	2 µl	-
DNA Ligasa T4 (3 unidades/µl)	1 µl	1 µl	1 µl
Agua desionizada a un vol final de	10 µl	10 µl	10 µl

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

Cabe resaltar que primero prepararon las células electrocompetentes, para ello se tomaron 50 µl del cultivo semilla en 40% de glicerol de *E. coli* de la cepa TOP 10 y se transfirió a 25 ml de medio de cultivo LB (triptona, 1%; extracto de levadura, 0.5%; NaCl, 0.5%; pH 7.0 ajustado con NaOH 1N) y se incubó 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 a 37° C, con agitación.

Posteriormente, las células competentes se inocularon en 500 ml de medio LB en un matraz Fernbach de 2 L, con 1/100 vol del cultivo anterior y se incubó con agitación a 37° C, hasta que se alcanzó una densidad óptica (OD) de 0.500 a 540 nm. Luego las células se obtuvieron por centrifugación a 6000 rpm durante 15 min a 4 °C, utilizando la centrífuga Beckman con un rotor JA-14.

El sobrenadante se eliminó y el pellet celular se resuspendió en un volumen 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 congeló rápidamente utilizando un baño de etanol con hielo seco y finalmente se almacenó a -70° C.

6.5 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 1250 V 0.4 s, adicionando 1 ml de medio **SOC** (2 g de triptona; 0.5 g de extracto de levadura, 1 ml de NaCl 1 M, 0.25 ml de KCl 1 M en 100 ml de agua destilada. Posteriormente se adicionó 1 ml de una solución stock de Mg^{2+} 2 M [20.33 % $MgCl_2 \bullet 6H_2O$ y 24.65 % $MgSO_4 \bullet 7H_2O$] y 1 ml de glucosa 2 M) y la suspensión se incubó 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 sembraron nuevamente bajo las mismas condiciones.

6.6. Extracción del plásmido.

Para corroborar la presencia del inserto en pGEM-T-Easy, se aisló el plásmido a 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 (1 g de triptona; 0.5 g extracto de levadura; 0.5 g NaCl; 0.1 g glucosa en 100 ml de agua destilada) con una asada de una sola colonia, 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 pellet se resuspendió en 100 μ l de solución I (Glucosa 50 mM; Tris 25 mM pH 8; EDTA 10 mM, pH 8). Posteriormente se agregaron 200 μ l de la solución II (NaOH 0.2 N en SDS 1%), se mezcló por inversión 5 veces, luego se colocó en hielo durante 5 minutos. Concluido este periodo, se agregaron 150 μ l de una 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 pellet se lavó con 1 ml de etanol al 70%. Las muestras se centrifugaron y el pellet se dejó secar en el horno de hibridación a 50° C durante 10 min. Finalmente, el DNA plasmídico se resuspendió en 30 µl de agua ultra pura. Se agregó RNasa a una concentración final de 50 µg/ml y se incubó a 37° C durante 30 min, luego se agregó pronasa (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 pellet obtenido se limpió con 1 ml de etanol absoluto y se dejó secar en el horno de hibridación a 50° C. Finalmente, el pellet se resuspendió en 50 µl de agua ultra pura.

6.7. Análisis del inserto

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 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>

7. RESULTADOS

7.1 Purificación del DNA genómico de *S. peucetius* var. *caesius*.

Para llevar a cabo la amplificación del gen *glcp1*, primero se obtuvo el DNA total y se evaluó la integridad por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Como se observa en la Fig. 8, no hubo degradación durante el proceso de purificación. La pureza del DNA fue óptima, ya que la relación de absorbancias 260/280 fue mayor a 1.8, lo que indica una baja cantidad de proteínas.

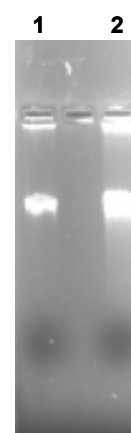


Figura 8. Análisis del DNA total de *S. peucetius* var. *caesius*. La pureza y concentración del DNA se corroboró por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1 dilución 1:100, carril 2 dilución

7.2 Amplificación del gen *glcp1* de *S. peucetius* var. *caesius* mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

Para amplificar el *glcp1* de *S. peucetius* var. *caesius*, se diseñaron un par de oligonucleótidos con base en la secuencia de *S. peucetius* proporcionada por el Dr. Sohng (datos no publicados). 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 55, 56, 58, 60 y 62° C para el alineamiento; 1 min a 72° C para la polimerización;. Por último, una exposición adicional de extensión de 5 min a 72° C. El tamaño estimado del fragmento es de 2.022 kb, en la figura 9 se muestran los resultados del patrón electroforético de los amplicones obtenidos.

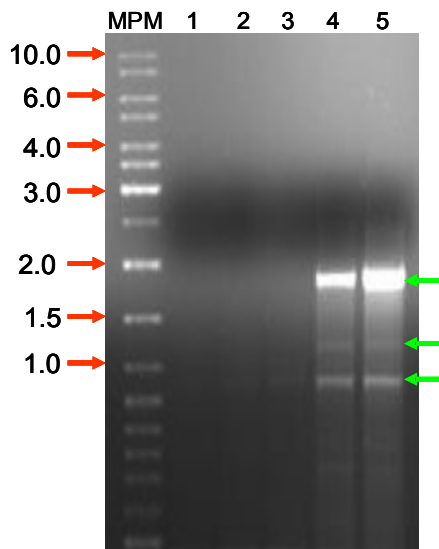


Figura 9. Análisis electroforético del producto de PCR de *S. peucetius* var. *caesius*. (MPM), Marcador de peso molecular, 1 kb ladder de Fermentas; (1-5) amplicones a diferentes temperaturas de alineamiento. (1) 56° C; (2), 62° C; (3), 60° C; (4), 58° C y (5) 55° C. Las flechas verdes indican las tres bandas obtenidas del PCR

Se puede observar que amplificaron 3 bandas (marcadas con flechas verdes), pero solo una banda fue la más intensa, la cual corresponde al tamaño esperado (2.02 kb), por ello se decidió solo purificar esta banda.

La banda de interés se cortó y se purificó 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 (ver figura 10).

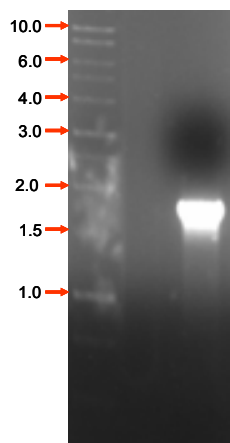


Figura 10 análisis electroforético del producto de PCR de *S. peucetius* var. *caesius* (2), MPM 1 kb ladder de Fermentas (3).

En la figura 10 se puede apreciar la calidad y la pureza del fragmento. A partir de este fragmento obtenido se llevó a cabo la clonación en el plásmido pGEM®- T Easy Vector, según las especificaciones del proveedor (PROMEGA).

7.3 Análisis de las clonas positivas.

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 enzimas de restricción. *Eco RI*, el cual libera el inserto. Posteriormente se realizó el análisis electroforético.

Como se puede observar en la figura 11. Las clonas que se encuentran en los carriles 3, 4, y 7 poseen el fragmento con el tamaño esperado (2.02 kb), por ello se descartaron el resto de las clonas para su análisis, mientras que las clonas positivas se utilizaron y se conservaron para posteriores estudios.

7.4 Análisis in silico de la secuencia

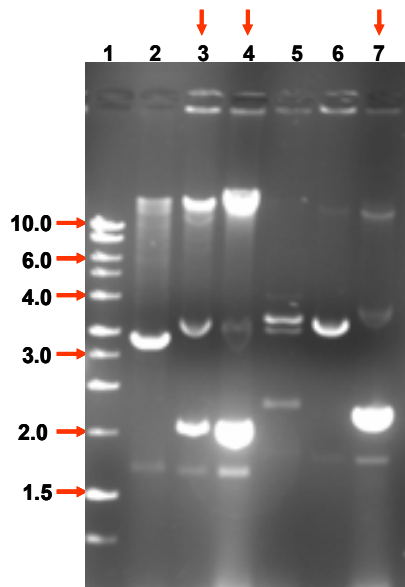


Figura 11. Análisis electroforético del plásmido de las clonas positivas. El plásmido fue digerido con *Eco RI*. Carril 1 MPM; 2-7, clonas 1- 6

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, la cual se muestra en la figura 12. El fragmento obtenido muestra un 78% de G-C. Además se predijo el posible marco de lectura abierto, el cual se ilustra en esa misma figura.

En el análisis teórico de la secuencia de aminoácidos nos indica que esta constituida por 473 residuos, con peso molecular de 50441.0 Da y con punto isoeléctrico teórico de 7.76. En la tabla 4, se enlista la constitución de residuos de aminoácidos y el porcentaje de cada uno.

También se obtuvieron características teóricas del polipéptido, como su composición atómica, su peso molecular y su estabilidad en el citoplasma (Tabla 5). Cabe resaltar que aparentemente este transportador se caracteriza por ser estable en bacterias, ya que se estima que tiene un tiempo de vida media de aproximadamente 10 h (ver tabla 5).

Por otro lado, también se pudo determinar que es un transportador altamente conservado ya que presenta de 84-87% de identidad en *S. coelicolor*, *S. avermitilis* y *S. griseus*. Cabe resaltar que se realizó un alineamiento y una comparación de la

secuencia de aminoácidos entre estas especies y la obtenida para *S. peucetius* var. *caesius*. En la tabla 6 así como en la figura 13, se

```

1      GGTCGCGGACGCCCTGTACGGCGTCTCGATGCAGGGCGACGGTGTCTCCAAGGTCATCAG
61     CCAGCGTCTGCGCTGACGTTGTGCTGCCGCTGCGCCCTTATTCAAGACTTGAAGGCAAC
121    GTGACTCGCCGTTGCTGAAATTGAATCTGCGCAGGGTCTTGACTTCGAAACTTGAAGGA
1      G M T S T A Q P P P A S G A R S A R P E
181    ATAGTCTCTGCAACGTTCTTTTACCTTCAAGTGGTGCCCGTCGTGAAGCTGTGCGCCAC
21     H L G H V I F I T A A A A M G G F L F G
241    TTGAGGGGCTCGCCCCACACGCCCCGGCGACGCTGCCGGACGGCCCCAGGAGTACACGTG
41     Y D S S V I N G A V E A I R D R Y D I G
301    ACCAGCACTGCGCAGCCGCCACCGGCATCGGGAGCCCGCTCGGCCCGGCCCGAACACCTC
61     S G T L A Q V I A I A L I G C A I G A A
361    GGGACGTCATCTTCATCAGGCCGCGCGATGGGCGGCTTCTCTTCGTTACGAC
81     T A G R I A D R I G R I R C M Q I A A V
421    AGTTCGGTGATCAACGGCGCCGTCGAAGCCATCCGGGACCGCTACGACATCGGCTCCGGG
101    L F T V S A V G S A L P F A L W D L A L
481    ACGCTCGCCAGGTCATCGCCATCGCCCTGATCGGCTGCGCCATCGGCGCCGCCACCGCC
121    W R I V G G F A I G M A S V I G P A Y I
541    GGCCGGATCGCCACCGCATCGGACGCATCCGGTGATGCAGATCGGCGCCGTGCTCTTC
141    A E V S P P A Y R G R L A S F Q Q A A I
601    ACCGTGACGCGCGTCGGCTCGGCGCTCCCGTTCGCGCTGTGGGACCTCGCCCTGTGGCGG
161    V I G I A V S Q L V N Y A I L Q L A D G
661    ATCGTCGGCGGCTTCGCCATCGGCATGGCCTCCGTTCATCGGCCCGCCTACATCGCGGAG
181    E Q R G E I G G L E A W Q W M L G V M V
721    GTCTCCCCGCCCCCTACCGCGGACGCCTCGCCTCCTTCCAGCAGGCCGCGATCGTCATC
201    V P A V L Y G L L S F A I P E S P R F L
781    GGCATCGCCGTCTCCAGTGGTGAACACTCGCCATCCTGCAGCTCGCCGACGGTGAGCAG
221    I S V G K V D K A K Q V L S E V E G K N
841    CGCGGTGAGATCGGCGGCCTCGAGGCGTGGCAGTGGATGCTCGGCGTATGGTTCGTCGGC
241    V D L N A R I I E I D H A M R R E H K S
901    GCCGTGCTCTACGGCCTGCTGTCTTCGCCATCCCCGAGTCCCCCGCTTCTCATCTCC
261    A F K D L L G S R F G F L P I V W V G I
961    GTCGGCAAGGTCGACAAGGCGAAGCAGGTCCTCTCCGAGGTCGAGGGCAAGAACGTCGAC
281    G L S V F Q Q L V G I N V A F Y Y S A T
1021   CTCAACGCCCCGATCATCGAGATCGACCACGCGATGCGCCGCGAGCACAAGTCCGCGTTC
301    L W Q S V G V D P S S S F L Y S F T T S
1081   AAGGACCTGCTCGGCAGCCGCTTCGGCTTCTGCCCATCGTCTGGGTCCGGCATCGGGCTC
321    I I N I I G T V I A M V L V D R I G R R
1141   TCGGTCTTCCAGCAGCTCGTCGGCATCAATGTGCTTCTACTACTCGGCGACCCGTGG
341    P L A L I G S T G M A I A L A L E A W A
1201   CAGTCGGTGGGCGTCGACCCGTCAGCTCGTTCTACTCGTTCACCACGTCGATCATC
361    F S A D L V D G K L P E T Q G I V A L I
1261   AACATCATCGGCACCGTGATCGCGATGGTGTGTTGGACCGGATCGGCCGAGGCCGCTC
381    A A H V F V L F F A L S W G V V V W V F
1321   GCGCTCATCGGCTCCACCGGTATGGCGATCGCGCTGGCCCTGGAGGCTGGGCCTTCTCC
401    L G E M F P N R I R A A L G V A A S A
1381   GCCGACCTCGTCGACGGCAAGCTGCGGAGACCCAGGGCATCGTCGCCCTGATCGCCGCC
421    Q W I A N W A I T A S F P S L A D W N L
1441   CACGTCTTCGTGCTCTTCTTCGCGCTCTCGTGGGGCGTGGTGTGGTCTGGGTCTTCTCCGCG
441    S G T Y V I Y T V A V L S I P F V L R Y
1501   GAGATGTTCCCGAACCGGATCCGCGCCGAGCCCTCGGGCTCGCCGCTCCGCGCAGTGG
461    V K E T K G K A L E E M G
1561   ATCGCGAACTGGGCCATCACCGGAGCTTCCCGAGCCTCGCGGACTGGAACCTCTCCGGC
1621   ACCTACGTGATCTACACGGTCTTCGCCGTGCTCTCGATCCCTTCGTAATCAGGTACGTC
1681   AAGGAGACGAAGGGCAAGGCGTTGGAGGAGATGGGTAATCCCCGCTGCCCTCTCTCCG
1741   CCACGGAAGTCCCCGGCTCAGCGCGTGAGCCGGGGCAGTACGTGTTCCGAGAGCAGTTG
1801   GA

```

Figura 12. Secuencia de nucleótidos obtenida y **secuencia de aminoácidos teórica** del polipéptido de *S. peucetius* var. *caesius*.

En el análisis teórico de la secuencia de aminoácidos se obtuvo que esta constituida por 473 residuos, con peso molecular de 50441.0 Da y con punto isoelectrico teórico

de 7.76. En la siguiente tabla se enlista la constitución de residuos de aa y el porcentaje de cada uno.

Tabla 4. Composición de aminoácidos			
Composición		Número de residuos	Porcentaje
Ala	(A)	68	14.4%
Arg	(R)	23	4.9%
Asn	(N)	9	1.9%
Asp	(D)	15	3.2%
Cys	(C)	2	0.4%
Gln	(Q)	15	3.2%
Glu	(E)	17	3.6%
Gly	(G)	45	9.5%
His	(H)	5	1.1%
Ile	(I)	45	9.5%
Leu	(L)	45	9.5%
Lys	(K)	10	2.1%
Met	(M)	11	2.3%
Phe	(F)	25	5.3%
Pro	(P)	18	3.8%
Ser	(S)	34	7.2%
Thr	(T)	16	3.4%
Trp	(W)	12	2.5%
Tyr	(Y)	12	2.5%
Val	(V)	46	9.7%
Pyl	(O)	0	0.0%
Sec	(U)	0	0.0%

También se obtuvieron características teóricas del polipéptido, como su composición atómica, su peso molecular y su estabilidad en el citoplasma. Cabe resaltar que aparentemente este transportador se caracteriza por ser estable en bacterias, ya que se estima que tiene un tiempo de vida media de 10 horas (tabla 5).

Tabla 5: Características del polipéptido teórico

Formula Condensada:	$C_{2330}H_{3650}N_{598}O_{624}S_{13}$	
Composición atómica:		
Carbono	C	2330
Hidrogeno	H	3650
Nitrogeno	N	598
Oxigeno	O	624
Azufre	S	13
Numero total de átomos:	7215	
Tiempo de vida media:	10 horas en bacterias (<i>Escherichia coli</i> , <i>in vivo</i>). Además considerada como estable	

Con base a este análisis comparativo podemos concluir que es una proteína muy conservada en el género *Streptomyces* y posiblemente es esencial para el transporte de carbohidratos. Cabe resaltar que a pesar de que en este análisis teórico de las

secuencias es esencial demostrar que estas proteínas son funcionales y participan activamente en el transporte de carbohidratos, así como su participación en la regulación del catabolismo celular.

Por otro lado, también se pudo determinar que es un transportador altamente conservado ya que presenta de 84-87 % de identidad en *S. coelicolor*, *S. avermitilis* y *S. griseus*. Cabe resaltar que se realizó un alineamiento y una comparación de la secuencia de aa entre estas especies y la obtenida para *S. peucetius* var. *caesius*. En la tabla siguiente (6, también ver figura 14) se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 6. Comparación de la secuencia de aminoácidos obtenida de *S. peucetius* var. *caesius* con otras especies de *Streptomyces*

	SPVC*	SCO*	SAV*	SGR*
	glcP	SCO7153	SAV2657	SGR1900
		(GlcP1)	(Ara E)	(GlcP)
		SCO5578		
		(GlcP2)		
No. de nucleótidos	1422	1419	1413	1419
Residuos de aa	473	472	470	472
Peso Molecular (Da)	50441	50355	50233	50504
Punto Isoeléctrico	7.76	6.52	6.16	6.33
Identidad (aa)		404/473 (85%)	400/473 (84%)	412/473 (87%)
Similitud (aa)		436/473 (92%)	429/473 (90%)	445/473 (94%)

*SCO, *S. coelicolor*; SAV, *S. avermitilis* y (SGR) *S. griseus*.

```

SPVC  GMTSTAQPASPASGARSARPEHLGHVIFITAAAAAMGGFLFGYDSSVINGAVEAIRDRYDIG
SCO    -MASTSQAP-SPGAGTAHPDHLGHVIFIAAAAAAMGGFLFGYDSSVINGAVEAIRDRYDVG
SAV    -MTSTAQAP---GAREAHPEHLGHVIFIAAAAAAMGGFLFGYDSAVINGAVEAIRSKYDIG
SGR    MTSTANGPES  GARAHPDHLGHVIFITAAAAAMGGFLFGYDSSVINGAVEAIRDRYDIG
      * . * . * *   * *   * . * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
SPVC  SGTLAQVIAIALIGCAIGAATAGRIADRIGRIRCMQIAAVLFTVSAVGSALPFALWDLAL
SCO    SAVLAQVIAIVALIGCAIGAATAGRIADRIGRIRCMQIAAVLFTVSAVGSALPFALWDLAM
SAV    SATLAQVIAIALIGCAVGAATAGRIADRIGRIRCMQIAAVLFTASAIGSALPFALWDLAF
SGR    SGTLAQVIAIALIGCAIGAATAGRIADRIGRIRCMQIASVLFTASAIGSALPFALWDLAI
      *   * * * * * . * * * * * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
SPVC  WRIVGGFAIGMASVIGPAYIAEVSPPAYRGRSLASFQQAIVIGIAVSQLVNYAILQLADG
SCO    WRIIGGFAIGMASVIGPAYIAEVSPPAYRGRSLGSFQQAIVIGIAVSQLVNWGLLNAAGG
SAV    WRVIGGFAIGMASVIGPAYIAEVAPAAAYRGRSLGSFQQAIVIGIAISQLVNWAILNAAGG
SGR    WRIIGGFAIGMASVIGPAYIAEVSPPAYRGRSLGSFQQAIVIGIAISQLVNYAVLQIADG
      * * . . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
SPVC  EQRGEIGGLEAWQWMLGVMVPAVLYGLLSFAIPESPRFLISVGKVDKAKQVLSEVEGKN
SCO    DQRGELMGLEAWQWMLGVMVPAVLYGLLSFAIPESPRFLISVGKRERAKKILEEVEGKD
SAV    DQRGKLLGLEAWQWMLGVMVPAVLYGLLSFAIPESPRYLIEAGKDARAREVLEEVEGKE
SGR    DQRGKILGLEAWQWMLGVMVPAVLYGLLSFAIPESPRFLISVGKKAARKILEEVEGDK
      . * * * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
SPVC  VDLNARIIEIDHAMRREHKSFAKDLLGSRFGFLPIVWVGIGLSVFQQLVGINVAFYYSAT
SCO    VDFDARVTEIEHAMHREEKSSFKDLLGGSFFFKPIVWVIGIGLSVFQQFVGINVAFYYSST
SAV    IDLDARVEEIRLAMYREEKPSFKDLLGGTFFFKPIVWVIGIGLSVFQQFVGINVAFYYSAT
SGR    IDLDARVNEIETAMHREHKSFAKDLLGNRFFFLLPIVWVIGIGLSMFFQQLVGINVAFYYSAT
      . *   * * . * *   * * * * * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
SPVC  LWQSVGVDPPSSFLYSFTTSSIINIIGTVIAMVLVDRIGRRPLALIGSTGMAIALALEAWA
SCO    LWQSVGVDPADSFFYSFTTSSIINIVGTVIAMIFVDRVGRKPLALIGSVGMVIGLALALEAWA
SAV    LWQSVGVDPTDSFLYSFTTSSIINIIGTVIAMIFVDRVGRKPLAIIIGSVGMVIGLALALEAWA
SGR    LWQSVGIDPTDSFFYSFTTSSIINIIGTVIAMVLVDRVGRRPLALVGSIGMAVALAVEAWA
      * * * * * * * * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
SPVC  FSADLVDGKLPETQGIVALIAAHVFLVFFALSWSGVVVVWVFLGEMFPNRIRAAALGVAASA
SCO    FSFDLVDGKLPATQGWVALIAAHVFLVFFALSWSGVVVVWVFLGEMFPNRIRAAALGVAASA
SAV    FSYDLVDGKLPATQGWVALIAAHVFLVFFALSWSGVVVVWVFLGEMFPNRIRAAALGVAASA
SGR    FSADLVDGKLPATQGATALVAAHVFLVFFALSWSGVVVVWVFLGEMFPNRLRAAALGVAVFA
      * *   * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
SPVC  QWIANWAITASFPSLADWNLSGTYVIYTV-AVLSIPFVLRYVKETKGKALEEM
SCO    QWIANWAITASFPSLADWNLSGTYVIYTIIFAALSIPFVLKFKVKETKGKALEEM
SAV    QWIANWAITASFPSLADWSLSGTYIIYTVFAALSIPFVLKFKVKETKGKALEEM
SGR    QWIANWAITASFPSLADWNLSGTYIIYACFAVLSIPFVLKFKVKETKGKALEEMG
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Figura 13. Alineamiento de la secuencia de aa; SPVC, *S. peucetius* var. *caesius*; SCO, *S. coelicolor*; SAV, *S. avermitilis* y SGR, *S. griseus*.

Además, se realizó un análisis de la organización genética del transportador (secuencia homóloga a *glc1* y *2*) en *Streptomyces* (ver figura 14).

Organización genética de *glcP* en *Streptomyces*

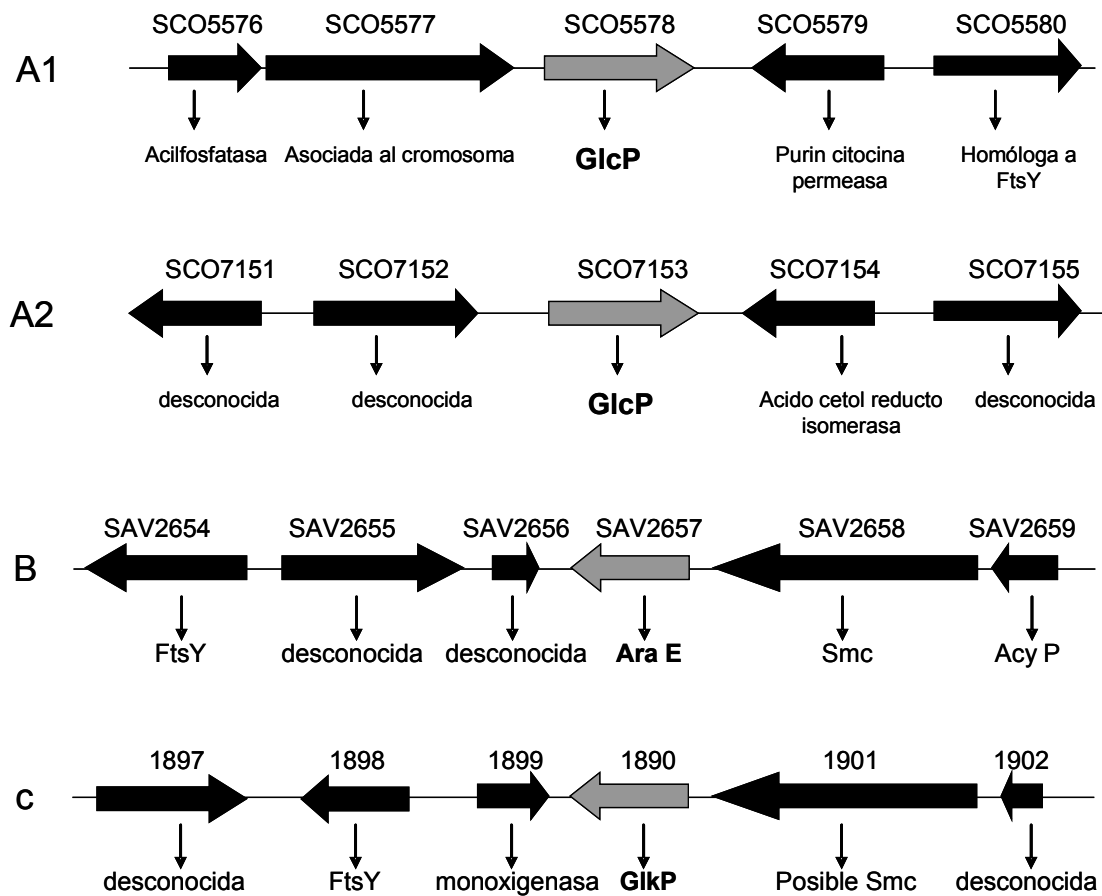


Figura 14. Organización genética de los genes homólogos a *glcP* en *Streptomyces*. La secuencia de *S. peucetius* var. *caesius* es homóloga a (A1 y A2) SCO5578 y SCO7153 en *S. coelicolor* y (B) SAV2657 (*ara E*) en *S. avermitilis* (B). Los genes se representan como flechas. FtsY, (receptor de señalización celular); Ara E, (permeasa para L-arabinosa homólogo a *glcP1* de *S. coelicolor*); Smc, (proteína de segregación cromosomal) y GlkP (Transportador de carbohidratos homólogo a *glcP1* de *S. coelicolor*). El análisis se realizó en http://avermitilis.is.kitasato-u.ac.jp/gview/view_map.cgia.

8. DISCUSIÓN

Recientemente se ha demostrado que en *Streptomyces* existen múltiples mecanismos para la incorporación de carbohidratos. Esto refleja la capacidad tan alta de este grupo bacteriano para utilizar una gran variedad de polisacáridos presentes en la materia orgánica (Bertram y col., 2004, Guzmán y col., 2005).

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 o cualquier fuente de carbono represora se inicia con su incorporación a la célula. Los niveles intracelulares de este azúcar o cualquiera de sus intermediarios metabólicos podrían determinar si se ejerce represión y con ello cambiar la función celular general. Por tal motivo, se sugiere que el transporte de glucosa puede ser un paso determinante para el destino celular, por lo cual nos interesa llevar a cabo su caracterización bioquímica y molecular.

Además, se sabe que existe más de un sistema de incorporación de glucosa en el género *Streptomyces*, en el cual, se ha caracterizado un sistema de baja afinidad y una de alta afinidad e inclusive sistemas generalizados capaces de incorporar diversos azúcares (Sabater y Asensio, 1973; Hodgson, 1982; Hurtubise y col., 1995; van Wezel y col., 2005). Sin embargo, solo se ha caracterizado con más detalle un solo sistema de transporte de glucosa en *S. coelicolor*. Este transportador es GlcP1 una proteína simportadora dependiente de H⁺, la cual pertenece a la superfamilia de permeasas MSF. Es una permeasa de alta afinidad, específica para glucosa, aunque puede incorporar 2-DOG. Adicionalmente, se ha demostrado que es indispensable para mantener un crecimiento óptimo. Inclusive se ha sugerido que esta proteína podría unirse a Glk y optimizar el catabolismo de este azúcar (van Wezell y col., 2007).

Con relación a GlcP, se ha determinado que *S. coelicolor* posee dos copias del gen, las cuales codifican para proteínas idénticas. En el análisis *in silico* se ha demostrado que este gen está conservado en varias especies de *Streptomyces*, por ello y tomando en cuenta su variación en las mutantes Dog^R aisladas en nuestro grupo de trabajo como resistentes a RCC (Segura y col., 1996; Escalante y col., 1999; Guzmán y col., 2005b), se planteó clonar el gen homólogo a *glcP* de *S. peucetius* var. *caesius*. Primero se amplificó el gen por PCR, donde se diseñaron cebadores con base a la secuencia de *S. peucetius*, proporcionada por el Dr. Sohng (datos no publicados). Se

obtuvo una banda del tamaño esperado (2020 pb). Posteriormente se llevó a cabo la clonación del fragmento obtenido en el plásmido pGEM-T-Easy en *E. coli*. Se realizó la secuenciación en Laragen (USA) en ambas direcciones por el método de dideoxiterminación de la cadena. Finalmente se realizó el análisis, en el cual se pudo determinar que la secuencia de nucleótidos de *S. peucetius* var. *caesius* es idéntica a la obtenida para *S. peucetius* anteriormente proporcionada por el Dr. Sohng (datos no publicados). El fragmento de DNA clonado podría codificar para una proteína de transporte de azúcares de 50.441 kDa y con punto isoeléctrico teórico de 7.76. Además, esta proteína presenta homología con *glcP1* y *glcP2* de *S. coelicolor* (SCO5578 y SCO5173), ya que presenta 85% de identidad y 92% de similitud; Para el caso de *S. avermitilis* (SAV2157, posible permeasa para L-arabinosa), tiene 84% de identidad y 90% de similitud y para *S. griseus* (Glc P, posible permeasa de azúcares SGR1890), muestra 87% y 94% de identidad y similitud respectivamente.

Por último se determinó que la organización genética de los genes homólogos a *glcP* en *Streptomyces* no es conservada ya que el orden de los genes adyacentes al transportador de azúcares en *S. coelicolor*, *S. avermitilis* y *S. griseus* no se conservan. Además, cabe resaltar que dichos genes no están relacionados metabólicamente ya que su función no está relacionada (ver figura 14). Lo que indica que no se encuentran en operones y por ello el catabolismo de glucosa no está regulado por un solo promotor. Por otro lado es importante mencionar que con respecto al gen clonado, se requerirá determinar si es funcional el producto proteico, así como su caracterización a nivel bioquímico.

9. CONCLUSIONES

El producto génico presenta homología con *glcP1* y *glcP2* de *S. coelicolor* (SCO5578 y SCO5173); *S. avermitilis* (SAV2157, posible permeasa para L-arabinosa) y *S. griseus* (Glc P, posible permeasa de azúcares SGR1890).

Se ha calculado que el gen clonado codifica para una proteína de transporte de azúcares de 50.441 kDa y con punto isoeléctrico teórico de 7.76.

La organización genética de los genes homólogos a *glcP* en *Streptomyces*, no es conservada ya que el orden de los genes adyacentes al transportador de azúcares en *S. coelicolor*, *S. avermitilis* y *S. griseus* no es el mismo.

Los genes adyacentes a *glcP* no están relacionados metabólicamente ya que su función no está relacionada.

10. PERSPECTIVAS

Determinar si el producto génico 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. peucetius* var. *caesius* en el transporte de glucosa y la posible repercusión en la represión catabólica ejercida por glucosa.

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

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.
- **Bentley y col. (2001).** Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature.* 417, 141-147.
- **Bertram R., Schlicht M., Mahr K., Nothhaft 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., Malmme 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.
- **Challis G.L & 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.
- **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.
- **Nelson D. L., M. M. Cox (2000).** *Lehninger Principles of biochemistry.* Worth publishers. Madison WI. 1152pp.
- **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.
- **Demain A. (1989).** Carbon source regulation of idiolite biosynthesis in Actinomycetes. En *Regulation of secondary metabolism in Actinomycetes*, pp. 127-131. Ed. S. Shapiro. Boca Raton, FL: CRC Press.
- **Di Marco A., Arcamone F. & Zunino F. (1975).** Daunomycin (daunorubicin) and adriamycin and structural analogs: biochemical activity and mechanism of action. J. W. Corcoran, F. E. Hahn (eds.), *Antibiotic*. Vol. 3. Ed. Springer Verlag, New York. 101-128.
- Escalante L., Ramos I., Imriskova I., Langley E. & Sánchez, S. (1999). Glucose repression of anthracyclines formation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, 572-578.
- **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. and 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. (1994).** General Physiology. Carbon Metabolism. In *Streptomyces: Handbook of Biotechnology*. Wellington E. & Hodgson D. Ed London: Plenum Press.
- **Hodgson D. (2000)** Primary metabolism and its control in *Streptomyces*: A most unusual group of bacteria. *Adv. in Microbiol. Physiol.* 42, 47-238.
- **Hoskins J., Alborn WE., Arnold J., Blaszcak LC., Burgett S. & DeHoff BS. y col. (2001).** Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J. Bacteriol.* 183(19), 5709-17.
- **Huang C., Lin Y., Yang Y., Huang S. & Chen C. (1998).** The telomeres of *Streptomyces* chromosomes contain conserved palindromic sequences with potential to form complex secondary structures. *Mol. Microbiol.* 28, 905-926.
- **Ikeda H., Seno E., Bruton C. & Chater K. (1984).** Genetic mapping cloning and physiological aspects of the glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Gen. Genet.* 196, 501-507.
- **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., 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.

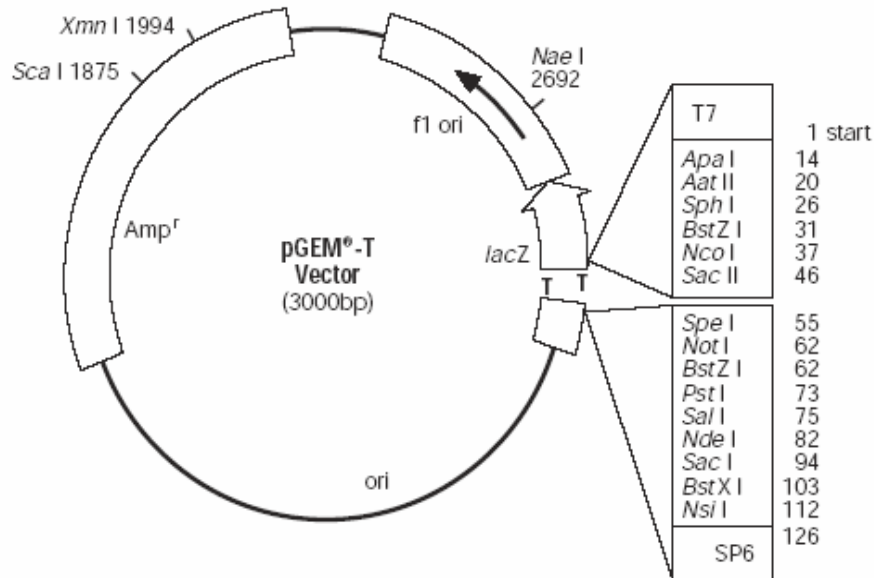
- **Jault J-M., Fieulaine S., Nessler S., Gonzalo P., Di Pietro A., Deutscher J. & Galinier A. (2000).** The HPr kinase from *Bacillus subtilis* is a homo-oligomeric enzyme which exhibits strong positive for nucleotide and fructose 1,6-bisphosphate binding. *J. Biol. Chemistry.* 275 (3) 1773-1780.
- **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.
- **Madigan M. T., J. M. Martinko y J. Parker. (2000).** *Brock Biología de los microorganismos.* Omega. Mexico. 1064 p.
- **Mahr K., Hillen W. & Titgemeyer F. (2000).** Carbon catabolite repression in *Lactobacillus pentosus*: analysis of the *ccpA* region. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 277–283.
- **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.
- **Pope M., Green B. & Westpheling J. (1996).** The *bld* mutants of *Streptomyces coelicolor* are defective in the regulation of carbon utilization, morphogenesis and cell-cell signalling. *Mol. Microbiol.* 19, 747-756.
- **Postma P., Lengeler J & Jacobson G (1993).** Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.* 57, 543–594.
- **Postma P., Lengeler J. & Jacobson G. (1996).** Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria *En: Escherichia coli and Salmonella typhimurium.* Cellular and Molecular Biology. Neidhardt, F.C. Ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, pp. 1149-1174.
- **Ramos I., Guzmán S., Escalante L., Imriskova I., Rodríguez-Sanoja R., Sánchez S. & Langley E. (2004).** The glucose kinase alone cannot be responsible for carbon source regulation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Res. Microbiol.* 155, 267-274.
- **Reizer J., Bachem S., Reizer A., Arnaud M., Saier M. Jr. & Stülke J. (1999).** Novel phosphotransferase system genes revealed by genome: analysis the complete complement of PTS proteins encoded within the genome of *Bacillus subtilis*. *Microbiology.* 145, 3419–3429.

- **Sabater B., Sebastian J. & Asensio C. (1972).** Identification and properties of an inducible and highly specific fructokinase from *Streptomyces violaceoruber*. *Biochim. Biophys. Acta.* 284, 414-420.
- **Saier M. Jr., Ramseier T. & Reizer J. (1996).** Regulation of carbon utilization, En: *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. Neidhardt F. , Curtiss III R., Ingraham J., Lin E., Low K., Magasanik B., Reznikoff W., Riley M., Schaechter M. & Umberger H. Ed. 2nd, vol. 1. ASM Press, Washington, D. C. pp. 1325-1343.
- **Sambrook J., Fritsch E. & Maniatis T. (1989).** Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.
- **Segura D., González R., Rodríguez R., Sandoval T., Escalante L. & Sánchez S. (1996).** *Streptomyces* mutants insensitive to glucose repression showed deregulation of primary and secondary metabolism. *Asia. Pac J. Mol. Biol. Biotechnol.* 4, 30-36.
- **Sabater, B., and Asensio, C. (1973)** Transport of hexoses in *Streptomyces violaceoruber*. *Eur J Biochem* 39: 201–205.
- **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. (1999).** Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 195-201.
- **Stülke J. & Hillen W. (2000).** Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 849–880.
- **Titgemeyer F., Walkenhorst J., Reizer J., Stuver M., Cui X. & Saier M. Jr, (1995).** Identification and characterization of phosphoenol-pyruvate: fructose phosphotransferase systems in three *Streptomyces* species. *Microbiology.* 141, 51-58.
- **Titgemeyer F., & Brückner R. (2002).** Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar. *FEMS Microbiol. Lett.* 141, 141-148.
- **Titgemeyer F & Hillen W. (2002).** Global control of sugar metabolism: a Gram-positive solution. *Antonie van Leeuwenhoek* 82, 59-71.
- **Tritton T. & Yee A. (1982).** The anticancer agent adriamycin can be actively cytotoxic without entering cell. *Science.* 217, 248-250.
- **Vandamme E. (1984).** Biotechnology of industrial antibiotics. Vol. 22. Marcel Dekker Inc. New York.
- **G. P. van Wezel, M. König, K. Mahr, H. Nothhaft, 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.*
- **White R. & Stroshane R. (1984).** Daunorubicin and adriamycin: properties, biosynthesis and fermentation. E. J. Vandamme Ed. *Biotechnology of Industrial Antibiotics*, vol. 22. Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 569-594.
- **Yang C., Huang C., Li C., Tsay Y., Lee S. & Chen C. (2002).** The terminal proteins of linear *Streptomyces* chromosomes and plasmids: a novel class of replication priming proteins. *Mol. Microbiol.* 43(2), 297-305.

ANEXO

Mapa genético del plásmido pGEM®-T



<http://www.promega.com/tbs/tm042/tm042.pdf>

Características del vector

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
Codon de inicio de <i>lacZ</i>	165
Operador <i>lac</i>	185–201
Región codificante de la β-lactamasa	1322–2182
Región del fago <i>f1</i> region	2365–2820
Secuencia del operón <i>lac</i>	2821–2981, 151–380
pUC/M13 Secuencia de unión del oligonucleotido Forward	2941–2957
Promotor T7de la RNA polimerasa (–17 to +3)	2984–3
Tomada de las especificaciones del proveedor (Promega).	