



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

LAS GLUCOSA CINASAS DE *Streptomyces peucetius* var. *caesius*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA:

BEATRIZ RUIZ VILLAFÁN

TUTOR PRINCIPAL
DR. SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTORAL

DR. GUILLERMO GOSSET LAGARDA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

DR. GUILLERMO AGUILAR OSORIO

FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO, D. F. OCTUBRE, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Asignado

DR. LUIS SERVÍN GONZÁLEZ	PRESIDENTE
DR. JOSÉ ADELFO ESCALANTE LOZADA	VOCAL
DRA. ROMINA RODRÍGUEZ SANOJA	VOCAL
DR. DANIEL GENARO SEGURA GONZÁLEZ	VOCAL
DRA. CLARITA OLVERA CARRANZA	SECRETARIA

Esta tesis fue desarrollada bajo la asesoría del Dr. Sergio Sánchez Esquivel, en el Laboratorio de Microbiología Industrial del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo financiero para la realización de esta tesis al proyecto de CONACyT 100564 y al de la DGPA IN201413.

Agradezco al Programa de Apoyo para Estudios de Posgrado (PAEP) por su apoyo para la asistencia y participación en dos congresos nacionales.

Agradezco el apoyo de la Lic. Lucía Brito en la búsqueda de bases de datos.

Agradezco la asistencia del Esp. en Biot. Marco Antonio Ortiz para la conservación de las cepas utilizadas en este trabajo.

Asimismo, le agradezco al Dr. Sergio Sánchez Esquivel por su tutoría e invaluable apoyo durante la realización de este proyecto.

Al Comité Tutorial, el cual estuvo formado por el Dr. Guillermo Aguilar Osorio y el Dr. Guillermo Gosset Lagarda; por su valioso tiempo y sugerencias durante la evolución de este trabajo.

Un agradecimiento especial para la Dra. Romina Rodríguez Sanoja por su invaluable apoyo, asesoría y sus siempre pertinentes sugerencias.

ÍNDICE

RESUMEN	4
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN	6
I. ANTECEDENTES	
I.1 DEFINICIÓN, ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN DE LAS GLUCOSA CINASAS	8
I.2 OTRAS FUNCIONES DE LAS ATP-GLKS	14
I.3 LA POLIFOSFATO GLK EN ACTINOBACTERIAS	16
II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	21
III. MATERIAL Y MÉTODOS	22
IV. RESULTADOS	25
V. DISCUSIÓN	41
VI. CONCLUSIONES	46
VII. BIBLIOGRAFÍA	47
VIII. APÉNDICES	
APÉNDICE 1: Medios de cultivo	53
APÉNDICE 2: Artículo	55

RESUMEN

Las glucosa cinasas (Glks) son enzimas de la vía glucolítica que se encuentran implicadas en la fosforilación de la glucosa. Estas enzimas son capaces de utilizar varios donadores del grupo fosfato como ATP, ADP o polifosfato. En varios estreptomicetos ha sido ampliamente estudiada la ATP-glucosa cinasa (ATP-Glk) debido a que ha sido señalada como la principal enzima fosforilante de glucosa y también como probable participante en la regulación por fuente de carbono. Utilizando zimogramas, se detectó una Glk dependiente de polifosfato (Pp-Glk) en extractos celulares de la cepa sobreproductora del anticancerígeno doxorubicina *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. La actividad máxima de Pp-Glk se encontró en la fase estacionaria de crecimiento (48 h) de la bacteria crecida en 100 mM de glucosa. En cambio no se detectó actividad cuando se utilizó 20 mM de glutamato como única fuente de carbono, lo que indica la inducibilidad de la enzima por glucosa. *S. peucetius* var. *caesius*, produjo 1.8 más actividad de Pp-Glk que de ATP-Glk, a diferencia de las cepas silvestres de *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces lividans* y *Streptomyces thermocarboxydus* K-155. Adicionalmente *S. peucetius* var. *caesius* produjo 5 y 4 veces más Pp-Glk y antraciclinas respectivamente, que su cepa silvestre *Streptomyces peucetius*, lo que apunta a un papel de la Pp-Glk en la producción de antibiótico en la cepa sobreproductora. El gen de la Pp-Glk fue clonado y su secuencia de 726 bp mostró una identidad en aminoácidos de 83-87% con las secuencias ortólogas de los estreptomicetos citados anteriormente. La secuencia clonada presentó las probables secuencias de unión a polifosfato GXDIGGXXIK, TXGTGIGSA y KEX₍₄₎SWXXWA. Sorprendentemente no se detectó la secuencia del motivo de unión a Zn, lo que sugiere que la Pp-Glk no se encuentra relacionada con la familia de proteínas Glk/ROK.

ABSTRACT

Glucose kinases (Glks) are enzymes of the glycolytic pathway involved in glucose phosphorylation. These enzymes can use various phosphoryl donors such as ATP, ADP, and polyphosphate. In several streptomycetes, ATP-glucose kinase (ATP-Glk) has been widely studied and regarded as the main glucose phosphorylating enzyme and is also likely a regulatory protein involved in carbon catabolite repression. In cell-extracts from the doxorubicin overproducing strain *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, grown in glucose, a polyphosphate-dependent Glk (Pp-Glk) was detected by zymogram. Maximum activity was observed during the stationary growth phase (48 h) of cells grown in 100 mM glucose. No activity was detected when 20 mM glutamate was used as the only carbon source, supporting a role for glucose in inducing this enzyme. Contrary to wild type strains of *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces lividans* and *Streptomyces thermocarboxydus* K-155, *S. peucetius* var. *caesius*, produced 1.8 times more Pp-Glk than ATP-Glk. In addition, this microorganism produced 5 and 4- times more Pp-Glk and anthracyclines, respectively than its wild type *Streptomyces peucetius* parent strain, supporting a role for this enzyme in antibiotic production in the overproducer strain. A cloned 726 bp DNA fragment from *S. peucetius* var. *caesius* encoded a putative Pp-Glk, with amino acid identities between 83-87% to orthologous sequences from the above cited streptomycetes. The cloned fragment showed the polyphosphate binding sequences GXDIGGXXIK, TXGTGIGSA and KEX₍₄₎SWXXWA. Sequences for the Zn-binding motif were not detected in this fragment, suggesting that Pp-Glk is not related to the Glk ROK family of proteins.

INTRODUCCIÓN

Las glucosa cinasas (Glks) son las enzimas que fosforilan a la glucosa en el primer paso de la vía Embden-Meyerhof-Parnas, mejor conocida como glucólisis. Estas enzimas se han clasificado tradicionalmente en tres grupos, tomando en cuenta su estructura (primaria, secundaria, terciaria), su especificidad por carbohidrato y por el tipo de donador del grupo fosfato que utilizan (Kawai *et al.*, 2005). El grupo al que pertenecen las Glks de las bacterias Gram positivas tiene secuencias consenso que comparte con la familia ROK (Repressor Orf Kinases) familia que además de carbohidrato cinasas, contiene proteínas represoras que responden a carbohidrato (Kawai *et al.*, 2005). Las Glks pertenecientes al género *Streptomyces* se encuentran clasificadas dentro de este grupo. Hasta el momento, la enzima más estudiada en este género es la ATP-Glk la cual ha sido relacionada con el mecanismo de represión por fuente de carbono (RCC) ejercido no solamente por glucosa sino por otras fuentes de carbono que no se metabolizan vía glucólisis (Angell *et al.*, 1994, Kwakman y Postma, 1994). Así mismo, en el organismo modelo *Streptomyces coelicolor*, la ATP-Glk ha demostrado ser la principal enzima que fosforila a la glucosa (Angell *et al.*, 1994).

Por otro lado, en las actinobacterias se han encontrado otras Glks que además utilizan polifosfato (Pp) como donador del grupo fosfato para la fosforilación de la glucosa. La primera Glk reportada fue la encontrada en *Mycobacterium phlei* en 1964 (Szymona y Ostrowsky, 1964). Aunque diversos trabajos han reportado nuevas Pp-Glks, hasta el momento sólo existe un estudio sobre la cinética de producción de esta enzima en *Streptomyces aureofaciens* (Hostalek *et al.* 1976). Se ha especulado mucho sobre la función fisiológica de las Pp-Glks en los organismos que la contienen. En *Microlunatus phosphovorus* y *Mycobacterium tuberculosis* la Pp-Glk es la enzima más importante para la fosforilación de la glucosa (Tanaka *et al.*, 2003, Marrero *et al.*, 2013). En *Corynebacterium glutamicum* la enzima pp-Glk parece permitir una mejor eficiencia en la utilización de la glucosa cuando ésta se encuentra en altas concentraciones (Lindner *et al.*, 2010). Recientemente se descubrió una Pp-Glk en *S. coelicolor* utilizando proteómica cuantitativa (Gubbens *et al.*, 2012). El gen de dicha enzima fue clonado y sobreexpresado con una etiqueta de histidinas en *E. coli*. La proteína fue purificada por cromatografía de afinidad a níquel y se le determinaron algunas características bioquímicas como Km y kcat para glucosa y Pp₆. Los valores obtenidos para estos parámetros fueron menores a los observados para otras Pp-Glks como la de *Arthrobacter* sp. KM (Koide *et al.*, 2013). Sin embargo no se han realizado investigaciones sobre el perfil de producción de esta enzima en *S. coelicolor*.

Streptomyces peucetius var. *caesius* es un microorganismo productor de unos compuestos anticancerígenos denominados antraciclinas, de las cuales la doxorubicina es muy utilizada para el tratamiento de diversos tipos de cáncer (Yang *et al.*, 2014). En esta bacteria se realizó una cinética de producción de la ATP-Glk en donde se observaron dos puntos máximos de actividad, uno de los cuales fue caracterizado como una ATP-Glk (Imriskova *et al.*, 2001). Esta ATP-Glk se purificó y caracterizó bioquímicamente (Imriskova *et al.*, 2001), sin embargo a diferencia de lo que se ha reportado en *S. coelicolor*, la ATP-Glk de *S. peucetius* var. *caesius* no parece tener un papel tan relevante dentro de su mecanismo de RCC (Ramos *et al.*, 2004). Con el fin de realizar una descripción de las posibles Glks presentes en *S. peucetius* var. *caesius* decidimos realizar un estudio fisiológico para determinar el número de Glks activas en esta bacteria, establecer la fase del crecimiento a la cual aparecen y comparar con las Glks de otras cepas de *Streptomyces*.

I. ANTECEDENTES

I.1 DEFINICIÓN, ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN DE LAS GLUCOSA CINASAS

Las enzimas glucosa cinasas (Glks) están clasificadas dentro de la superfamilia de las azúcar cinasas/HSP70/actina que incluye a la familia de las actinas, la familia HSP70 de las chaperonas moleculares y factores de intercambio de nucleótidos, la familia ROK (repressor, ORF, kinase) la familia de hexocinasas, la familia FGGY (que incluye a la glicerol cinasa y carbohidrato cinasas semejantes como la ramnulocinasa y xilulosa cinasa), la familia propionato/acetato cinasa, entre otras (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi>). Las Glks fosforilan a la glucosa alfa en el carbono 6, utilizando diversos donadores del grupo fosfato como el ATP (EC: 2.7.1.1 y EC: 2.7.1.2), el ADP (EC: 2.7.1.147) y el polifosfato (EC: 2.7.1.63) (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

En la clasificación más reciente, las Glks se han dividido en dos grandes familias debido a su similitud en estructura primaria y terciaria (Kawai *et al.*, 2005). Las dos familias son la Ribocinasa que incluye a todas las Glks y hexocinasas que son capaces de utilizar al ADP como donador del grupo fosfato y la familia Hexocinasa que incluye al resto de las hexocinasas y Glks. Esta última familia fue subdividida en tres grupos: el HK, A y B.

Las Glks del grupo HK poseen pesos moleculares que oscilan entre 50 y 100 kDa. Además utilizan como donador del grupo fosfato al ATP. Este grupo comprende a las Glks y hexocinasas de eucariontes como las humanas (HK I, II y III, la Glk conocida como HK IV), la de rata (HK I), la del platelminto *Schistosoma mansoni* (HK) y las de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (HK PI y PII) (Kawai *et al.*, 2005). Todas las Glks de la familia HK están formadas por dos dominios, un dominio grande y uno pequeño que forman la hendidura del sitio activo en donde se unen la glucosa y el ATP (Fig. 1 A). Las Glks del grupo HK con pesos moleculares alrededor de 50 kDa, son semejantes en su estructura primaria, secundaria y terciaria, así como en el sitio de unión al sustrato (Kamata *et al.*, 2004). Las Glks de 100 kDa están formadas por dos regiones repetidas que son semejantes entre sí (Aleshin *et al.*, 1998). La estructura de cada una de estas dos regiones es similar a las Glks de 50 kDa en sus estructuras primaria, secundaria y terciaria, incluyendo su sitio de unión a sustrato. Se ha propuesto que estas Glks debieron evolucionar de una duplicación y fusión de genes a partir de un gen que codificaba para una Glk de 50 kDa (Kawai *et al.*, 2005). A pesar de la alta semejanza entre las dos regiones de la Hxkl humana de 100 kDa, solamente la región carboxilo terminal lleva a cabo la catálisis. El extremo carboxilo terminal difiere del amino en una región que forma un subdominio flexible (aminoácidos 766-811) que solamente se ha encontrado en las Glks del grupo HK.

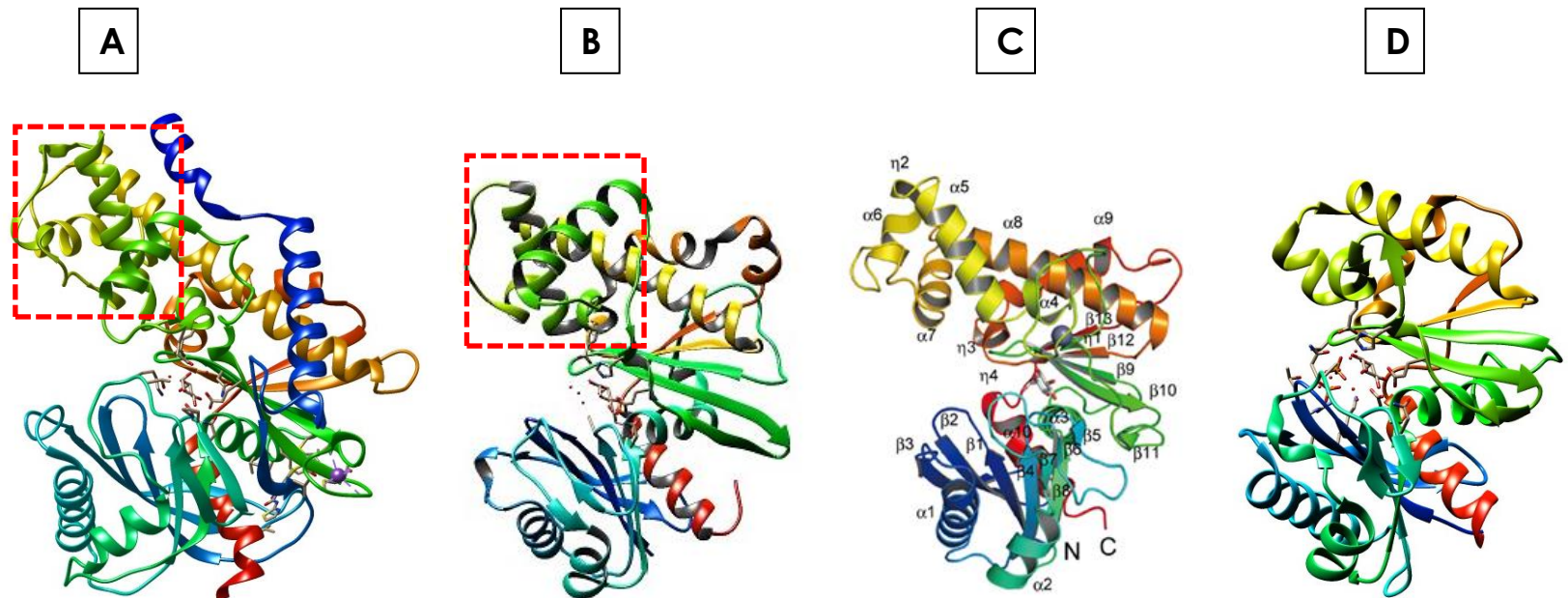


Figura 1. Estructura de los monómeros de (A) la ATP-Glk humana IV (PDB 1V4S), (B) la ATP-Glk de *Escherichia coli* (PDB1Q18), (C) la ATP-Glk de *S. griseus* y (D) la glucomanocinasa de *Arthrobacter* sp. KM (PDB 1WOQ). La figura C fue tomada de Miyazono *et al.*, 2012. El recuadro rojo muestra el subdominio flexible. La esfera gris de la figura C representa al ion zinc.

Este subdominio flexible normalmente es el sitio de interacción con el enlace de la adenina en el ATP, pero éste subdominio no es funcional en el extremo amino terminal en donde se lleva a cabo la regulación alostérica por glucosa 6-fosfato (Aleshin *et al.*, 1998).

El grupo A contiene Glks de bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Zymomonas mobilis* y la cianobacteria *Synechocystis* sp. y las provenientes de protozoarios amitocondriados como *Trichomonas vaginalis* y *Giardia lamblia*. A diferencia de las Glks del grupo HK, estas enzimas tienen pesos moleculares que van de 33 a 42 kDa y también utilizan al ATP como donador del grupo fosfato. La estructura cristalográfica de la Glk de *E. coli* (ecoGlk) fue resuelta como apo y holoenzima (Lunin *et al.*, 2004). La ecoGlk muestra semejanza en sus estructuras primaria, secundaria y terciaria con las Glks del grupo HK. Lo anterior es bastante notable ya que se ha observado en alineamientos de secuencia que la región del subdominio flexible se encuentra conservada en ecoGlk pero con un menor tamaño (Fig. 1B). Así mismo, se encuentran conservados los aminoácidos que participan en la unión de la glucosa y al ATP (Lunin *et al.*, 2004).

Finalmente, el grupo B comprende a las Glks que provienen de bacterias Gram-positivas como *Bacillus subtilis*, *Microlunatus phosphovorius*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Arthrobacter* sp. KM, así mismo incluye Glks de las arqueas *Aeropyrum pernix* y *Thermoproteus tenax* pertenecientes a la familia Crenarchaeota. Los pesos moleculares de estas enzimas van de 30 a 36 kDa y pueden usar como donadores del grupo fosfato al ATP y/o polifosfato (Pp). Las estructuras de dos Glks de este grupo han sido resueltas, la glucosa/manosa cinasa (GMGlk) de *Arthrobacter* sp. KM (Mukai *et al.*, 2004) y la ATP-Glk de *Streptomyces griseus* (Miyazono *et al.*, 2012). La semejanza entre la GMGlk y ecoGlk con las Glks de 100 y 50 kDa, se encuentra principalmente en su estructura terciaria (Fig. 1 A, B y D) además de que tiene conservados los sitios de unión a glucosa y fosfato. Al hacer la comparación de secuencia primaria entre los tres modelos se observó una baja identidad, además de la carencia de varias regiones en la secuencia de GMGlk. Estas regiones faltantes forman parte de varios elementos, entre ellos el subdominio flexible (Kawai *et al.*, 2005).

La Glk de *S. griseus* (SgGlkA) muestra una conformación de dímero de dímeros, que además une un átomo de Zinc (Fig. 2 A) en la secuencia consenso rica en cisteínas (CXCGXXGCXE) (Miyazono *et al.*, 2012). Al igual que las Glks de los otros grupos de la familia HK, la glucosa se une a la SgGlkA en una región dentro de la hendidura formada por el dominio grande y el pequeño en donde interacciona con seis residuos de aminoácidos (Gly66, Asn104, Asp105, Glu154, His157 y Glu176).

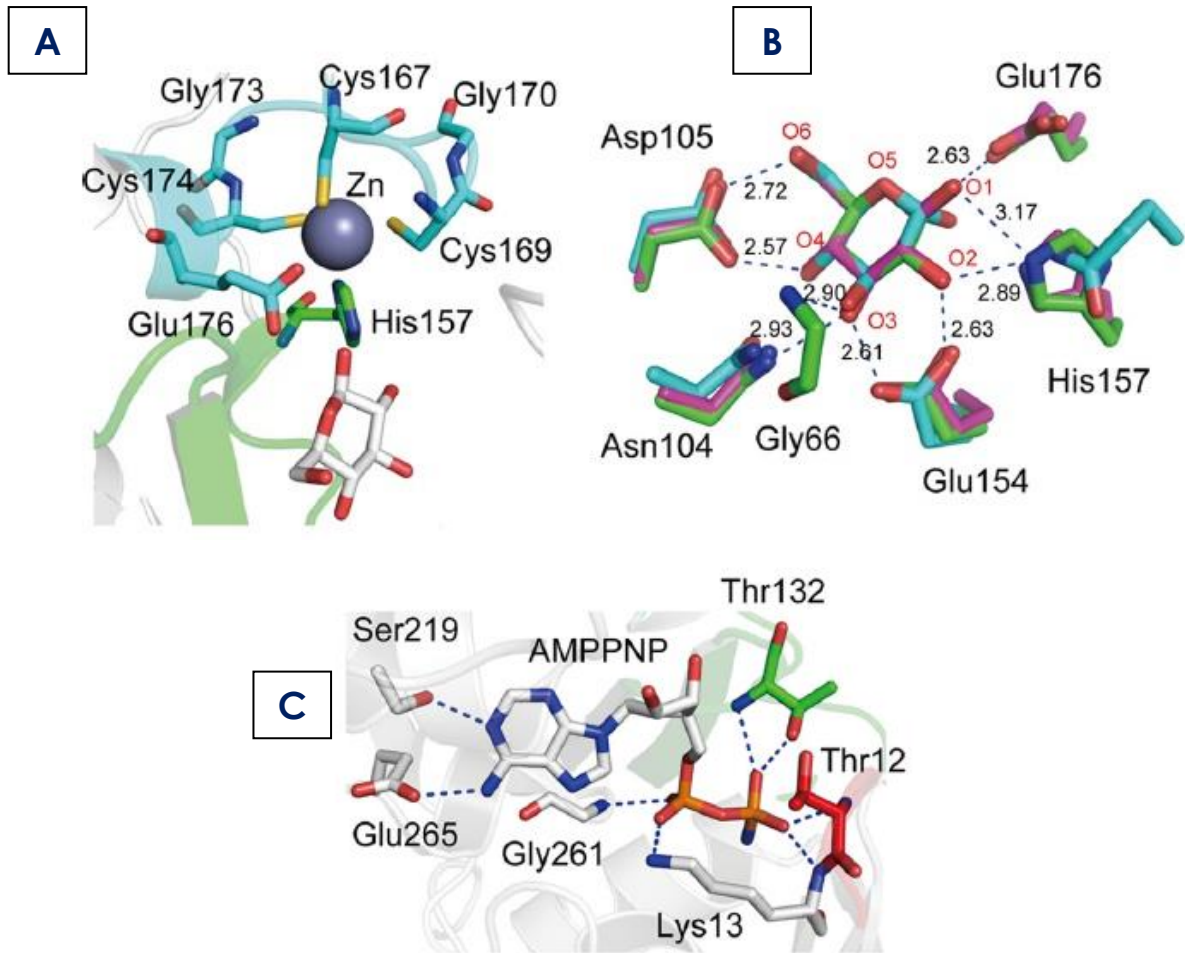


Figura 2. Mecanismo de unión de la ATP-Glk de *S. griseus* con (A) un ion Zinc, (B) con glucosa y (C) con el análogo del ATP, el adenilil imidofosfato (AMPPNP). Modificado de Miyazono *et al.*, 2012.

El Asp105, que es el aminoácido catalítico, forma un puente de hidrógeno bidentado con la glucosa en los hidroxilos C4 y C6 (Fig. 2B). Los aminoácidos implicados en la unión de la glucosa se encuentran bien conservados en todas las familias de Glks (Fig. 2B). Las estructuras de la SgGlkA muestran un ensamblaje de dímero de dímeros (Fig. 3 B y C). La interfase de dimerización está conformada principalmente por la secuencia consenso (ROK1) [LIVM]_{X(2)}G[LIVMFCT]GX[GA][LIVMFA]_{X(8)}GX₍₃₋₅₎[GATP]_{X(2)}G[RKH] y por la alfa hélice-8 con la lámina beta 13 (Miyazono *et al.*, 2012). La interfase de dimerización está estabilizada por 14 puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Cuando se comparan los dímeros de SgGlkA con otras proteínas de la familia ROK, el mecanismo de dimerización aparece bien conservado, aunque no se conservan los residuos en la interfase de dimerización. Esta interfase equivale a un 4.1% de la superficie total y dos protómeros se estabilizan por 10 puentes de hidrógeno y 2 puentes salinos (Miyazono *et al.*, 2012). La única estructura cristalográfica de una Glk con capacidad de unión a polifosfato es la ATP/polifosfato-glucomanocinasa de *Arthrobacter* sp. cepa KM (Mukai *et al.*, 2004). Como en el caso de la enzima de *S. griseus*, los cinco aminoácidos importantes para la unión a la glucosa son Glu180, His171, Glu168, Asn122 y Asp123. Dos fosfatos son capaces de unirse a la enzima, uno es el fosfato A que interactúa con Thr151 y el B con Arg42, Thr22 y Lys25. Tomando en cuenta la distancia entre ambos sitios de unión, los autores superpusieron un pentafosfato que representaría el sitio de unión del polifosfato. Este sitio de unión se encuentra entre la hendidura formada por el dominio grande y el pequeño de manera semejante al de la Glk de *S. griseus*. De este modo, el sitio de unión al fosfato A se localiza en el equivalente al sitio de unión del grupo β-fosforilo del ATP. Los residuos de interacción con el fosfato B se encuentran bien conservados en las estructuras primarias de otras Glks bacterianas Gram-negativas y positivas (Mukai *et al.*, 2004). Adicionalmente, las Glks de este grupo contienen las secuencias consenso que caracterizan a la familia de proteínas ROK, excluyendo la secuencia de unión a DNA (Kawai *et al.*, 2005).

Titgemeyer y col (1994) propusieron una familia de proteínas represoras que ellos denominaron ROK, basándose en alineamientos de secuencias y construcción de árboles filogenéticos. En esta familia incluyeron dos grupos de proteínas, uno de ellos incluye proteínas que contienen un motivo amino terminal (hélice-vuelta-hélice) de unión a DNA, pero que además unen azúcares (como xilosa o N-acetilglucosamina) y el otro formado por azúcar cinasas específicas para glucosa o fructosa (Titgemeyer *et al.*, 1994, Larion *et al.*, 2007, Kazanov *et al.*, 2013). La familia ROK de proteínas incluye a 21 miembros distintos (Conejo *et al.*, 2010, Kazanov *et al.*, 2013).

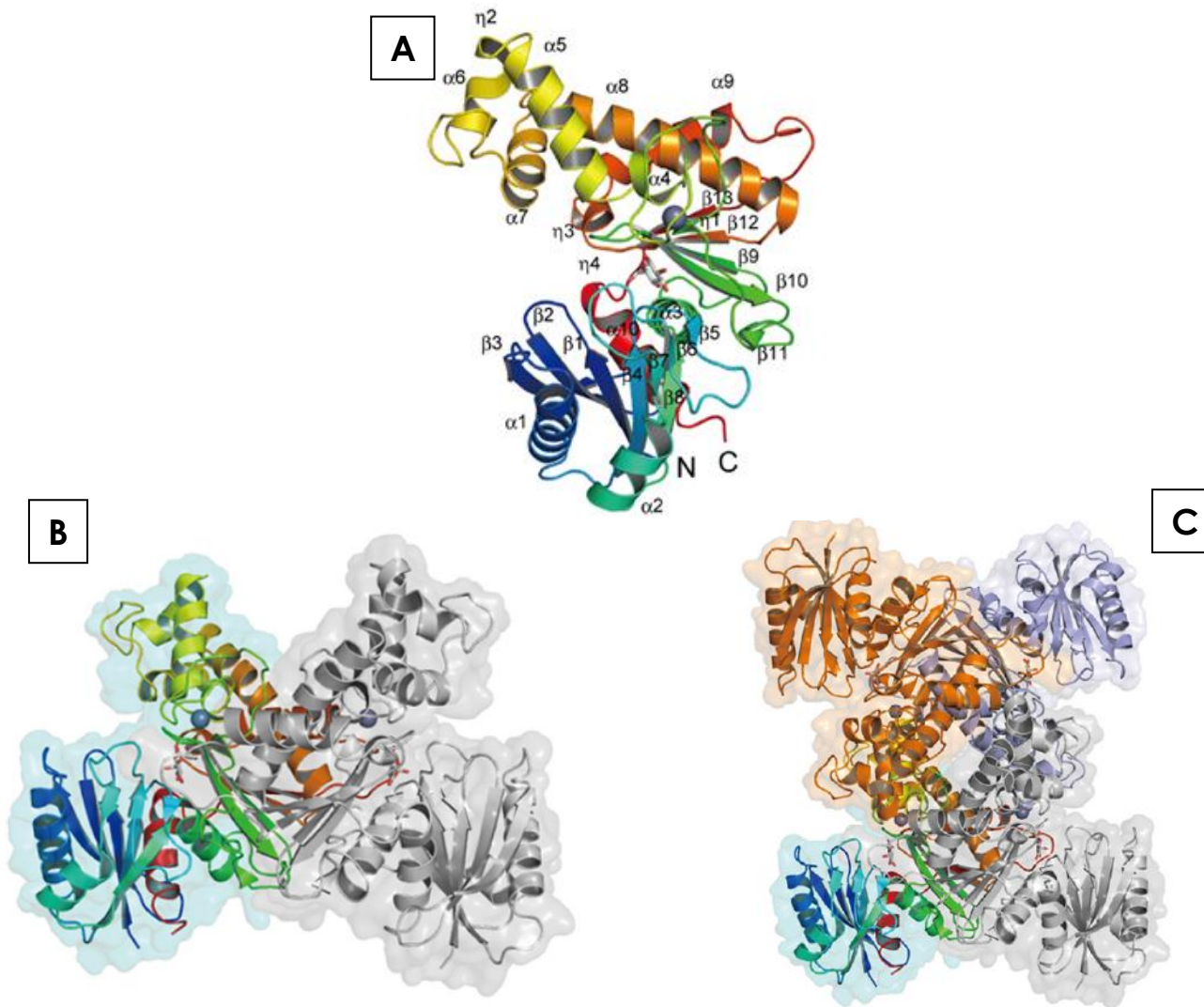


Figura 3. Estructura del (A) monómero, (B) dímero y (C) dímero de dímeros de la ATP-Glk de *S. griseus*. En el monómero (A) se muestra el sitio de unión del ion zinc (esfera gris) y a la glucosa (modelo de bastón en blanco y rojo). Modificado de Miyazono *et al.*, 2012.

Según la base de datos de la EMBL (European Molecular Biology Laboratory), la familia ROK (IPR000600) incluye al represor de xilosa o XylR de *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus pentosus* y *Staphylococcus xylosus*; el represor de N-acetilglucosamina o NagC de *E. coli*; la Glk de *S. coelicolor*; la fructocinasa de *Pediococcus pentosaceus*, *Streptococcus mutans* y *Zymomonas mobilis*; la alocinasa y el Mlc de *E. coli* (<http://www.ebi.ac.uk/>, Schiefner *et al.*, 2005, Pennetier *et al.*, 2008, Kraus *et al.*, 1994). El análisis de la historia evolutiva de la familia ROK, señala que el mejor candidato a ser el prototipo de ancestro de esta familia es la ATP-Glk de *S. coelicolor*. El evento evolutivo más significativo sería entonces la adquisición del dominio de unión a DNA que condujo a la aparición de los represores transcripcionales que responden a carbohidrato (Kazanov *et al.*, 2010).

Kawai *et al.*, (2005) proponen la evolución divergente de las Glks a partir de un ancestro común semejante a la GMGik que posteriormente fue adquiriendo los demás elementos (como el subdominio flexible) dando lugar a las enzimas del grupo A cuyos genes al duplicarse y fusionarse dieron origen a las enzimas del grupo HK.

El mecanismo catalítico de las Glks en general es análogo al de otras cinasas, en donde se lleva a cabo un ataque nucleofílico S_N2 del átomo de oxígeno O₆ de la glucosa hacia el átomo de fósforo del grupo γ -fosforilo del ATP (Lunin *et al.*, 2004).

I.2 OTRAS FUNCIONES DE LAS ATP-GLKS

En el género *Streptomyces*, la ATP-Glk ha sido relacionada con la regulación por fuente de carbono (RCC). Hodgson (1982) aisló mutantes que eran resistentes al análogo de la glucosa, la 2-desoxiglucosa. Dichas mutantes resultaron ser *glkA*⁻ e incapaces de crecer en medio mínimo con glucosa como única fuente de carbono (Hodgson, 1982). La caracterización de dichas mutantes demostró que eran insensibles a RCC por glucosa (Angell *et al.*, 1994) y por fuentes de carbono que no se metabolizan vía glucólisis como arabinosa o galactosa (Kwakman y Postma, 1994). Angell *et al.*, 1994 establecieron que el efecto de la Glk en la RCC no se debía a su actividad catalítica. Para demostrar lo anterior, las mutantes *glk*⁻ fueron complementadas con un gen de *ATP-glk* de *Zymomonas mobilis* lo que les permitió recuperar su capacidad para fosforilar a la glucosa pero no recuperaron su sensibilidad a RCC. En el mismo trabajo, las mutantes *glk*⁻ fueron cultivadas en medio mínimo con glucosa como única fuente de carbono. Las colonias que fueron capaces de crecer, mostraron otra actividad de ATP-Glk que en geles SDS-PAGE presenta un mayor peso molecular que la reportada anteriormente (GlkA). Hasta ahora sin embargo, no se ha podido explicar el mecanismo de acción de la GlkA en la RCC. A pesar de que esta GlkA pertenece a la familia ROK, no presenta

las secuencias motivo de unión a DNA (Angell *et al.*, 1994) y por otro lado, existe escasa evidencia de su capacidad para interactuar con alguna otra proteína (Mahr *et al.*, 2000, van Wezel *et al.*, 2007).

Streptomyces peucetius var. *caesius* es una bacteria obtenida por tratamiento mutagénico de la cepa *Streptomyces peucetius* con N-nitroso-N-metil uretano (Arcamone *et al.*, 1969). *S. peucetius* var. *caesius* es capaz de sobreproducir el antitumoral doxorubicina, a diferencia de la cepa silvestre, que produce daunorrubicina o daunomicina. La doxorubicina o adriamicina, es una antraciclina ampliamente utilizada para el tratamiento de tumores cancerosos (Tacar *et al.*, 2013, Yang *et al.*, 2014). Este agente antitumoral se encuentra sujeto a represión catabólica (Escalante *et al.* 1999). De esta bacteria se aislaron mutantes espontáneas en un medio con 2-desoxiglucosa (2-Dog), las cuales resultaron ser resistentes a este compuesto (Dog^R). Además de mostrar bajos niveles de actividad ATP-Glk y transporte de glucosa disminuido, las mutantes son insensibles a RCC por glucosa y por otras fuentes de carbono represoras que no se metabolizan vía Glk, como glutamato y arabinosa (Segura *et al.*, 1996). Un análisis del gen *ATP-glk* de dichas mutantes que incluyó la región intergénica corriente arriba del mismo, mostró una identidad del 100% con la cepa parental por lo que la insensibilidad a RCC no se debe a la presencia de mutaciones en el gen o su promotor. Posteriormente, por selección negativa se aislaron bacterias Dog^R que restituían el fenotipo Dog^S. Algunas de estas mutantes recuperaron casi el 100% de actividad de ATP-Glk, pero seguían siendo insensibles a RCC por glucosa. Lo anterior sugiere que al menos en esta cepa, la presencia de la ATP-Glk no es la única necesaria para ejercer la RCC (Ramos *et al.* 2004).

Imriskova *et al.* (2001) purificaron y caracterizaron bioquímicamente la ATP-Glk de esta bacteria, cuya máxima producción ocurre a las 48 h de cultivo. Esta enzima muestra algunas características semejantes con la Glk de *S. coelicolor*, pero con una temperatura óptima de reacción diferente (33°C para la de *S. coelicolor* y 42°C para la de *S. peucetius* var. *caesius*) (Imriskova *et al.*, 2005). Además, cuando se secuenciaron los extremos amino y carboxilo terminales de la Glk de *S. peucetius* var. *caesius* por degradación de Edman, se encontraron diferencias entre ella y la secuencia de *glkA* de *S. coelicolor* (Imriskova *et al.*, 2005). Con el fin de continuar la caracterización de la ATP-Glk de *S. peucetius* var. *caesius*, se realizó la clonación de dicho gen por PCR, utilizando como cebadores secuencias semejantes a los extremos amino y carboxilo de *S. coelicolor*. La *ATP-glk* así clonada, mostró ser 91% semejante a la de *S. avermitilis* y 87% semejante a la de *S. coelicolor*. Recientemente se liberó la secuencia del genoma de *S. peucetius* var. *peucetius* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=streptomyces+peucetius>, 15 de julio del 2014). Por medio del servidor en línea RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology 2.0) encontramos los probables genes que codifican para la ATP-Glk, Pp-Glk y dos probables azúcar cinasas (Aziz *et*

al., 2008). Sin embargo, cabe mencionar que la identidad de la ATP-Glk de *S. peucetius* var. *peucetius* comparada con la secuencia de la enzima de *S. peucetius* var. *caesius*, fue del 81% tanto en nucleótidos como en aminoácidos,.

En otras bacterias, también se ha visto que la ATP-Glk parece tener un papel en el mecanismo de RCC, adicional al sistema PTS (sistema de fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato). Este es el caso de *Staphylococcus xylosus*, bacteria Gram-positiva de bajo contenido de GC. Una mutación en el gen que codifica para la Glk (*grb*) evita el efecto negativo de la glucosa sobre la actividad de enzimas como glucitol deshidrogenasa y gluconato cinasa y de un modo parcial también alivia la represión en las enzimas β -galactosidasa, α -glucosidasa y β -glucuronidasa (Wagner *et al.*, 1995). En *E. coli* se ha visto un efecto represor de la Glk sobre los genes *mal* para la utilización de maltosa y maltodextrinas (Lengsfeld *et al.*, 2009). Los autores proponen que la Glk regula negativamente a MalT, el activador transcripcional de los genes *mal*. La Glk compite con la proteína Mlc (regulador negativo de *ptsG* y *malT*) por su unión con la proteína PtsG (enzima EIIBC^{Glk}). Por otro lado, se ha visto que mutantes *glk* de la bacteria fitopatógica *Xanthomonas campestris* producen menos exopolisacárido y tienen disminuida su capacidad infectiva (Lu *et al.*, 2007). Finalmente, en *Prevotella bryantii* la enzima glucomanocinasa (proteína de la familia ROK) es capaz de inhibir la expresión de la β -glucanasa (Fields y Russell, 2001).

I.3 LA POLIFOSFATO GLK EN ACTINOBACTERIAS

La primera Glk reportada como capaz de fosforilar a la glucosa utilizando al Pp como donador del grupo fosfato fue la proveniente de *Mycobacterium phlei* (Szymona y Ostrowsky, 1964). Los mismos autores detectaron esta enzima en otras actinobacterias como *Nocardia minima* y *Corynebacterium diphtheriae*. Además, buscaron sin éxito esta actividad enzimática en eubacterias, hongos filamentosos y en algas verdes (Phillips *et al.*, 1999). Hasta el momento, las Pp-Glks reportadas provienen de actinobacterias. Como se puede observar en la tabla 1, las Pp-Glks de *M. phlei* (Szymona y Ostrowsky, 1964), *Propionibacterium shermanii* (Pepin *et al.*, 1987), *Mycobacterium tuberculosis* (Hsieh *et al.*, 1993), *Arthrobacter* sp. KM (Mukai *et al.*, 2003), *Corynebacterium glutamicum* (Lindner *et al.*, 2010) y *Streptomyces griseus* (Koide *et al.*, 2013) son capaces de utilizar tanto Pp como ATP como donadores del grupo fosfato, mientras que las Pp-Glks de, *Mycococcus*

Tabla 1. Cepas bacterianas con actividad de Pp-Glk reportada

Fuente	Donador del grupo fosfato	Km (mM)	Referencia
<i>Mycobacterium phlei</i>	ATP/Pp	ATP 0.83 PP ₆ 0.175 Glc 0.28	Szymona y Ostrowsky, 1964
<i>Propionibacterium shermanii</i>	ATP/Pp	ATP 1.5 PP ₃₁ 1.2X10 ⁻³	Pepin <i>et al.</i> , 1987, Kowalczyk <i>et al.</i> , 1996
<i>Mycococcus coralloides</i>	Pp	NR	González <i>et al.</i> , 1990
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	ATP/Pp	ATP 1.46 PP ₃₂ 0.0184	Hsieh <i>et al.</i> , 1993
<i>Arthrobacter</i> sp. cepa KM	ATP/Pp	ATP 0.2 PP ₆ 0.02 Glc 0.5 Man 15	Mukai <i>et al.</i> , 2003
<i>Microlunatus phosphovorus</i>	Pp	PP ₇₀₀ 0.06	Tanaka <i>et al.</i> , 2003
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	ATP/Pp	ATP 6 PP 1 Glc 21.1	Lindner <i>et al.</i> , 2010
<i>Streptomyces coelicolor</i>	ATP/Pp	PP ₆ 3.87X 10 ⁻³ Glc 1.24X10 ⁻²	Koide <i>et al.</i> , 2013

NR: No Reportado

coralloides (González *et al.*, 1990) y *Microlunatus phosphovorius* (Tanaka *et al.*, 2003) solo utilizan al Pp para la fosforilación de la glucosa. En el caso de la Pp-Glk de *S. coelicolor*, aun cuando es capaz de utilizar el ATP, para lograrlo requiere de un exceso de al menos 1.5 mM en la reacción por cada 0.5 μ M de Pp-Glk (Koide *et al.*, 2013).

La Pp-Glk de *S. coelicolor* fue encontrada por estudios de proteómica cuantitativa en cultivos con glucosa (Gubbens *et al.*, 2012), siendo el grupo de Koide (2013) quien realizó la sobreexpresión en *E. coli* para su posterior purificación en columnas de afinidad a Ni²⁺ y su caracterización bioquímica parcial. En dicha caracterización se observó que la máxima actividad de la Pp-Glk de *S. coelicolor* se encontraba a pH 9.5-10 y 28°C, presentó valores de Km de 1.24×10^{-2} y 3.87×10^{-3} para glucosa y hexametáfosfato, respectivamente. Cuando se determinó su peso molecular por cromatografía de exclusión molecular se observó que era de 200 kDa. Dado que el peso de la enzima es de 28 kDa, se dedujo que la enzima se oligomeriza en solución. Finalmente, se determinó que la Pp-Glk muestra actividad usando ATP como sustrato, pero observaron que a concentraciones menores de 1.5 mM esta actividad desaparece. Se propone que la actividad de la enzima con ATP debe estar controlada positivamente por la concentración de este sustrato a través de una interacción alostérica (Koide *et al.*, 2013).

El único reporte sobre la enzima de *M. coralloides*, proporciona datos de actividades sobre algunos sustratos como glucosa y glucosamina, además de gránulos de Pp de 15, 25, 45 y 75 unidades, pero no da información sobre Km, Vmax o peso molecular (González *et al.*, 1990).

Hay que destacar que a diferencia de las demás actividades de Pp-Glk reportadas hasta ahora, *M. phosphovorius* presenta una baja afinidad por sustratos con cadena cortas de Pp (menores a 10 unidades) y no muestra ninguna actividad con ATP (Tanaka *et al.*, 2003). *M. phosphovorius* fue aislada de un sistema biológico para la remoción de fósforo y se descubrió que era capaz de almacenar altas concentraciones de Pp que llegan hasta 48% de su peso seco en forma de fosfato cuando se cultiva en glucosa (Tanaka *et al.*, 2003). Cuando purificaron la Pp-Glk de esta bacteria, descubrieron que era incapaz de utilizar ATP como donador del grupo fosfato, aun cuando probaron concentraciones tan altas como 5-10 mM (Tanaka *et al.*, 2003). Para apoyar el hecho de que esta bacteria se ha adaptado a un medio rico en fósforo, se encontró que en su secuencia genómica hay 2 genes de *pp-Glk*, además de que en comparación con otras actinobacterias posee un mayor número de genes relacionados con el transporte de fósforo y la síntesis de Pp (Kawakoshi *et al.*, 2012).

En *C. glutamicum* se ha visto que las mutantes $\Delta pp-Glk$, muestran disminución en su velocidad de crecimiento y en su cantidad de biomasa final cuando se cultiva en medios en

concentraciones altas de glucosa (4%) o en 50 mM de maltosa (Lindner *et al.*, 2010). Sin embargo, tanto la mutante como la cepa silvestre crecen de manera semejante a concentraciones de 1% de glucosa. Por tanto, se piensa que esta enzima podría estar relacionada con la fosforilación de la glucosa, cuando hay una mayor concentración en el medio, en el caso opuesto, utiliza solamente la ATP-Glk (Lindner *et al.*, 2010).

En *M. tuberculosis*, las mutantes $\Delta Pp-Glk$ presentan una severa afectación de su crecimiento en medio con glucosa como única fuente de carbono, a pesar de que cuentan con la ATP-Glk intacta (Marrero *et al.*, 2013). En contraste, las mutantes $\Delta ATP-Glk$ no muestran diferencias significativas en su crecimiento con respecto a la cepa silvestre, cuando son cultivadas en glucosa (Marrero *et al.*, 2013).

Como se mencionó en los antecedentes, la enzima de *Arthrobacter* sp. cepa KM es una glucomanocinasa (GMK) que puede utilizar Pp y ATP. Esta enzima prefiere la glucosa sobre manosa por 2.6 veces y por casi 13 veces sobre fructosa cuando se coloca Pp. En cambio usando ATP, la GMK prefiere a la glucosa 3.3 veces en comparación con manosa y con fructosa no hay diferencia, sigue siendo 13 veces menos que con glucosa. Aunque esta enzima ha sido purificada, caracterizada bioquímicamente y cristalizada, no se ha investigado su relevancia biológica dentro de la bacteria (Mukai *et al.*, 2003).

Lo mismo se observa para las enzimas de *M. phlei* (Szymona y Ostrowsky, 1964), *P. shermanii* (Pepin *et al.*, 1987), las cuales han sido purificadas completa o parcialmente, y se les determinaron algunos de sus parámetros cinéticos.

Un caso aparte lo constituye la Pp-Glk de la actinobacteria *Streptomyces aureofaciens*, la cual fue detectada a lo largo del crecimiento de la bacteria, pero no le fueron determinadas ninguna de sus características bioquímicas (Hostalek *et al.*, 1976).

Resumiendo, la mayoría de los estudios sobre Glks bacterianas han sido sobre sus características bioquímicas o cristalográficas. Sin embargo, poco se ha revisado sobre la presencia de varias Glks con diferente preferencia por el donador del grupo fosfato dentro de una misma cepa (Lindner *et al.*, 2010, Marrero *et al.*, 2013). Además, aun cuando en algunos microorganismos se han reportado funciones regulatorias de las Glks (Angell *et al.*, 1994, Wagner *et al.*, 1995, Lengsfeld *et al.*, 2009), hasta el momento no se ha establecido el papel de las ATP-Glks dentro del mecanismo de RCC en el género *Streptomyces*. Finalmente, a pesar de que se han realizado estudios tan diversos sobre las Glks, solamente existe un par de reportes sobre la cinética de producción de estas enzimas en *Streptomyces* (Hostalek *et al.*, 1976, van Wezel *et al.*, 2007).

Es por esto que resulta de importancia la búsqueda de las Glks presentes en *S. peucetius* var. *caesius*, para después hacer una descripción de su cinética de producción en medio líquido y correlacionarla con su posible función dentro de esta bacteria.

JUSTIFICACIÓN

Debido a la escasa información sobre la presencia de varias Glks con diferente uso de donador fosfato y del papel fisiológico de éstas en *Streptomyces*, decidimos enfocarnos a determinar cuántas actividades de glucosa cinasa existen en *Streptomyces peucetius* var. *caesius* y realizar un estudio fisiológico de las mismas comparando con otras cepas del mismo género.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la fisiología de producción de Glks en la cepa *Streptomyces peucetius* var. *caesius*

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar el número de enzimas con actividad de Glk producidas por *S. peucetius* var. *caesius* en diferentes fuentes de carbono.

Realizar un perfil de la producción de Glks de *S. peucetius* var. *caesius*

Comparar la producción de Glks de *S. peucetius* var. *caesius* con las producidas por otras cepas del mismo género.

MATERIAL Y MÉTODOS

CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Streptomyces peucetius NRRL B-3826, y *Streptomyces peucetius* var. *caesius* NRRL B-5337 fueron obtenidas de la Agriculture Research Service Culture Collection, U.S. Department of Agriculture (Peoria, IL). La cepa de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* Dog^R, fue aislada a partir de *S. peucetius* var. *caesius* NRRL B-5337 por su capacidad para crecer en lactosa y 2-desoxiglucosa (Segura *et al.*, 1996). *Streptomyces thermocarboxydus* K155 fue aislado e identificado previamente en nuestro laboratorio (Avalos-García, 2010). El micelio de estos microorganismos fue obtenido como reporta Segura *et al.* (1996).

Las bacterias fueron conservadas por transferencias en serie y almacenadas a 4°C en placas con medio Extracto de levadura/extracto de malta (YM) (0.4% extracto de levadura, 1% extracto de malta y 0.4% glucosa), suplementado con 1.5% de agar. Para realizar los experimentos de determinación del crecimiento y actividad de Glk en *S. peucetius* var. *caesius*, se utilizó el medio mínimo NDYE (Apéndice 1), sin solución de vitaminas (Dekleva *et al.*, 1985). Para determinar la actividad de Glk se sembró 1 mL de micelio de *S. peucetius* var. *caesius* (aprox. 0.2 mg de peso seco/mL) en un matraz bafleado de 250-mL conteniendo 50 mL de medio complejo YM para su propagación. El matraz inoculado fue incubado a 29°C en una agitadora orbital a 180 rpm, durante 24 h. El cultivo fue cosechado y el botón celular fue resuspendido en 5 mL de solución salina isotónica (0.85% w/v NaCl). Un mL de la suspensión mencionada antes, fue usado para inocular matraces de 250-mL con 50 mL de medio mínimo NDYE y fue incubado a las mismas condiciones de cultivo ya mencionadas.

La cepa protótrofa de *Streptomyces coelicolor* A3(2) M145 (SCP-1, SCP-2) y *S. lividans*, fueron proporcionadas por el John Innes Centre (Norwich, UK). Para el crecimiento y producción de Glk, se inocularon matraces bafleados con medio NMMP (Apéndice1) (Kieser *et al.* 2000) con aproximadamente 10⁶ esporas y fueron incubados a 29°C en una agitadora orbital a 180 rpm.

La concentración de glucosa residual en el medio de cultivo se determinó utilizando el método de glucosa oxidasa/peroxidasa (GOD-POD marca Spinreact). El crecimiento fue estimado por peso seco como lo reportan Forero *et al.* (2012).

PREPARACIÓN DE EXTRACTOS LIBRES DE CÉLULAS

Se separaron las células del medio de cultivo centrifugando a 6000 rpm, el botón celular obtenido se resuspendió en amortiguador PED (75 mM K_2HPO_4 , 1 mM EDTA, y 2 mM DTT). Los extractos crudos se obtuvieron sonicando el botón celular a 50 W (4 pulsos de 1 min con descansos de 30 s). La muestra sonicada se centrifugó a 13 000 rpm por 30 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante para realizar las determinaciones de actividad de Glk y proteína. La proteína fue determinada por el método de Bradford (Bio-Rad reagent) usando albúmina sérica bovina como estándar.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ANTRACICLINAS

Se tomaron muestras de 5 mL de los diferentes tiempos de incubación, las muestras fueron centrifugadas a 8000 rpm durante 10 min. La extracción de antraciclinas se realizó a partir del botón celular usando una mezcla de acetona y 0.05 M de ácido sulfúrico (4:1), de acuerdo a lo descrito por Arcamone *et al.* (1969). Las antraciclinas totales fueron cuantificadas a 495 nm usando un coeficiente de extinción molar para doxorubicina de $11500 M^{-1} cm^{-1}$ (Zeman *et al.* 1998).

DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE ATP-GLK Y PP-GLK

La actividad de ATP-Glk se midió espectrofotométricamente monitoreando la reducción del NADP ($\epsilon = 6.22 cm^{-1} mM^{-1}$) en una reacción acoplada con la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. La mezcla de reacción contenía 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2.8 mM D-glucosa, 25 mM $MgCl_2$, 0.5 mM NADP, 1 mM ATP, y $0.7 U mL^{-1}$ de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Roche). Para la medición de la actividad de Pp-Glk el ATP fue reemplazado en la mezcla de reacción por $2 mg mL^{-1}$ de polifosfato de sodio (crystals, +80 mesh, 96%, Aldrich). Las unidades de actividad enzimática fueron expresadas como nmol NADP reducido $min^{-1} mg\ proteina^{-1}$ a 25°C.

Los zimogramas se llevaron a cabo sobre geles de electroforesis nativos al 8% de poliacrilamida como fue reportado por Imriskova *et al.* (2001). Las bandas con actividad Glk fueron localizadas en los geles usando un método acoplado a la formación de la sal de formazan producida por la reducción de la sal de azul de tetrazolio (MTT). Para realizar el zimograma se preparó un gel de empalme de agarosa al 0.8% que contenía Tris-HCl 100 mM, pH 7.5, glucosa 10 mM, NADP 5 mM, 1 mM ATP, MTT $0.17 mg^{-1} mL^{-1}$, metosulfato de fenazina (PMS) $0.08 mg^{-1} mL^{-1}$ y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa $0.5U mL^{-1}$. Después de la electroforesis, el gel nativo se lava con buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.5 para evitar algún tipo de inhibición durante la reacción. Las bandas de color azul intenso se visualizaron después de incubar en cámara húmeda a 37°C.

IDENTIFICACIÓN DE LA ENZIMA PP-GLK

La electroforesis no desnaturizante (PAGE) de las muestras de las cinéticas de producción de Glk se realizaron de acuerdo con el método de Laemmli *et al.* (1970). Las bandas con actividad de Glk fueron detectadas por zimogramas y las bandas positivas fueron cortadas del gel PAGE para realizar la identificación de proteínas por espectrometría de masas con MALDI-TOF (Henzel and Stults, 1996). Las comparaciones de los péptidos obtenidos se realizaron empleando el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul *et al.* 1997), con el algoritmo “blastp” (protein-protein BLAST).

CLONACIÓN DEL GEN DE LA ENZIMA PP-GLK

El gen codificante de la Pp-Glk de *S. peuceitius* var. *caesius* fue amplificada por PCR a partir de su DNA genómico. Los cebadores utilizados se diseñaron con base en alineamientos de los genes de Pp-Glk putativos de *Streptomyces*, obtenidos de la base de datos StrepDB (Strepdb.streptomyces.org.uk). Las secuencias de los cebadores utilizados fueron:

forward (5'-CCATGCAGATCTTCGGTGTGGACATCGGTGGATCC) y

reverse (5'-CATCGCCGCTCCCACGATCCCCGCGTTGTTCTG)

Las condiciones de la reacción de amplificación por PCR fueron un paso inicial de desnaturización a 95°C (3 min), después 25 ciclos de 95°C (1 min), 55°C (1 min), 72°C (1 min) y una extensión final a 72°C (7 min). Los productos de PCR fueron purificados y clonados en el pGEM T-easy de acuerdo con las instrucciones del proveedor (Promega®). Los plásmidos obtenidos fueron aislados y posteriormente secuenciados en la compañía Laragen, Inc. (10601 Virginia Ave Culver City, CA 90232).

ALINEAMIENTOS Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Las secuencias de aminoácidos de las proteínas fueron descargadas de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y el alineamiento se realizó utilizando el programa MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log- Expectation) (Edgar, 2004). Con el alineamiento obtenido se hizo un análisis de distancias y se construyó un árbol filogenético utilizando el software MEGA5.2. Con el programa se corrieron 1000 réplicas de bootstrap usando el método estadístico de Neighbor joining y el modelo JTT (Jones-Taylor-Thornton).

RESULTADOS

EFFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO EN EL CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE GLK EN *Streptomyces peucetius* var. *caesius*

Se realizó una búsqueda de probables genes de Glks y hexocinasas (Hxks) en los genomas liberados de *Streptomyces* (<http://strepdb.streptomyces.org.uk/>) y se observaron al menos 5 probables Glks/Hxks dependientes de ATP, por ello se decidió iniciar con la determinación de este tipo de actividades. Con el fin de establecer el efecto de la fuente de carbono sobre la producción de Glks y/o hexocinasas dependientes de ATP, se realizó una cinética de crecimiento y actividad de ATP-Glk en medio mínimo NDYE (Dekleva *et al.*, 1985) con 100 mM glucosa (sustrato para Glk), 100 mM manosa (sustrato para hexocinasas) o 20 mM glutamato (no metabolizado por la vía de Glk). La bacteria cultivada en glucosa o manosa presentó un crecimiento semejante con valores de velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.086 y 0.073 h⁻¹ (Tabla 2), respectivamente. Por el contrario, el estreptomiceto crecido en glutamato mostró un menor crecimiento con un valor de μ de 0.053 h⁻¹. La actividad de ATP-Glk se detectó solamente cuando el microorganismo era crecido con glucosa como única fuente de carbono, mostrando un incremento en actividad específica de por lo menos 2 veces a las 10 h de incubación con respecto a la actividad inicial. Por el contrario, los cultivos con manosa o glutamato no presentaron inducción de la actividad de ATP-Glk. Estos resultados sugieren que en *S. peucetius* var. *caesius*, la actividad de ATP-Glk es inducible por glucosa.

Tabla 2. Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento y la producción de ATP-Glk en *S. peucetius* var. *caesius*.

Condición ^a	μ (h ⁻¹)	ATP-Glk (U/mg de proteína)		Incremento (veces)
		0 h	10 h	
Glucosa	0.087	33.56±4.63	65.72±1.98	1.95
Manosa	0.073	33.56±4.63	31.37±1.89	0.93
Glutamato	0.053	33.56±4.63	27.72±1.52	0.83

^aLas fuentes de carbono se usaron a una concentración de 100 mM exceptuando el glutamato que fue usado a 20 mM. Las células fueron crecidas en medio NDYE.

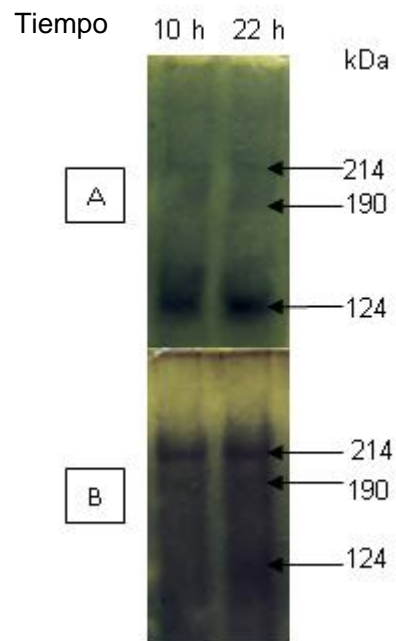


Figura 4. Actividad de ATP-Glk de *S. peucetius* var. *caesius* determinado por zimograma. Las células fueron cultivadas en medio NDYE y se muestran los extractos de 10 y 22 h en (A) 100 mM de D-glucosa y (B) 20 mM de L-glutamato. Los extractos crudos fueron corridos en geles no desnaturizantes y la actividad fue revelada por medio de una reacción acoplada a la reducción de una sal de tetrazolio (MTT) según Imriskova *et al.* 2001.

Para determinar la presencia de otras actividades de Glk o Hxk dependientes de ATP, se realizaron zimogramas de los extractos de las células crecidas en glucosa y glutamato utilizando geles de electroforesis no desnaturalizantes.

En ambos zimogramas (Fig. 4) se observaron tres bandas con actividad con pesos moleculares aproximados de 214, 190 y 124 kDa. Con el objetivo de establecer si las bandas positivas correspondían a Glks, dichas bandas fueron cortadas de ambos geles para su secuenciación por espectrometría de masas con MALDI-TOF. Utilizando el algoritmo “blastp”, se identificaron dos Glks en el zimograma del cultivo con glucosa. Una de ellas mostró semejanza con la ATP-Glk reportada previamente por Imriskova *et al.*, (2001), de ésta se obtuvieron seis péptidos (Tabla 3) y de la otra enzima se obtuvieron 2 péptidos únicos con semejanza a una Pp-Glk de *Streptomyces avermitilis* (<http://strepdb.streptomyces.org.uk>). Sorprendentemente, ambas Glks se encontraron en la misma banda de actividad de 124 kDa.

Tabla 3. Resultados de la secuenciación de la banda de 124 kDa. El “Puntaje del ion” se define como $-10 \cdot \log(P)$, donde P es la probabilidad de que las coincidencias observadas sean eventos aleatorios. Los Puntajes individuales del ion > 43 indican una identidad con probabilidad del 95% ($p < 0.05$).

7. [gil50263006](#) Masa: 33054 Puntaje: 305 Queries matched: 6 emPAI: 0.38
ATP-glucose kinase [*Streptomyces peuceitius* var. *caesius*]

Mr EXPERIMENTAL	CORTES PERDIDOS	PUNTAJE DEL ION	EXPECT	PÉPTIDOS
1327.7773	1	55	0.006	R.QEPLKEEVEAR.V
1396.9137		38	0.24	R.GHFGVAAEFGHIR.M
1397.4995		67	0.00024	R.GHFGVAAEFGHIR.M
1411.9610		89	1.5E-06	R.LGNDAGLVGAADLAR.E
1762.1518		80		K.IAAGVVDEE <u>G</u> NILSTFK.V + Deamidated (NQ); [-0.9476 at E9]
2147.2555		24	4.6	K.VPTPTTPQAIVDAIAAAVEGAR.A

27. [gil29829751](#) Masa: 26047 Puntaje: 48 Queries matched: 2 emPAI: 0.15
polyphosphate glucokinase [*Streptomyces avermitilis* MA-4680]

Mr EXPERIMENTAL	CORTES PERDIDOS	PUNTAJE DEL ION	EXPECT	PÉPTIDOS
1028.9673		48	0.023	K.FLPLIEGIK.A
1543.4510	2	48		R.KSH <u>K</u> FLPLIEGIK.A + [+34.0631 at K4]

Las otras bandas de 190 y 214 kDa, correspondieron a varias deshidrogenasas (aldehído-, dihidrolipoamida- y delta-1-pirrolino-5-carboxilato deshidrogenasas). Ninguna de las tres bandas positivas observadas en los zimogramas de los cultivos con glutamato correspondió a una Glk, las proteínas identificadas fueron nuevamente deshidrogenasas (NAD-glutamato, 3-hidroxiacil-CoA, inosina-5'-monofosfato, 3-hidroxi-butiril-CoA, dihidrolipoamida y L-alanina deshidrogenasas). Para la detección de la actividad de Glk se realiza una reacción acoplada. La Glk produce glucosa-6-fosfato que es utilizada por la enzima Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en presencia de NADP resultando en 6-fosfogluconato y NADPH. El NADPH reacciona con la sal de tetrazolio (MTT), que al reducirse genera la sal de formazán de color azul intenso que es lo que observamos en el zimograma. Por lo tanto, la detección de las deshidrogenasas en el zimograma se debió probablemente a que éstas utilizaron el NADP de los reactivos de revelado.

CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE PP-GLK

Debido a que la secuenciación de proteínas sugería la presencia de una Pp-Glk en *S. peucetius* var. *caesius* y dados los antecedentes en este grupo de bacterias, se determinó la actividad de dicha enzima y de ATP-Glk en cultivos crecidos en medio NDYE suplementado con glucosa o glutamato. Como se observa en la figura 5A, la Pp-Glk mostró su máxima actividad a 48 h (403.29 U/mg proteína) de incubación durante la fase estacionaria de crecimiento. Por el contrario, la actividad de ATP-Glk presentó su pico máximo a las 12 h (267.68 U/mg proteína) durante la fase de crecimiento logarítmico y posteriormente permaneció a niveles semejantes hasta las 48 h de fermentación (Fig. 5B). Adicionalmente, como se muestra en la misma figura, estas actividades permanecieron a bajos niveles en glutamato, apoyando la inducibilidad de ambas enzimas por glucosa.

Como se mencionó anteriormente, *S. peucetius* var. *caesius* es una mutante obtenida por mutagénesis química a partir de la cepa silvestre *S. peucetius* (Arcamone *et al.*, 1969), por lo que se decidió buscar las actividades de ambas Glks en esta cepa silvestre. Como se observa en la Fig. 5A y B, *S. peucetius* presentó mayor actividad de ATP-Glk que de Pp-Glk. La actividad de ATP-Glk alcanzó su máximo a las 48 h de incubación y después disminuyó, mientras que la actividad de Pp-Glk permaneció a nivel bajo hasta las 48 h y después aumentó ligeramente. Con respecto al crecimiento, *S. peucetius* alcanzó una mayor velocidad específica de crecimiento ($\mu = 0.22\text{h}^{-1}$) que la cepa *S. peucetius* var. *caesius* ($\mu = 0.11\text{h}^{-1}$) (Fig. 5C) aunque al final esta cepa alcanzó niveles de biomasa semejantes a los de la cepa silvestre.

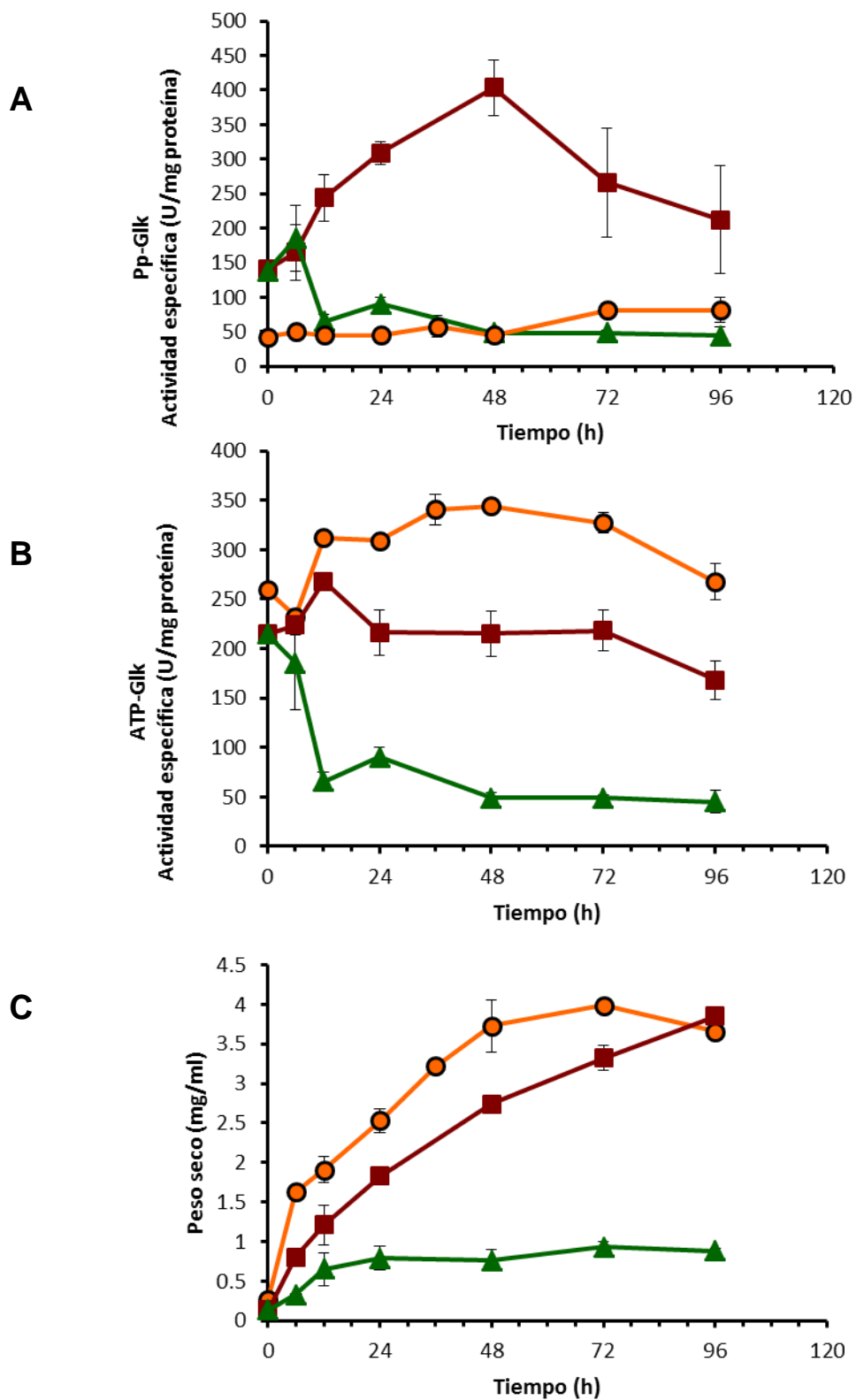


Figura 5. Cinética de producción de Pp-Glk (A), ATP-Glk (B) y crecimiento (C) de *S. peucetius* cultivado con 100 mM de glucosa (●), *S. peucetius* var. *caesius* cultivado con 100 mM de glucosa (■) y *S. peucetius* var. *caesius* con 20 mM de glutamato (▲). Todas las cepas fueron cultivadas en medio NDYE.

La cepa de *S. peucetius* var. *caesius* crecida en medio NDYE con glutamato mostró el nivel de biomasa más bajo en todos los tiempos analizados (Fig. 5C). Respecto al consumo de glucosa, se observó que *S. peucetius* y *S. peucetius* var. *caesius* prácticamente se terminan la glucosa a las 120 y 144 h, respectivamente. Mostraron una velocidad de consumo de 0.87 mM h⁻¹ para *S. peucetius* var. *caesius* y 1.07 mM h⁻¹ para *S. peucetius*.

DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE PP-GLK EN OTRAS CEPAS DEL GÉNERO *Streptomyces*

Los resultados observados en la sección anterior sugieren que *S. peucetius* var. *caesius* y *S. peucetius* presentan una preferencia distinta para utilizar alguna de las dos Glks en la fosforilación de la glucosa. Como no existe información sobre este fenómeno en otros estreptomicetos decidimos investigar el comportamiento de las actividades de ATP-Glk y Pp-Glk en otras cepas de *Streptomyces*. Inicialmente se buscó la presencia de actividad de Pp-Glk en la cepa modelo *S. coelicolor* (anotada en el genoma como SCO5059) en medio mínimo NNMP (Apéndice 1) con 50 mM de glucosa. Como se puede observar en la Fig. 6, la enzima ATP-Glk alcanzó su máxima actividad a las 12 h de incubación; a ese mismo tiempo se detectó una baja actividad de Pp-Glk (10% con respecto a la actividad de ATP-Glk). Cuando se determinaron ambas actividades en otras cepas de este mismo género (*S. lividans* y *S. thermocarboxydus* K155) se observó algo similar, exhibieron menores actividades de Pp-Glk con respecto a sus actividades de ATP-Glk (Tabla 2). Contrasta lo observado en la cepa *S. peucetius* var. *caesius*, con los otros estreptomicetos analizados. En la tabla 2 se observa que *S. coelicolor*, *S. lividans*, *S. thermocarboxydus* K155 y *S. peucetius* presentan tasas de actividad Pp-Glk/ATP-Glk menores de 0.3. Por el contrario, en *S. peucetius* var. *caesius* la tasa fue de 1.87. La cepa silvestre *S. peucetius* mostró 37.5% más actividad de ATP-Glk que *S. peucetius* var. *caesius*, sin embargo la actividad de Pp-Glk fue casi cinco veces mayor en la cepa sobreproductora de doxorubicina que en su cepa silvestre.

Como se mencionó en los antecedentes, se le ha asignado un papel regulatorio a la ATP-Glk en la RCC, por ello se aislaron mutantes Dog^R de *S. peucetius* var. *caesius* que son insensibles a la RCC y muestran bajos niveles de actividad de ATP-Glk (Segura *et al.*, 1986). Con el fin de establecer si estas mutantes estaban afectadas en una o en ambas Glks, se les determinaron las actividades de las dos enzimas. Como se muestra en la Tabla 2, la mutante Dog^R presenta bajos niveles de ambas Glks, aun cuando la tasa Pp-Glk/ATP-Glk se mantiene en un valor de 1.95, semejante al de la cepa *S. peucetius* var. *caesius*.

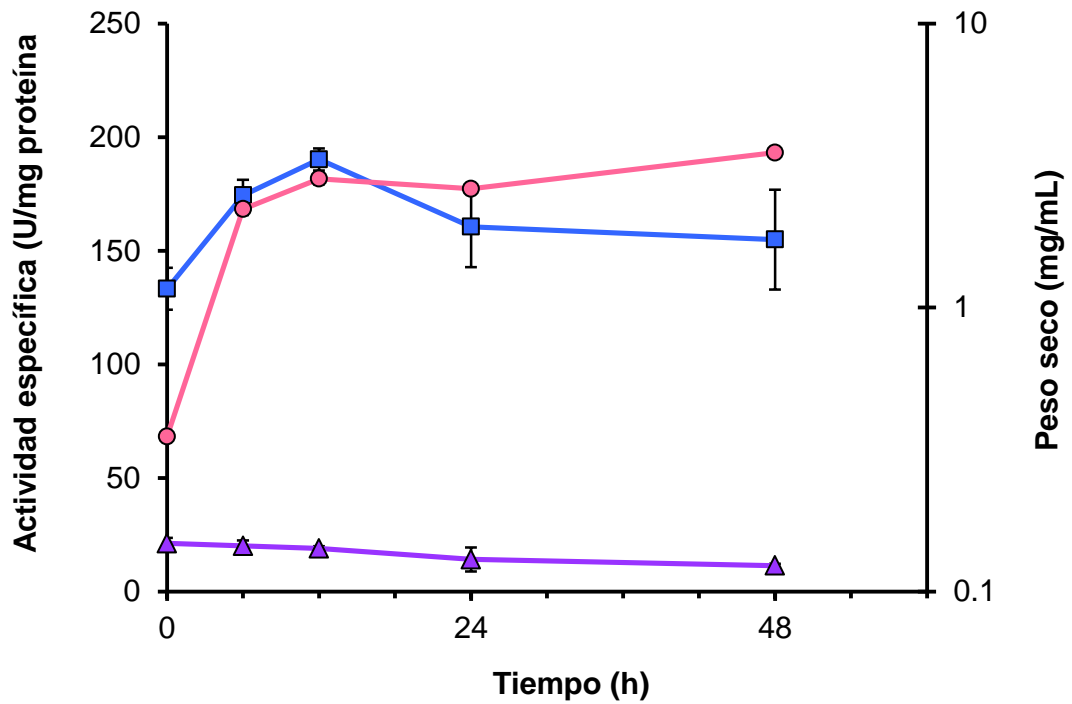


Figura 6. Cinética de producción de ATP-Glk (■) y Pp-Glk (▲) de *S. coelicolor* M145 cultivado en medio mínimo NMMP con 50 mM de D-glucosa. El crecimiento se determinó por peso seco (●).

Tabla 4. Comparación de las actividades de ATP- y Pp-Glk presentes en varias cepas de *Streptomyces*^a

Cepa de <i>Streptomyces</i>	Actividad de ATP-Glk (U/mg proteína)	Actividad de Pp-Glk (U/mg proteína)	Tasa de actividad Pp-Glk/ATP-Glk
<i>S. peucetius</i>	344.31 ± 34.73	44.95 ± 2.46	0.13
<i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i>	215.02 ± 22.74	403.29 ± 40.25	1.87
<i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i> Dog ^R	52.19 ± 1.52	102.05 ± 23.62	1.95
<i>S. coelicolor</i>	154.95 ± 21.99	11.41 ± 0.78	0.07
<i>S. lividans</i>	19.08 ± 3.47	5.74 ± 0.67	0.30
<i>S. thermocarboxydus</i>	34.08 ± 4.31	9.18 ± 3.22	0.27

^a*S. peucetius*, *S. peucetius* var. *caesius*, *S. peucetius* var. *caesius* Dog^R y *S. thermocarboxydus* fueron cultivados en medio NDYE más 100 mM de glucosa. *S. coelicolor* y *S. lividans* fueron cultivados en medio NMMP más 50 mM de glucosa. Los valores de actividad fueron tomados a las 48 h de incubación.

CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE LA Pp-Glk DE *S. peucetius* var. *caesius*

Con el fin de determinar algunos parámetros como temperatura y pH óptimos, se realizó una semi-purificación de la Pp-Glk de *S. peucetius* var. *caesius* por precipitación diferencial con sulfato de amonio. La actividad de ATP-Glk se encontró en la fracción de saturación 60-80% y la Pp-Glk en la fracción 80-100%. Ya que las dos actividades pudieron separarse, entonces se hizo una caracterización preliminar de la Pp-Glk. Se encontró que su pH óptimo era de 8.5 y su temperatura óptima de 48-52°C. Respecto a su preferencia por el tamaño de cadena de Pp, se observó que no utiliza cadenas de 3 fosfatos (tripolifosfato), utiliza cadenas de 6 (Pp6), pero prefirió cadenas de alrededor de 18 unidades de fosfato. Adicionalmente se probó su actividad con ATP, pero no fue capaz de usarlo. En concordancia, se encontró que la enzima ATP-Glk no fue capaz de utilizar el Pp como donador de fosfato.

COMPARACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE ANTRACICLINAS EN TRES CEPAS DE *Streptomyces*

Hostalek *et al.* (1976), han reportado que *S. aureofaciens* 8425, la cepa sobreproductora de clortetraciclina (CTC) muestra aumentada la concentración de Pp y la actividad de Pp-Glk cuando hay bajos niveles de ATP, lo que coincide con la intensa producción del antibiótico. En contraste, la producción de CTC y Pp-Glk está disminuida en su cepa silvestre *S. aureofaciens* RIA 57 (Curdová *et*

al., 1976). Los autores proponen que dado que decrece la presencia de ATP, el Pp se vuelve el donador de fosfato para la producción de CTC (Hostalek *et al.*, 1976).

Tomando en cuenta lo anterior y que la producción de metabolitos secundarios es también una de las diferencias entre las cepas *S. peucetius*, *S. peucetius* var. *caesius* y *S. peucetius* var. *caesius* Dog^R, decidimos cuantificar la producción de antraciclinas totales de las tres cepas.

En la figura 7 se observa que *S. peucetius* var. *caesius* y la mutante Dog^R inician la producción de antraciclinas a las 24 h de incubación, mientras que la cepa silvestre la inicia hasta las 32 h. Así mismo, mientras que la concentración de antraciclinas en *S. peucetius* se mantiene más o menos constante después de las 48 h, las otras dos cepas continúan aumentando su producción con el tiempo. Sin embargo, en *S. peucetius* var. *caesius*, la producción de antraciclinas totales fue 4 y 2.5 veces mayor que la cepa silvestre *S. peucetius* y la mutante Dog^R respectivamente (Tabla 3). En esta misma tabla se muestra el rendimiento de antraciclinas con respecto a la fuente de carbono consumida por cada cepa, Como se esperaba, el consumo de glucosa fue muy semejante en las cepas *S. peucetius* (22.76 mg mL⁻¹) y *S. peucetius* var. *caesius* (18.91 mg mL⁻¹) mientras que la mutante Dog^R utilizó solamente 2.88 mg/mL de glucosa, ya que esta cepa también presenta problemas para el transporte de glucosa y disminución en su actividad de Glk (Segura *et al.*, 1986). El rendimiento de antraciclinas respecto a glucosa fue mayor en la mutante Dog^R seguida por su cepa parental *S. peucetius* var. *caesius* y en último lugar la cepa silvestre *S. peucetius*. El rendimiento de biomasa fue muy semejante entre *S. peucetius* y *S. peucetius* var. *caesius* y el mayor rendimiento se encontró para la mutante Dog^R.

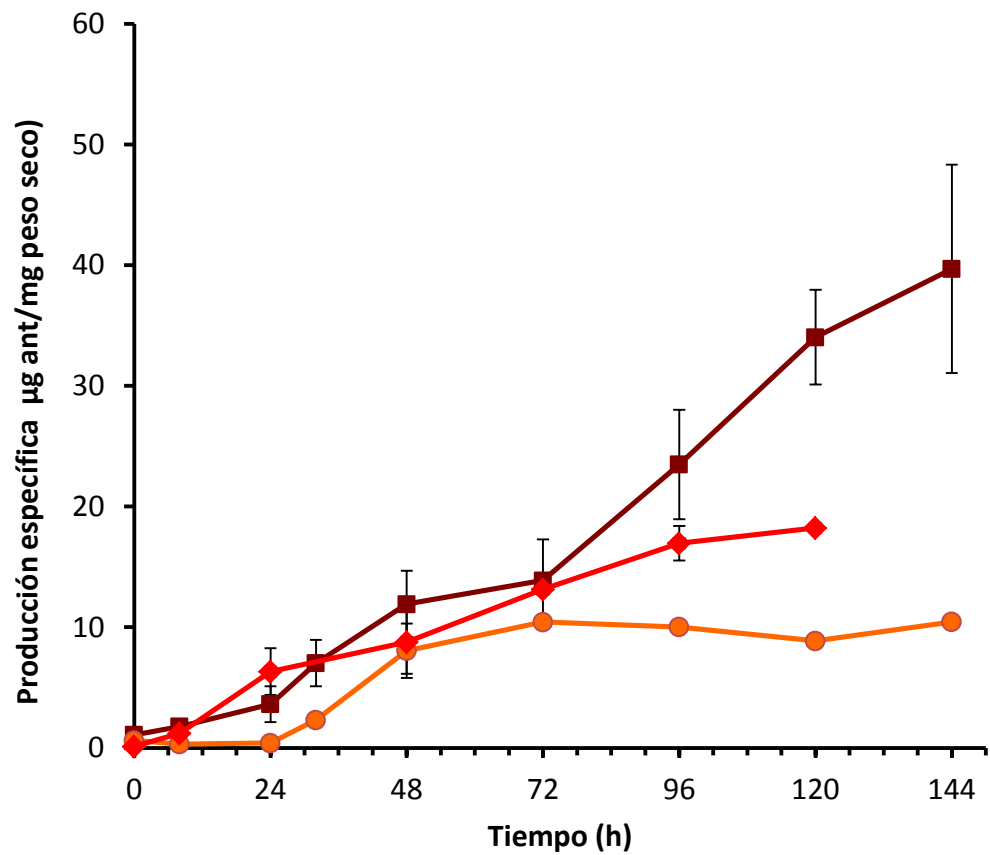


Figura 7. Cinética de producción específica de antraciclinas de *S. peuceitius* (●), *S. peuceitius* var. *caesius* (■) y de *S. peuceitius* var. *caesius* DogR. (◆) Todas las cepas fueron cultivadas en medio NDYE más 100 mM de glucosa.

Tabla 5. Comparación de rendimientos de antraciclinas totales y biomasa con respecto al consumo de glucosa en algunas cepas de *Streptomyces*^a

Cepa	Consumo de glucosa (mg/mL)	Peso seco (mg/mL)	Producción volumétrica de antraciclinas (µg/mL)	Producción específica de antraciclinas (µg/mg Peso seco)	$Y_{Ant/glc}$ (µg Ant/mg glc)	$Y_{X/glc}$ (mg peso seco/mg glc)
<i>S. peucetius</i>	22.76	4.26	37.75	8.86	1.66	0.19
<i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i>	18.91	4.07	157.45	38.70	8.33	0.21
<i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i> Dog ^R	2.88	3.2	58.31	18.22	20.25	1.11

^aTodas las cepas de *Streptomyces* fueron cultivadas en medio NDYE más 100 mM de glucosa. ^bLos datos fueron tomados a las 120 h de incubación.

CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN *Pp-Glk*

El gen *Pp-Glk* de *S. peucetius* var. *caesius* fue amplificado por PCR para posteriormente ser clonado y secuenciado. Los cebadores utilizados para la amplificación se diseñaron a partir de un alineamiento de las secuencias de Pp-Glks putativas reportadas en la base de datos de genomas secuenciados de diversas cepas de *Streptomyces* (<http://strepdb.streptomyces.org.uk>). La secuencia del gen de *Pp-Glk* de *S. peucetius* var. *caesius* mostró una identidad del 85% respecto a la reportada para *S. lividans* y *S. coelicolor*, de un 86% contra el gen de *S. thermocarboxydus* K155 y un 89% contra el de *S. avermitilis*. Del mismo modo, la correspondiente secuencia de aminoácidos mostró una identidad del 85% con la de *S. coelicolor* y *S. lividans*, 86% con la de *S. thermocarboxydus* K155 y un 88% con la de *S. avermitilis*. En todas ellas se encuentran conservadas las secuencias consenso que se consideran importantes para la unión al polifosfato GXDIGGXXIK, TXGTGIGSA y KEX₍₄₎SWXXWA (Fig. 7) (Mukai *et al.*, 2003, Liao *et al.*, 2012). Adicionalmente, al alinear las secuencias de aminoácidos de las ATP-Glks, Pp-Glks y proteínas ROK, se observa el dominio conservado de unión a ATP (DIGG) tanto en las ATP-Glks como en las Pp-Glks, pero como se esperaba, no se observa en las proteínas ROK (XylR, NagR, Mlc). Sin embargo, en las secuencias de aminoácidos de las enzimas Pp-Glk se encuentra parcialmente la secuencia consenso ROK1 [LIVM]X₍₂₎G[LIVMFCT]GX[GA][LIVMFA]X₍₈₎GX₍₃₋₅₎[GATP]X₍₂₎G[RKH] (Fig. 8) (Bae *et al.*, 2005). La secuencia consenso ROK2 se considera un motivo firma de las proteínas ROK y está formada por una secuencia rica en cisteínas [CXCGX₍₂₎GCXE] que constituye un dominio de unión a zinc también llamado “dedo de zinc” tipo C3H (Miyazono *et al.*, 2012, Concha *et al.*, 2000). Otras proteínas con este dominio son capaces de unirse a DNA, como algunos factores de transcripción eucariontes como el TFIIIA de ovocitos de rana (<http://www.zincfingers.org/default2.htm>). Como se puede observar en la Fig. 9, la secuencia ROK2 no se encuentra en ninguna de las Pp-Glks. Cabe señalar que ninguna de las secuencias de aminoácidos de las ATP-Glks de bacterias Gram-negativas tiene dicho motivo ROK2. Tal como se esperaba, las ATP-Glks de bacterias Gram-positivas y las proteínas ROK como XylR, NagR y Mlc sí contienen ambas secuencias consenso ROK.

ANÁLISIS FILOGENÉTICO

A partir del alineamiento realizado (Fig 8 y 9), se llevó a cabo un análisis filogenético en el que se incluyeron secuencias de otros miembros de las actinobacterias además de las secuencias de Glks de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y una de origen humano (HXK IV). Con el análisis realizado se construyó un árbol filogenético sin raíz, el cual está formado por dos clados principales.

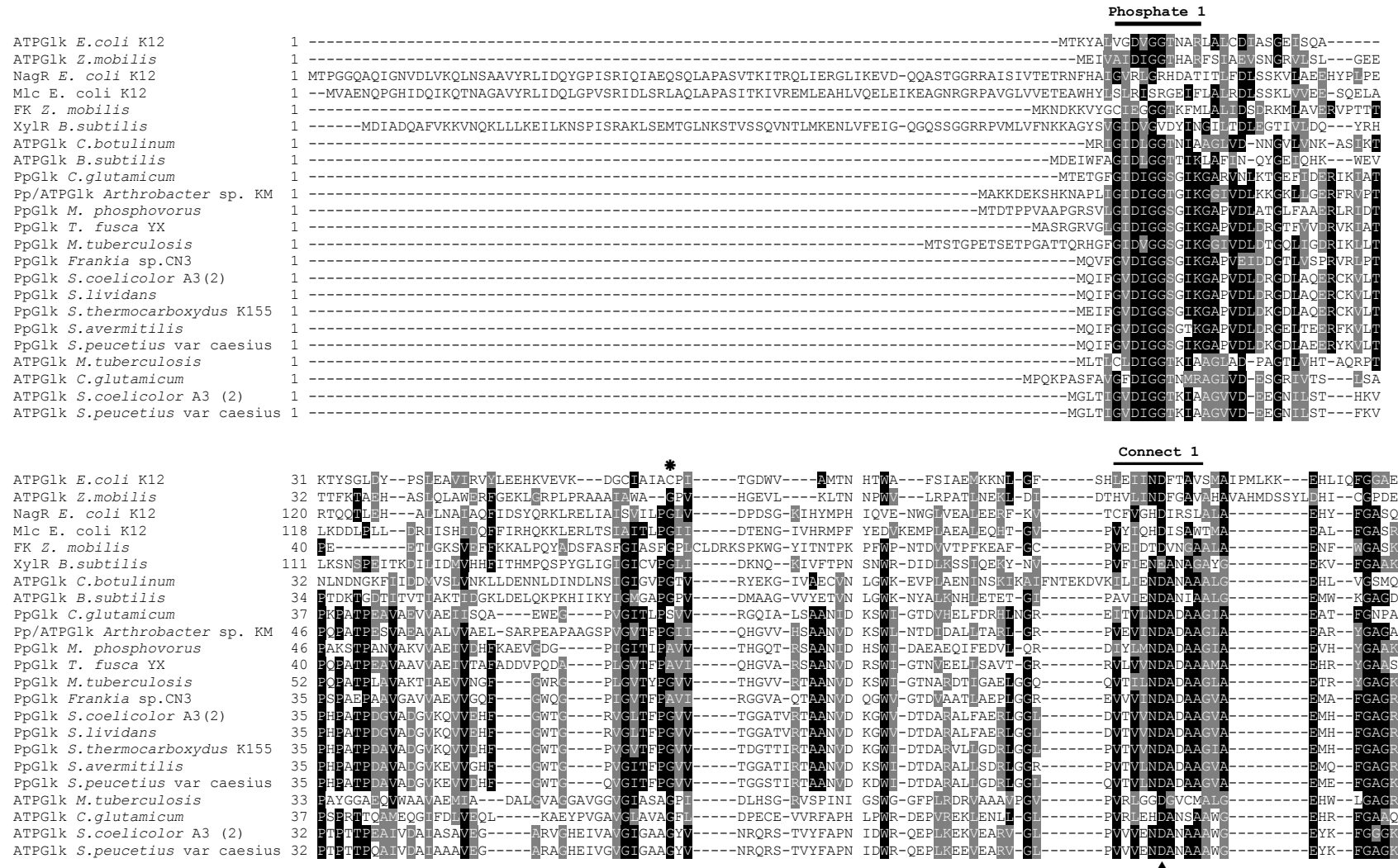


Figura 8. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de la Pp-Glk de *S. peucetius* var. *caesius* comparando con las Pp-Glks, ATP-Glks y proteínas ROK de diferentes orígenes bacterianos. El asterisco sobre la secuencia indica la Gly implicada en la unión a la glucosa. La línea superior en negrita muestra el sitio de unión a fosfato 1 y la región conectora 1. La flecha indica el Asp catalítico. NagR: Regulador de la utilización de N-acetilglucosamina, XylR: represor dependiente de xilosa, FK: fructosa cinasa, Mlc: regulador global del metabolismo de azúcar. El alineamiento de las secuencias se realizó utilizando el programa MUSCLE y fue formateado utilizando el programa BoxShade.

Uno de los clados contiene a las Glks de eucariontes y el otro contiene al resto de las secuencias de Glks bacterianas; Gram-negativas y positivas, además de contener a las proteínas ROK como Mlc de *E. coli*, el represor NAG de *Salmonella enterica* y *E. coli* y la fosfofructocinasa de *Zymomonas mobilis* (Fig. 10). De acuerdo con nuestro análisis, las ATP-Glks de bacterias Gram-positivas tienen menor relación con las ATP-Glks de bacterias Gram-negativas que con las proteínas ROK y las Pp-Glks, las cuales forman un grupo distinto y comparten el mismo ancestro común. El grupo de las Pp-Glks se subdivide en dos clados uno formado por enzimas de bacterias Gram-negativas de origen ambiental y el segundo formado por Pp-Glks de Actinobacterias como las pertenecientes a los géneros *Streptomyces*, *Arthrobacter*, *Renibacterium*, *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Corynebacterium*, *Nocardia* y el patógeno *Mycobacterium*. Como es de notar, a pesar de que las ATP-Glks y Pp-Glks se agrupan en un mismo clado, las Pp-Glks, parecen formar un grupo menos relacionado con las proteínas ROK, a diferencia de lo que ocurre con las ATP-Glks.

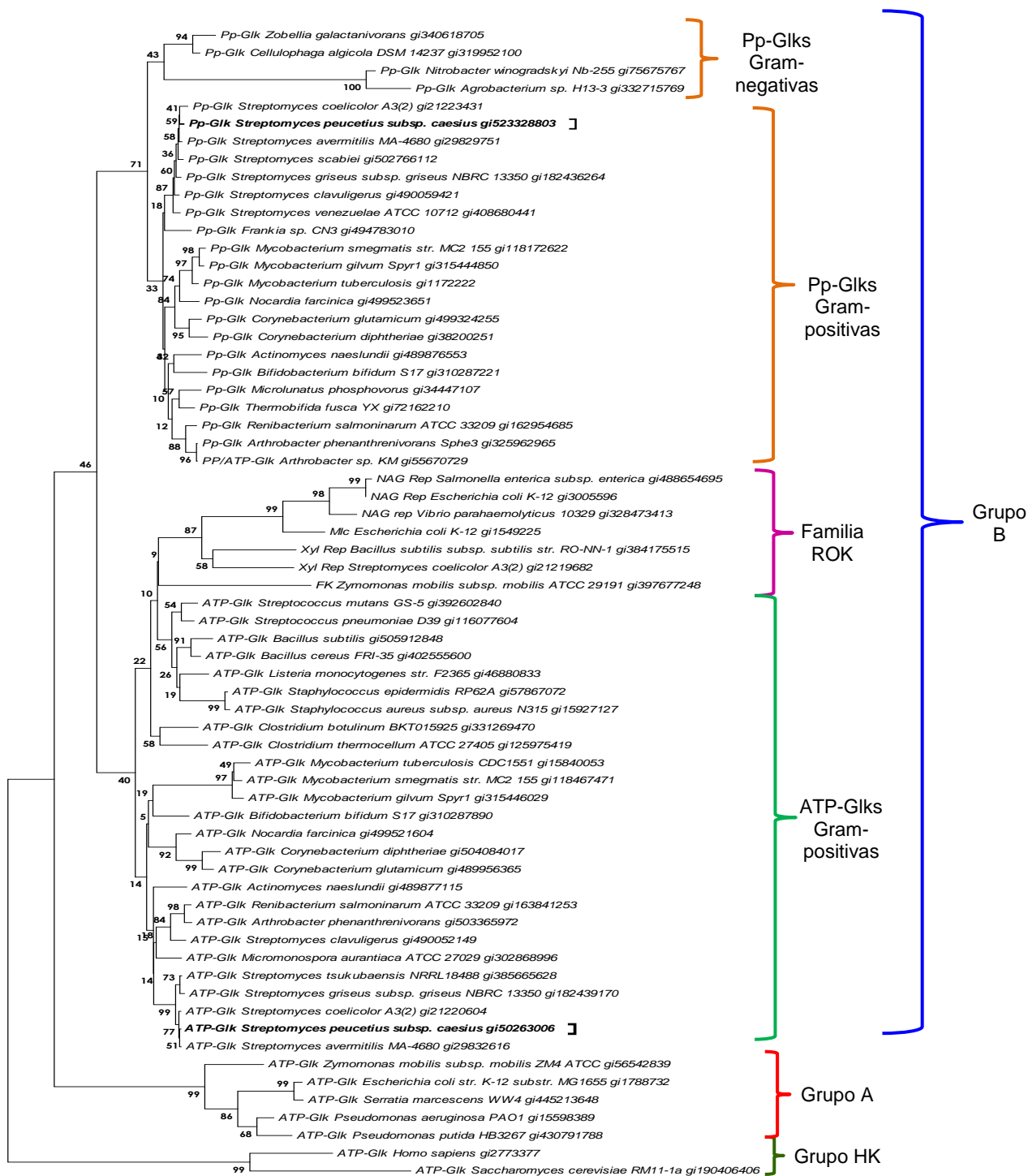


Figura 10. Árbol filogenético de las ATP-Glks, Pp-Glks y proteínas ROK. El árbol filogenético fue construido usando el método “Neighbor-Joining” a partir de los datos obtenidos del alineamiento realizado con el programa “MUSCLE”. Los valores de bootstrap se estimaron con 1, 000 réplicas y se muestran como porcentaje en los nodos correspondientes. Las enzimas ATP- y Pp-Glk de *S. peucetius* var. *caesius* están señaladas por paréntesis cuadrados en negritas.

DISCUSIÓN

En el género *Streptomyces* la enzima ATP-Glk ha sido la más estudiada en especial por su importancia en la RCC. En cambio, ha habido pocos estudios sobre la actividad de la enzima Pp-Glk. Hostalek *et al.* (1976) describieron una Pp-Glk de la cepa *S. aureofaciens*. Gubbens *et al.* (2012), encontraron, en un estudio proteómico, la presencia de una Pp-Glk en *S. coelicolor*; la bacteria había sido crecida en medio mínimo con glucosa y las proteínas recuperadas a mitad de la fase exponencial de crecimiento. Cabe señalar que cuando mutantes *glkA*⁻ de *S. coelicolor* fueron obligadas a crecer en un medio mínimo con glucosa como única fuente de carbono, las colonias que lograron crecer bajo estas condiciones expresaron una proteína con un peso molecular mayor al de la ATP-Glk y al de la Pp-Glk (Angell *et al.*, 1994).

Recientemente, la enzima Pp-Glk de *S. coelicolor* fue sobre-expresada heterológicamente en *E. coli*, para posteriormente ser purificada y parcialmente caracterizada. Sin embargo, dentro de esos estudios no determinaron ni su especificidad por el donador de fosfato ni su impacto en la fisiología de la bacteria (Koida *et al.* 2013).

En *S. peucetius* var. *caesius*, además de la ATP-Glk se detectó la presencia de una Pp-Glk cuya actividad aparece en la fase estacionaria de crecimiento. Una caracterización preliminar de la enzima mostró un pH óptimo de 8.5 y una temperatura óptima de reacción de 48-52°C. Estas características son semejantes a las que presenta la Pp-Glk de *M. tuberculosis* (Hsieh *et al.*, 1993) y contrasta con las características de la enzima de *S. coelicolor* que presentó como condiciones óptimas de reacción un pH 9.5-10 y 28°C (Koida *et al.*, 2013). La Pp-Glk de *S. peucetius* var. *caesius* no presentó actividad con tripolifosfato (Pp₃) ni con ATP, sino que prefirió cadenas de Pp de alrededor de 18 unidades. Hasta ahora hay reportadas dos enzimas que utilizan solamente Pp como donador de fosfato, la de *M. phosphovorus* (Tanaka *et al.*, 2003) y la de *M. coralloides* (González *et al.*, 1990). Las enzimas Pp-Glk de *P. shermanii* (Pepin and Wood, 1986) y *M. tuberculosis* (Phillips *et al.*, 1999) tienen preferencia por sustratos de tamaño de cadena de 400 unidades, aunque también son capaces de utilizar ATP. En estos dos casos, al aumentar el tamaño de la cadena de Pp, aumenta su afinidad hacia ella (de 1.5 X10⁻³ M para el ATP, hasta 5X10⁻⁹ M para Pp₄₀₀). Por el tamaño del sitio activo, Mukai *et al.*, (2003) predicen que la Pp-/ATP-glucomanocinasa de *Arthrobacter* sp. KM puede unir un pentafofosfato. En la Pp-Glk de *S. peucetius* var. *caesius* parece haber dificultad para unir ATP y

fosfatos de tamaño de cadena semejantes (Pp₃), probablemente debido al espacio de su sitio activo, ya que en los ensayos de actividad se observó que si era capaz de utilizar el hexametáfosfato (Pp₆).

El gen *Pp-glk* de *S. peucetius* var. *caesius* fue clonado por PCR. La secuencia parcial de DNA y aminoácidos mostró una alta identidad con los respectivos genes de *S. avermitilis* y de otros estreptomicetos. La secuencia de aminoácidos de la Pp-Glk posee las regiones de unión a fosfato (fosfato 1, 2 y 3) que son semejantes a los motivos conservados de unión al ATP (Tanaka *et al.*, 2003). Como en la Pp-Glk de la actinobacteria *Microtholunatus phosphovorius*, la enzima Pp-Glk de *S. peucetius* var. *caesius* presenta el sitio propuesto para la unión a polifosfato (fosfato 3) compuesto por dos triptófanos rodeados por aminoácidos cargados (Liao *et al.*, 2012). Un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de Glks de diferentes familias, incluyendo proteínas ROK, mostró que las Pp-Glks carecen por completo del consenso ROK2, que es el motivo firma rico en cisteínas, en donde se une un átomo de zinc. Esto último pone en entredicho la clasificación de las Pp-Glks como miembros de la familia de proteínas ROK (Kawai *et al.*, 2005).

Un análisis filogenético de Glks (ATP y Pp-Glks) y proteínas ROK, reveló dos clados principales. Uno que comprende a las ATP-Glks de eucariontes (humana y levadura) y el segundo que contiene al resto de Glks bacterianas y proteínas ROK.

Las ATP-Glks de bacterias Gram-negativas forman un clado que comparte un ancestro común con las ATP-Glks de eucariontes y con las del Grupo B. Cabe mencionar que las bacterias Gram-negativas utilizan preferencialmente al sistema PTS para fosforilar a la glucosa, por lo que las ATP-Glks de estas bacterias han sido poco estudiadas. Por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa* utiliza al sistema ABC para transportar a la glucosa y la cataboliza por la vía Entner-Doudoroff (Temple *et al.*, 1994). En esta bacteria la ATP-Glk junto con las enzimas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidratasa y 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa, son inducidas por carbohidratos como glucosa, gluconato, manitol y glicerol. Las mismas enzimas se encuentran sujetas a represión catabólica por succinato y otros intermediarios del ciclo de Krebs (Temple *et al.*, 1994).

Las ATP-Glks de bacterias Gram-positivas y las proteínas ROK se agrupan en un mismo clado compartiendo un ancestro común. Las Pp-Glks de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas comparten un ancestro común con el grupo de ATP-Glks/proteínas ROK, aunque las Pp-Glks carecen al menos del motivo rico en Cys característico de la familia ROK.

El arreglo y agrupamiento observados en el análisis filogenético está de acuerdo con la clasificación de Kawai *et al.* (2005), ya que todas las secuencias que pertenecen a cada grupo (HK, A y B) forman un clado distinto (Fig. 10). Las ATP-Glks del grupo HK (eucarióticas) comparten solamente un ancestro con los grupos A y B, lo mismo ocurre con las enzimas del grupo A (de bacterias Gram-negativas) que comparten un ancestro común con el grupo B (de bacterias Gram-positivas). Aunque las Pp-Glks se localizan en el grupo B (Glks relacionadas con proteínas ROK), hasta el momento no existe información sobre alguna función regulatoria de estas enzimas.

Actualmente existen dos teorías sobre el ancestro común de las Glks de la Familia HK; Kawai *et al.* (2005) mencionan que el ancestro común de las Glks debería ser semejante a la Pp- /ATP-Glucomanocinasa de *Arthrobacter* sp. cepa KM, ya que el Pp es el donador de fosfato más antiguo, además de que esta enzima es capaz de fosforilar tanto a la glucosa como a la manosa. A partir de esta enzima se derivarían las demás, obteniéndose posteriormente el motivo ROK o por duplicación de genes se obtendrían las Glks de mayor tamaño como la humana. La otra teoría menciona que el ancestro de las Glks del grupo B sería la ATP-Glk de *S. coelicolor*, pues a partir de ella se derivarían las Glks no-ROK por pérdida de los motivos conservados [LIVM]X₍₂₎G[LIVMFCT]GX[GA][LIVMFA]X₍₈₎GX₍₃₋₅₎[GATP]X₍₂₎G[RKH] y (CXCGXXGCXE) y por otro lado se generarían las proteínas ROK con actividad represora mediante la obtención de un extremo amino terminal con capacidad de unión a DNA (Conejo *et al.*, 2010). Tomando en cuenta nuestro análisis filogenético, hay un ancestro común para las Pp-Glks, las ATP-Glks de bacterias Gram-positivas y las proteínas de la familia ROK. Sin embargo, en nuestro análisis no es posible apreciar cuál podría ser la Glk más semejante al ancestro común, ya que las distancias de los clados de las ATP-Glks de Gram-positivas y la de las Pp-Glks con respecto a dicho ancestro común son semejantes.

Aun cuando se detectó actividad de Pp-Glk en otros estreptomicetos como *S. coelicolor*, *S. lividans* y *S. thermocarboxydus* K155, éstos exhibieron menores actividades de Pp-Glk con respecto a sus actividades de ATP-Glk. De manera similar, la cepa silvestre de *S. peucetius* mostró baja actividad de Pp-Glk comparada con la sobreproductora de antraciclinas *S. peucetius* var. *caesius*.

Resulta interesante que *S. peucetius* presentó un 48% de mayor productividad de biomasa que *S. peucetius* var. *caesius* con valores de 0.27 y 0.13 mg mL⁻¹·h⁻¹ respectivamente. En este mismo sentido, se observó un 77% de mayor rendimiento de antibiótico con respecto al crecimiento en *S. peucetius* var. *caesius* que en la cepa silvestre (38.7 y 8.8 µg antraciclinas mg peso seco⁻¹, respectivamente). En resumen, la cepa *S. peucetius* presenta una mayor actividad de ATP-Glk

comparada con la Pp-Glk, muestra mayor productividad y rendimiento de biomasa, pero bajo rendimiento de antraciclinas totales. En cambio la cepa *S. peucetius* var. *caesius* presentó mayor actividad Pp-Glk que de ATP-Glk, menor productividad y rendimiento de biomasa, pero mayor rendimiento en la producción de antraciclinas. Cabe señalar que no hay diferencias en la concentración intracelular de Pp entre ambas cepas (Manzo-Ruiz, Tesis de licenciatura en proceso). Aun cuando ambas cepas consumieron toda la glucosa añadida al medio de cultivo, parece que *S. peucetius* utiliza la fuente de carbono preferencialmente para el crecimiento, mientras que *S. peucetius* var. *caesius* utiliza una mayor porción de esa glucosa para la producción de antraciclinas. Malla *et al.*, (2010) hicieron una revisión de los factores que limitan la producción de daunorrubicina (DNR) y doxorubicina (DXR). Hay que señalar que para la producción de estos antibióticos se requiere de tres etapas (Fig. 11): la formación de la ϵ -rodomicenona (aglicona) a partir de propionil-CoA y malonil-CoA, la formación de timidina fosfato (TDP)- L-daunosamina a partir de la glucosa-1-fosfato y finalmente la glicosilación de la aglicona (Malla *et al.*, 2010). Se ha observado que la baja disponibilidad de la poza de TDP-L-daunosamina limita la producción de DNR y DXR, ya que si se inactiva la ruta de síntesis de ramnosa que compite por la misma poza, se observa un aumento en la producción de ambos antibióticos (Singh *et al.*, 2010). De acuerdo con todo lo anterior, se podría especular que la cepa *S. peucetius* var. *caesius* es capaz de sobreproducir el antibiótico debido a que hay una mayor concentración de glucosa fosforilada por las dos Glks que contiene y que suman una actividad de aproximadamente $618 \text{ U mg proteína}^{-1}$ a las 48 h. Por el contrario la cepa silvestre *S. peucetius* tiene una actividad de Glk sumada de $389 \text{ U mg proteína}^{-1}$ a las mismas 48 h de cultivo.

Considerando el importante papel que se le ha asignado a la ATP-Glk en la RCC (Angell *et al.*, 1994, Kwakman and Postma, 1994), se examinó la presencia de Pp-Glk en una mutante Dog^R resistente a RCC obtenida a partir de la cepa *S. peucetius* var. *caesius*. Inesperadamente, la mutante Dog^R presentó disminuidas en un 80% las dos actividades de ATP- y Pp-Glk, aunque mantienen la tasa Pp-Glk/ATP-Glk de 1.95, similar al de 1.87 de la bacteria parental. La reducción en la actividad de ambas Glks podría deberse a que la mutante Dog^R tiene afectado el transporte de glucosa, lo que afectó la concentración citoplásmica del inductor. Actualmente se investiga sobre la mutación que presenta la cepa Dog^R .

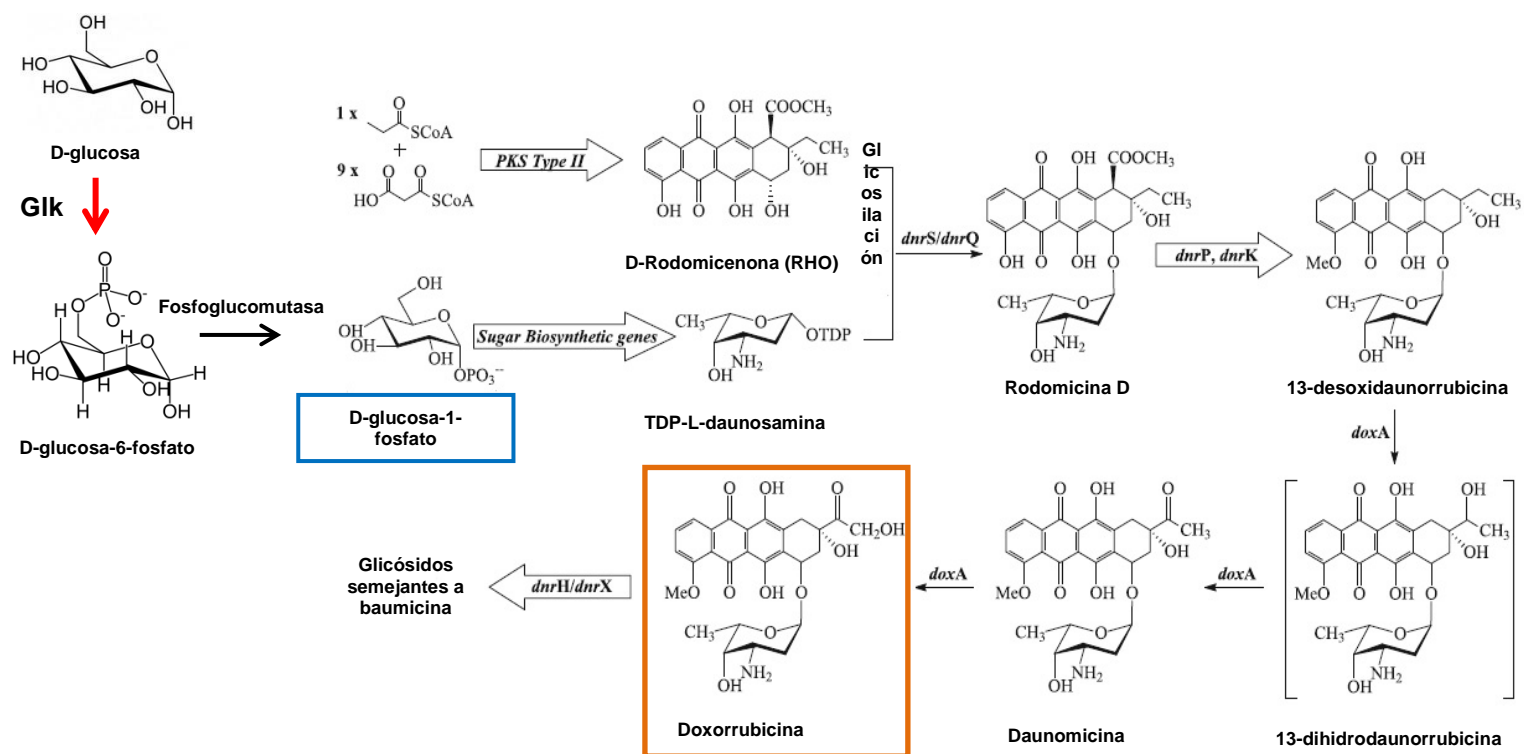


Figura 11. Resumen de la vía de biosíntesis de las antraciclinas en *S. peuceitius* y *S. peuceitius* var. *caesius*. La flecha roja muestra el paso que catalizan las enzimas ATP- y Pp-Glk. El paso de fosforilación de la glucosa permite la alimentación de la vía de síntesis del azúcar TDP-L-daunosamina, necesaria para la glicosilación de la molécula de aglicona (D-rodomicenona), primer precursor de la doxorubicina (recuadro naranja). Uno de los pasos limitantes de la biosíntesis de doxorubicina es la disponibilidad de la poza de D-glucosa-1-fosfato (recuadro azul) que comparte con la síntesis de ramnosa. Modificado de Malla *et al.*, 2010.

CONCLUSIONES

- La cepa sobreproductora de antraciclinas, *S. peucetius* var. *caesius*, presenta una actividad de Pp-Glk significativamente mayor que las demás cepas silvestres probadas (*S. coelicolor*, *S. lividans*, *S. thermocarboxidus* K155 y *S. peucetius*).
- La alta producción de antraciclinas totales de *S. peucetius* var. *caesius*, podría estar relacionada con mayores niveles de fosforilación de la glucosa (alimentación de la poza de daunosamina) comparados con los que presenta la cepa silvestre *S. peucetius*.
- La secuencia de la Pp-Glk de *S. peucetius* var. *caesius* tiene una identidad en aminoácidos de 83-87% con *S. coelicolor*, *S. lividans* y *S. thermocarboxidus* K-155. Presenta un pH óptimo de 8.5 y temperatura óptima de 48-52°C. No utiliza ATP y muestra preferencia por cadenas de Pp de alrededor de 18 unidades.
- Aunque las Pp-Glks han sido clasificadas dentro del grupo de Glks-ROK, en este estudio se observó que ninguna de ellas presenta el motivo firma de las proteínas de la familia ROK (motivo rico en cisteínas).
- De acuerdo con el análisis filogenético realizado, no es posible discernir cuál podría ser la Glk más semejante al ancestro común, ya que las distancias de los clados de las ATP-Glks de Gram-positivas y la de las Pp-Glks con respecto a dicho ancestro común son semejantes.

BIBLIOGRAFÍA

- Angell S, Lewis CG, Buttner MJ, Bibb, MJ (1994) Glucose repression in *Streptomyces coelicolor* A3(2) a likely regulatory role for glucose kinase. *Mol Gen Genet* 244:135-43
- Aleshin AE, Zeng C, Bourenkov GP, Bartunik HD, Fromm HJ, Honzatko RB (1998) The mechanism of regulation of hexokinase: new insights from the crystal structure of recombinant human brain hexokinase complexed with glucose and glucose-6-phosphate. *Structure*, 6: 39-50
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-3402.
- Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G, Grein A, Orezzi P, Pol C, Spalla C (1969) Adriamycin, 1,4-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol Bioeng* XI:1101-1110
- Avalos-García M (2010) Polyphasic characterization of a *Streptomyces* strain isolated from soil from Valle de Chalco. Dissertation, Universidad Nacional Autonoma de Mexico
- Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarman D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O (2008) The RAST server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 9:75.
- Bae J, Kim D, Choi Y, Koh S, Park JE, Kim JS, Moon SH, Park B-H, Park M, Song H-E, Hong S-I, Lee D-S (2005) A hexokinase with broad sugar specificity from a thermophilic bacterium. *Biochem Biophys Res Comm* 334:754-763
- Concha MI, Leon G (2000) Cloning, functional expression and partial characterization of the glucose kinase from *Renibacterium salmoninarum*. *FEMS Microbiol Lett* 186:97-101
- Conejo MS, Thompson SM, Miller BG (2010) Evolutionary bases of carbohydrate recognition and substrate discrimination in the ROK protein family. *J Mol Evol* 70: 545-556
- Curdová E, Kremen A, Vanek Z, Hostalek Z (1976) Regulation and biosynthesis of secondary metabolites. XVIII. Adenylate level and chlortetracycline production in *Streptomyces aureofaciens*. *Folia Microbiol* 21: 481-7
- Dekleva ML, Titus JA, Strohl WR (1985) Nutrient effects on anthracycline production by *Streptomyces peucetius* in a defined medium. *Can J Microbiol* 31:287-294

- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32:1792-1797
- Escalante L, Ramos I, Imriskova I, Langley E, Sanchez S (1999) Glucose repression of anthracyclines formation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Appl Microbiol Biotechnol* 52:572-578
- Fields MW, Russell JB (2001) The glucomannokinase of *Prevotella bryantii* B₁₄ and its potential role in regulating β -glucanase expression. *Microbiol* 147: 1035-43
- Forero A, Sanchez M, Chávez A, Ruiz B, Rodríguez-Sanoja R, Servín-González L, Sanchez S (2011) Possible involvement of the *sco2127* gene product in glucose repression of actinorhodin production in *Streptomyces coelicolor*. *Can J Microbiol* 58:1195-1201
- González F, Fernández-Vivas A, Arias JM, Montoya E (1990) Polyphosphate glucokinase and ATP glucokinase activities in *Mycococcus coralloides* D. *Arch Microbiol* 154: 438-442
- Gubbens J, Janus M, Florea BI, Overkleeft HS, van Wezel GP (2012) Identification of glucose kinase-dependent and -independent pathways for carbon control of primary metabolism development and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* by quantitative proteomics. *Mol Microbiol* 86:1490-1507
- Henzel WJ, Stults JT (1996) Unit 16.2. Matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass analysis of peptides. In: Coligan JE, Dunn BM, Ploegh HL, Speicher DW, Wingfield PT (eds) *Current protocols in protein science*. Wiley, New York, pp 16.1.1-16.2.11
- Hodgson, D. A. (1982) Glucose repression of carbon source uptake and metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its perturbation in mutants resistant to 2-deoxyglucose. *J. Gen Microbiol.* 128: 2417-2430.
- Hostalek Z, Tobek I, Bobyk MA, Kulayev IS (1976) Role of ATP-glucokinase and polyphosphate glucokinase in *Streptomyces aureofaciens*. *Folia Microbiol* 21:131-138
- Hsieh PC, Shenoy BC, Haase FC, Jentoft JE, Phillips NFB (1993) Involvement of tryptophan(s) at the active site of polyphosphate/ATP glucokinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biomech*, 32: 6243-9
- Imriskova I, Langley E, Arreguín-Espinosa R, Aguilar G, Pardo JP, Sanchez S (2001) Rapid purification and biochemical characterization of glucose kinase from *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Arch Biochem Biophys* 394:137-144
- Imriskova I, Arreguín-Espinosa R, Guzmán S, Rodríguez-Sanoja R, Langley E, Sánchez S (2005) Biochemical characterization of the glucose kinase from *Streptomyces coelicolor* compared to *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Res Microbiol* 156:361-366
- Kamata K, Mitsuya M, Nishimura T, Eiki J, Nagat Y (2004) Structural basis for allosteric regulation of the monomeric allosteric enzyme human glucokinase. *Structure* 12: 429-438

- Kawai S, Mukai T, Mori S, Mikami B, Murata K (2005) Hypothesis: structures, evolution, and ancestor of glucose kinases in the hexokinase family. *J Biosci Bioeng* 99:320-330
- Kawakoshi A, Nakazawa H, Fukada J, Sasagawa M, Katano Y, Nakamura S, Hosoyama A, Sasaki H, Ichikawa N, Hanada S, Kamagata Y, Nakamura K, Yamazaki S, Fujita N (2012) Deciphering the genome of polyphosphate accumulating actinobacterium *Microlunatus phosphovorius*. *DNA Res* 19: 383-94
- Kazanov MD, Li X, Gelfand MS, Osterman AL, Rodionov DA (2013) Functional diversification of ROK-family transcriptional regulators of sugar catabolism in the *Thermotogae* phylum. *Nucleic Acids Res* 41(2): 790-803
- Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA (2000) Practical *Streptomyces* genetics. John Innes Foundation, United Kingdom
- Koide M, Miyanag A, Kudo F, Eguchi T (2013) Characterization of polyphosphate glucokinase SCO5059 from *Streptomyces coelicolor*. *Biosci Biotechnol Biochem* 77:2322-2324
- Kowalczyk TH, Horn, PJ, Pan W-H, Phillips NFB (1996) Initial rate and equilibrium isotope exchange studies on the ATP-dependent activity of polyphosphate glucokinase from *Propionibacterium shermanii*. *Biochem* 35: 6777-85
- Kraus A, Hueck C, Gärtner D, Hillen W (1994) Catabolite repression of the *Bacillus subtilis xyl* operon involves a *cis* element functional in the context of an unrelated sequence, and glucose exerts additional *xylR*-dependent repression. *J Bacteriol* 176(6): 1738-45
- Kwakman JHJ M, Postma, P W (1994) Glucose kinase has a regulatory role in carbon catabolite repression in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* 176:2694-2698
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Larion M, Moore LB, Thompson SM, Miller BG (2007) Divergent evolution of function in the ROK sugar kinase superfamily: role of enzyme loops in substrate specificity. *Biochem* 46: 13564-13572
- Liao H, Myung S, Zhang Y-H P (2012) One-step purification and immobilization of thermophilic polyphosphate glucokinase from *Thermobifida fusca* YX: glucose-6-phosphate generation without ATP. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:1109-1117
- Lindner SN, Knebel S, Pallerla SR, Schoberth SM, Wendisch VF (2010) Cg2091 encodes a polyphosphate/ATP-dependent glucokinase of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 87:703-713
- Lengfeld C, Schönert S, Dippel R, Boos W (2009) Glucose- and glucokinase-controlled mal gen expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 191(3): 701-12

- Lu G-T, Yang Z-J, Peng F-Y, Tan Y-N, Tang Y-Q, Feng J-X, Tang D-J, He Y-Q, Tang J-L (2007) The role of glucose kinase in carbohydrate utilization and extracellular polysaccharide production in *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *Microbiol* 153: 4284-4294
- Lunin VV, Li Y, Schrag JD, Iannuzzi, Cygler M, Matte A (2004) Crystal structures of *Escherichia coli* ATP-dependent glucokinase and its complex with glucose. *J Bacteriol* 186: 20 (6915-6927)
- Mahr K, van Wezel GP, Canters GW, Bibb MJ, Titgemeyer F (2000) Glucose kinase of *Streptomyces coelicolor* A3(2): large-scale purification and biochemical analysis. *Int J Gen Mol Microbiol* 78(3-4): 253-261
- Malla S, Niraula NP, Singh B, Liou K, Sohng JK (2010) Limitations in doxorubicin production from *Streptomyces peucetius*. *Microbiol Res* 165: 427-435
- Marrero J, Trujillo C, Rhee KY, Ehrt S (2013) Glucose phosphorylation is required from *Mycobacterium tuberculosis* persistence in mice. *Plos Pathog* 9(1): e1003116
- Miyazono K-I, Tabei N, Morita S, Ohnishi Y, Horinouchi S, Takonura M (2012) Substrate recognition mechanism and substrate-dependent conformational changes of an ROK family glucokinase from *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol* 194:607-616
- Mukai T, Kawai S, Matsukawa H, Matuo Y, Murata K (2003) Characterization and molecular cloning of a novel enzyme, inorganic polyphosphate/ATP-glucomannokinase, of *Arthrobacter* sp. strain KM. *Appl Env Microbiol* 69:3849-3857
- Mukai T, Kawai S, Mori S, Mikami B, Murata K (2004) Crystal structure of bacterial inorganic polyphosphate/ATP-glucomannokinase. *J Biol Chem* 279(48): 50591-50600.
- Pennetier C, Domínguez-Ramírez L, Plumbridge J (2008) Different regions of Mlc and NagC, homologous transcriptional repressors controlling expression of the glucose and N-acetylglucosamine phosphotransferase system in *Escherichia coli*, are required for inducer signal recognition. *Mol Microbiol* 67(2): 364-377
- Pepin C, Wood HG (1987) The mechanism of utilization of polyphosphate by polyphosphate glucokinase from *Propionibacterium shermanii*. *J Biol Chem*, 262(11): 5223-6
- Phillips NF, Hsieh PC, Kowalczyk TH (1999) Polyphosphate glucokinase. *Prog Mol Subcell Biol* 23: 101-25
- Plumbridge J, Kolb A (1995) Nag repressor-operator interactions: protein-DNA contacts cover more than two turns of the DNA helix. *J Mol Biol* 249: 890-902
- Plumbridge J, Pellegrini O (2004) Expression of the chitobiose operon of *Escherichia coli* is regulated by three transcription factors: NagC, ChbR and CAP. *Mol Microbiol* 52(2): 437-449

- Ramos I, Guzmán S, Escalante L, Imriskova I, Rodríguez-Sanoja R, Sánchez S, Langley E (2004) Glucose kinase alone cannot be responsible for carbon source regulation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. Res Microbiol 155:267-274
- Schiefner A, Gerber K, Seitz S, Elte W, Diederichs K, Boos W (2005) The crystal structure of Mlc, a global regulator of sugar metabolism in *Escherichia coli*. J Biol Chem 280(32): 29073-29079
- 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
- Singh B, Lee Ch-B, Sohng JK (2010) Precursor for biosynthesis of sugar moiety of doxorubicin depends on rhamnose biosynthetic pathway in *Streptomyces peucetius* ATCC27952. Appl Microbiol Biotechnol 85: 1565-1574
- Sohanpal BK, El-Labany S, Lahooti M, Plumbridge JA, Blomfield IC (2004) Integrated regulatory responses of *fimB* to N-acetylneuraminic (sialic) acid and GlcNAc in *Escherichia coli* K-12. PNAS 101(46): 16322-16327
- Szymona S, Ostrowski W (1964) Inorganic polyphosphate glucokinase of *Mycobacterium phlei*. BBA-Enzymological Subject 85:283-295
- Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR (2013) Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. J Pharm Pharmacol 65:157-170
- Tanaka Y, Kimata K, Inada T, Tagami H, Aiba H (1999) Negative regulation of the *pts* operon by Mlc: mechanism underlying glucose induction in *Escherichia coli*. Genes Cells, 4: 391-9
- Tanaka S, Lee S-O, Hamaoka K, Kato J, Takiguchi N, Nakamura K, Ohtake H, Kuroda A (2003) Strictly polyphosphate-dependent glucokinase in a polyphosphate-accumulating bacterium, *Microlunatus phosphovorous*. J Bacteriol 185:5654-5656
- Temple L, Sage A, Christie GE, Phibbs PV (1994) Two genes for carbohydrate catabolism are divergently transcribed from a region of DNA containing the hexC locus in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. J Bacteriol 176(15): 4700-4009
- Titgemeyer F, Reizer J, Reizer A, Saier MH (1994) Evolutionary relationships between sugar kinases and transcriptional repressors in bacteria. Microbiol 140: 2349-54
- van Wezel GP, König M, Mahr K, Nothaft H, Thomae AW, Bibb M, Titgemeyer F (2007) A new piece of an old jigsaw: glucose kinase is activated posttranslationally in a glucose transport-dependent manner in *Streptomyces coelicolor* A3(2). J Mol Microbiol Biotechnol 12:67-74
- Wagner E, Marcandier S, Egeter O, Deutscher J, Götz F, Brückner R (1995) Glucose kinase-dependent catabolite repression in *Staphylococcus xylosus*. J Bacteriol 77(21): 6144-52.

- Yang F, Teves SS, Kemp CJ, Henikoff S (2014) Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics.
Biochim Biophys Acta 1845:84-89
- Zeman SM, Phillips DR, Crothers DM (1998) Characterization of covalent Adriamycin-DNA adducts.
PNAS 95: 11561-11565

APÉNDICE 1

Medio de cultivo

a. Medio NDYE

Medio mínimo para el cultivo de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* y *S. thermocarboxydus* K155.

Componente	g/L
NaNO ₃	0.85
K ₂ HPO ₄	0.17
MgSO ₄	10 mL de un Stock de 50 mM
Glucosa	100 mL de un Stock de 1 M
Extracto de levadura	100 mL de un Stock de 2 g/L
Elementos traza	2 mL

Solución de elementos traza

Componente	mg/100 mL
ZnCl ₂	40
FeCl ₃	200
CuCl ₂	2
MnCl ₂	2
Na ₂ B ₄ O ₇	2
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	10
NiCl	5

b. Medio NMMP (Kieser *et al.*, 2000)

Medio mínimo para *Streptomyces coelicolor* y *S. lividans*.

Componente	g/800 mL
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
Difco Casaminoácidos	5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.6
PEG 6000	50
Solución de elementos menores	1 mL

Solución de elementos traza

Componente	g/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1
CaCl ₂	1

Dispensar en alícuotas de 80 mL y esterilizar en autoclave. En el momento de usar añadir:

Componente	mL
NaH ₂ PO ₄ / K ₂ HPO ₄ (0.1 M, pH 6.8)	15
Fuente de carbono	10
H ₂ O	5

APÉNDICE 2

ARTÍCULO

Ruiz-Villafán B, Rodríguez-Sanoja R, Aguilar-Osorio G, Gosset G (2014) Glucose kinases from *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. Appl Microbiol Biotechnol, DOI 10.1007/s00253-014-5662-2

Glucose kinases from *Streptomyces peucetius* var. *caesius*

Beatriz Ruiz-Villafán · Romina Rodríguez-Sanoja ·
Guillermo Aguilar-Osorio · Guillermo Gosset ·
Sergio Sanchez

Received: 10 February 2014 / Revised: 3 March 2014 / Accepted: 4 March 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Glucose kinases (Glks) are enzymes of the glycolytic pathway involved in glucose phosphorylation. These enzymes can use various phosphoryl donors such as ATP, ADP, and polyphosphate. In several streptomycetes, ATP-glucose kinase (ATP-Glk) has been widely studied and regarded as the main glucose phosphorylating enzyme and is likely a regulatory protein in carbon catabolite repression. In cell extracts from the doxorubicin overproducing strain *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, grown in glucose, a polyphosphate-dependent Glk (Pp-Glk) was detected by zymogram. Maximum activity was observed during the stationary growth phase (48 h) of cells grown in 100 mM glucose. No activity was detected when 20 mM glutamate was used as the only carbon source, supporting a role for glucose in inducing this enzyme. Contrary to wild-type strains of *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces lividans*, and *Streptomyces thermocarboxydus* K-155, *S. peucetius* var. *caesius* produced 1.8 times more Pp-Glk than ATP-Glk. In addition, this

microorganism produced five and four times more Pp-Glk and anthracyclines, respectively, than its wild-type *S. peucetius* parent strain, supporting a role for this enzyme in antibiotic production in the overproducer strain. A cloned 726-bp DNA fragment from *S. peucetius* var. *caesius* encoded a putative Pp-Glk, with amino acid identities between 83 and 87 % to orthologous sequences from the above-cited streptomycetes. The cloned fragment showed the polyphosphate-binding sequences GXDIGGXXIK, TXGTGIGSA, and KEX₍₄₎SWXXWA. Sequences for the Zn-binding motif were not detected in this fragment, suggesting that Pp-Glk is not related to the Glk ROK family of proteins.

Keywords Glucose kinase · *Streptomyces peucetius* var. *caesius* · Anthracyclines · Polyphosphate

Introduction

Glucose kinases (Glks) are a set of enzymes which catalyze glucose phosphorylation utilizing ATP, ADP, or polyphosphate (Pp) as phosphoryl donors (Kawai et al. 2005). Most Glks can be classified into two families: the ribokinase family, which includes enzymes that use ADP as phosphoryl donor, and the hexokinase (HK) family. The HK family comprises three groups: HK, A, and B. Group HK is constituted by eukaryotic enzymes which show a conserved primary sequence and a molecular weight between 50 and 100 kDa. Group A mainly contains ATP-Glks from Gram-negative bacteria and amitochondriate eukaryotes. Group B includes Glks that use ATP and/or polyphosphate as phosphoryl donors. Members of this group also show homology to protein members of the Repressor Orf Kinase (ROK) family, which are mostly transcriptional regulators and kinases. All studied Glks from the *Streptomyces* genus belong to group B and most of them are ATP-dependent. In addition to glucose

B. Ruiz-Villafán · R. Rodríguez-Sanoja · S. Sanchez (✉)
Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México, D.F. 04510, Mexico
e-mail: sersan@unam.mx

B. Ruiz-Villafán
e-mail: brvillafan@unam.mx

R. Rodríguez-Sanoja
e-mail: romina@biomedicas.unam.mx

G. Aguilar-Osorio
Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM, México, D.F. 04510, Mexico
e-mail: gao@unam.mx

G. Gosset
Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca Morelos 62210, Mexico
e-mail: gosset@ibt.unam.mx

phosphorylation, the *Streptomyces coelicolor* ATP-Glk (encoded by *sco2126*) has been shown to be involved in mechanisms for carbon catabolite repression (CCR) (Angell et al. 1994; Kwakman and Postma 1994). The genome of this strain contains five additional putative Glks (SCO0063, SCO1077, SCO5059, SCO6110, and SCO6260). However, only ATP-Glk activity has been experimentally detected (Angell et al. 1994). A *S. coelicolor* mutant lacking ATP-Glk is unable to grow on minimal medium supplemented with glucose. However, after a few days incubation under this condition, some derivatives arose on the glucose plates and exhibited glucose phosphorylating activity (Angell et al. 1994). Surprisingly, this activity was not due to a true Glk, but to a protein (SCO6260) that is part of an operon encoding for a ribose ABC-type permease (Angell et al. 1994; van Wezel et al. 2004).

Streptomyces peucetius var. *caesius* is an industrially relevant strain, which produces doxorubicin, a secondary metabolite used for treatment of malignant tumors (Tacar et al. 2013). As reported for other secondary metabolites, doxorubicin production is also negatively affected by the presence of glucose (Escalante et al. 1999). *S. peucetius* var. *caesius* phosphorylates glucose through an ATP-Glk activity. This activity is affected in mutants isolated as resistant to the growth inhibition exerted by the glucose analogue, 2-deoxyglucose (DOG) in the presence of glycerol (Segura et al. 1996). These mutants (Dog^R) show decreased glucose transport and ATP-Glk activity (15%), but overproduce doxorubicin (Escalante et al. 1999).

By applying an antibiotic enrichment procedure to the Dog^R strain, mutants that had recovered the ability to phosphorylate glucose were isolated. Although these mutants regained their sensitivity to glucose repression, the ATP-Glk activity varied from 19 to 84% in the mutants compared to 15% in the parental strain, suggesting no correlation between ATP-Glk activity and glucose repression (Ramos et al. 2004).

Pp-Glk has been reported in many members of *Actinobacteria* (Takahashi et al. 1995; Lindner et al. 2010). This enzyme is considered to be an ancient enzyme, since utilizes Pp as phosphoryl donor instead of ATP (Rao et al. 2009). The first study on a bacterial Pp-Glk was reported for *Mycobacterium phlei* (Szymona and Ostrowski 1964). In streptomycetes, this activity has been studied in the chlortetracycline producer *Streptomyces aureofaciens* (Hostalek et al. 1976). In *S. coelicolor*, the presence of Pp-Glk was determined using quantitative proteomics (Gubbens et al. 2012) and recently it was overexpressed, purified, and biochemically characterized (Koide et al. 2013). In our group, this activity was recently detected in *S. peucetius* var. *caesius*. Therefore, the aim of this study was to understand the importance of Pp-Glk regarding ATP-Glk and secondary metabolite concentrations in this strain, by measuring the production of these three parameters and analyzing the relationship between Pp-Glk and other orthologs.

Materials and methods

Bacterial strains and culture conditions

S. peucetius NRRL B-3826 and *S. peucetius* var. *caesius* NRRL B-5337 were kindly provided by the Agriculture Research Service Culture Collection, US Department of Agriculture (Peoria, IL). *S. peucetius* var. *caesius* Dog^R strain was derived from *S. peucetius* var. *caesius* NRRL B-5337 as resistant to 2-deoxyglucose (Segura et al. 1996). *Streptomyces thermocarboxydus* K155 was previously isolated and identified in our laboratory (Avalos-García 2010). This strain (BM-B-383) is maintained in a viable condition at the UNAM-48/WFCC (Mexico D.F.). Mycelia from these microorganisms were obtained as previously reported (Segura et al. 1996). The bacteria were maintained by serial transfer and stored at 4 °C on plates with yeast malt (YM) medium (0.4% yeast extract, 1% malt extract, and 0.4% glucose) plus 1.5% agar. NDYE minimal medium (10 mM NaNO₃, 1 mM K₂HPO₄·3H₂O, 0.5 mM MgSO₄·7H₂O, and 0.2% w/v yeast extract) without vitamin solution (Dekleva et al. 1985) was used for growth and Glk production studies of *S. peucetius* var. *caesius* on several carbon sources. For glucose kinase activity, a seed culture from a 250-ml baffled flask with 50 ml of YM medium was inoculated with 1 ml of mycelia from *S. peucetius* var. *caesius* (approx. 0.2 mg dry cell weight/ml) and incubated at 29 °C on a rotary shaker at 180 rpm for 24 h. The culture was harvested by centrifugation, and the pellet was resuspended in 5 ml of isotonic saline solution (0.85% w/v NaCl). One milliliter of these mycelia was used to inoculate 250-ml baffled flasks with 50 ml NDYE medium and cultured under the same conditions.

S. coelicolor A3(2) M145 (SCP-1, SCP-2, prototroph) and *Streptomyces lividans* were obtained from the John Innes Centre (Norwich, UK). For growth and Glk production, 250-ml baffled Erlenmeyer flasks containing 50 ml NMMP medium (Kieser et al. 2000) were inoculated with approximately 10⁶ spores and cultured for desired times at 29 °C on a rotary shaker at 180 rpm.

Remaining glucose in the culture medium was determined by the glucose oxidase/peroxidase method (GOD-POD from Spinreact). Growth was estimated by dry cell weight, as previously reported (Forero et al. 2012).

Preparation of cell-free extracts

Cells were separated from culture medium by centrifugation at 6,000 rpm and the pellet resuspended in PED (75 mM potassium phosphate, 1 mM EDTA, and 2 mM DTT) buffer. Crude extracts were prepared by sonication at 50 W (4×1 min pulses with 30 s allowed for cooling). The suspension was centrifuged at 13,000 rpm for 30 min at 4 °C and the supernatant was recovered for Glk determination and protein estimation.

Protein was determined by the Bradford method (Bio-Rad reagent) using bovine serum albumin as standard.

Determination of anthracycline production

Samples (5 ml) of the culture medium were taken at different incubation times and centrifuged at 8,000 rpm for 10 min. Anthracyclines were extracted from the pellet, using a mixture of acetone and 0.05 M sulfuric acid (4:1) according to Arcamone et al. (1969). Total anthracyclines were measured at 495 nm and quantified using an extinction coefficient of $11,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Zeman et al. 1998).

Determination of ATP-Glk and Pp-Glk activity

ATP-Glk activity was measured spectrophotometrically by monitoring reduction of NADP ($\epsilon=6.22 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) in a glucose-6-phosphate dehydrogenase coupled reaction. The assay mixture contained 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2.8 mM D-glucose, 25 mM MgCl_2 , 0.5 mM NADP, 1 mM ATP, and 0.7 U ml^{-1} yeast, glucose-6-phosphate dehydrogenase (Roche). When Pp-Glk activity was measured, ATP was replaced with 2 mg ml^{-1} sodium polyphosphate (crystals, +80 mesh, 96 %, from Aldrich) in the reaction mixture. Units of enzyme activity were expressed as nanomole NADP reduced per minute per milligram cell protein at 25 °C.

Zymograms were performed on 8 % native electrophoresis gels as reported by Imriskova et al. (2001).

Identification of Pp-Glk

SDS-PAGE from time course samples was carried out according to Laemmli (1970). Protein bands with Glk activity were detected by zymogram activity and positive bands were carefully excised from SDS-PAGE gels and the proteins were identified by MALDI-TOF mass spectrometry (Henzel and Stults 1996). Protein sequence comparisons were carried out by employing the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) program (Altschul et al. 1997), and the “blastp” (protein-protein BLAST) algorithm.

Molecular cloning of Pp-Glk

The gene encoding for Pp-Glk (accession number GI:523328803 ->GenBank KF184976) was amplified by PCR from total DNA of *S. peucetius* var. *caesius*. Oligonucleotides were designed based on previous alignments of putative *Streptomyces* Pp-Glk genes, extracted from the StrepDB page (Strepdb.streptomyces.org.uk). The forward primer oligonucleotide was designed from the consensus sequence beginning with the start codon. Similarly, the reverse primer oligonucleotide was designed by taking the consensus of the carboxyl end sequence near the stop codon. The

sequences of the oligonucleotides used were as follows: forward (5'-CCATGCAGATCTTCGGTGTGGACATCGGTGA TCC) and reverse (5'-CATCGCCGCTCCCACGATCCCGCGTTGTTCTG). PCR conditions for amplification were an initial denaturation step at 95 °C (3 min), then 95 °C (1 min), 55 °C (1 min), 72 °C (1 min) for 25 cycles, and a final extension period at 72 °C (7 min). PCR products were purified and cloned using the pGEM T-easy kit from Promega. The resulting plasmids were isolated and sequenced by Laragen, Inc. (Culver City, CA).

Sequence retrieval and phylogenetic analyses

Protein sequences were downloaded from the National Center for Biotechnology Information database (NCBI) and aligned with the Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation (MUSCLE) program (Edgar 2004). Phylogenetic tree construction and distance analysis, including 1,000 bootstrap replicates, were performed with the MEGA5.2 package using the statistical method of Neighbor joining and the JTT model.

Results

Effect of carbon source on growth and Glk production in *S. peucetius* var. *caesius*

In order to establish the effect of the carbon source on the profile of Glk production, growth and ATP-Glk activity were determined in NDYE medium (Dekleva et al. 1985) in the presence of 100 mM glucose (a true Glk substrate), 100 mM mannose (a hexokinase substrate), and 20 mM glutamate (unrelated to Glk). Under these conditions, similar growth was observed when grown in glucose and mannose, with μ values of 0.086 and 0.073 h^{-1} (Table 1), respectively, but in glutamate the bacteria showed a lower μ value (0.053 h^{-1}). ATP-Glk activity was detected when this microorganism was cultured in glucose as the sole carbon source, showing an increase of almost twofold at 10 h incubation. Conversely, incubation in mannose and glutamate did not promote an

Table 1 Effect of carbon source on cell growth and ATP-Glk production in *S. peucetius* var. *caesius*

Condition ^a	μ (h^{-1})	ATP-Glk ^b		Increase (fold)
		0 h	10 h	
Glucose	0.086	33.5±4.6	65.7±1.9	1.95
Mannose	0.073	33.5±4.6	31.3±1.8	0.93
Glutamate	0.053	33.5±4.6	27.7±1.5	0.83

^a Carbon sources were used at 100 mM concentration, except for glutamate which was 20 mM. Cells were grown in NDYE medium

^b ATP-Glk was expressed as units per milligram protein

increase in ATP-Glk activity. These results strongly suggest that in *S. peucetius* var. *caesius*, ATP-Glk is induced by glucose.

In order to search for other Glk activities, a Glk zymogram was performed in native polyacrylamide gels on extracts from cells grown in glucose and glutamate. Both zymograms showed three positive bands for Glk activity with molecular weights of 214, 190, and 124 kDa, respectively (Fig. 1). To determine whether these protein bands belonged to a genuine Glk, they were sliced out from the gel and sequenced. Afterwards, using the “blastp” algorithm, two Glks were identified in the samples obtained from the glucose cultures. One of them showed similarity to the ATP-Glk previously reported by Imriskova et al. (2001, 2005), while the other enzyme was similar to a Pp-Glk from *Streptomyces avermitilis* (<http://strepdb.streptomyces.org.uk>). Surprisingly, both Glks were found in the same 124-kDa protein band. The bands of 190 and 214 kDa corresponded to a variety of dehydrogenases (aldehyde, dihydrolipoamide, and delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenases). No Glk protein bands were detected in

samples from the glutamate cultures, and the three positive bands observed in the zymograms corresponded to a mixture of dehydrogenases (NAD-glutamate, 3-hydroxyacyl-CoA, inosine-5'-monophosphate, 3-hydroxybutyryl-CoA, dihydrolipoamide, and L-alanine dehydrogenases). Detection of dehydrogenases in the zymogram was probably due to a cross-reaction with the MTT (tetrazolium blue) reagent.

Time course of pp-Glk production

As the protein sequencing suggested the presence of a putative Pp-Glk in *S. peucetius* var. *caesius*, its activity was determined in NDYE medium supplemented with glucose or glutamate and compared to ATP-Glk. As shown in Fig. 2a, Pp-Glk displayed its maximum activity at 48 h of incubation (1,024.8 U/mg protein), during the stationary growth phase (Fig. 2c). Conversely, ATP-Glk activity showed its maximum peak at 12 h (536.6 U/mg protein), during the logarithmic growth phase, and remained at similar levels up to 48 h fermentation (Fig. 2b). In addition, as shown in the same figure, these activities remained low in glutamate, suggesting that both enzymes are induced by glucose. With regard to growth, during the first 48 h of culture, *S. peucetius* reached higher levels of biomass compared to the *S. peucetius* var. *caesius* strain (Fig. 2c). After this time, *S. peucetius* var. *caesius* reached similar levels of biomass compared to the wild-type strain. Furthermore, the *S. peucetius* var. *caesius* strain grown in NDYE medium with glutamate showed the lowest biomass level at all times (Fig. 2c).

Determination of Pp-Glk in other streptomycetes

In order to explore the presence of Pp-Glk activity in *S. coelicolor* (annotated in the genome as SCO5059), and compare its production to ATP-Glk, a time course experiment was carried out in minimal medium (Kieser et al. 2000) with 50 mM glucose. As can be seen in Fig. 3, ATP-Glk reaches its maximum activity at 12 h of incubation. However, at that time, a very low basal Pp-Glk activity was detected (10 % of the ATP-Glk activity). A similar situation was observed in other *Streptomyces* strains (*S. lividans* and *S. thermocarboxydus* K155) which exhibited lower Pp-Glk activities than their corresponding ATP-Glk (Table 2). This behavior clearly contrasted from that observed in *S. peucetius* var. *caesius* which showed high Pp-Glk activity values. Considering that this particular strain is a mutant obtained by chemical mutagenesis from the *S. peucetius* wild-type strain (Arcamone et al. 1969), we decided to search for both Glk activities in this strain. As can be seen in Fig. 2a, b, *S. peucetius* showed more ATP-Glk than Pp-Glk activity. ATP-Glk activity reached its maximum at 48 h incubation and then decreased while Pp-Glk activity remained low until 48 h and then began to rise slightly. Table 2 shows that the ratio of Pp-Glk/ATP-Glk activities in

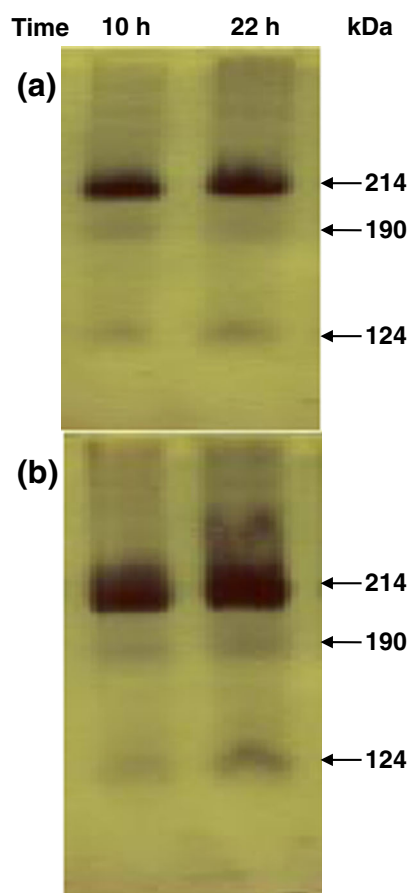
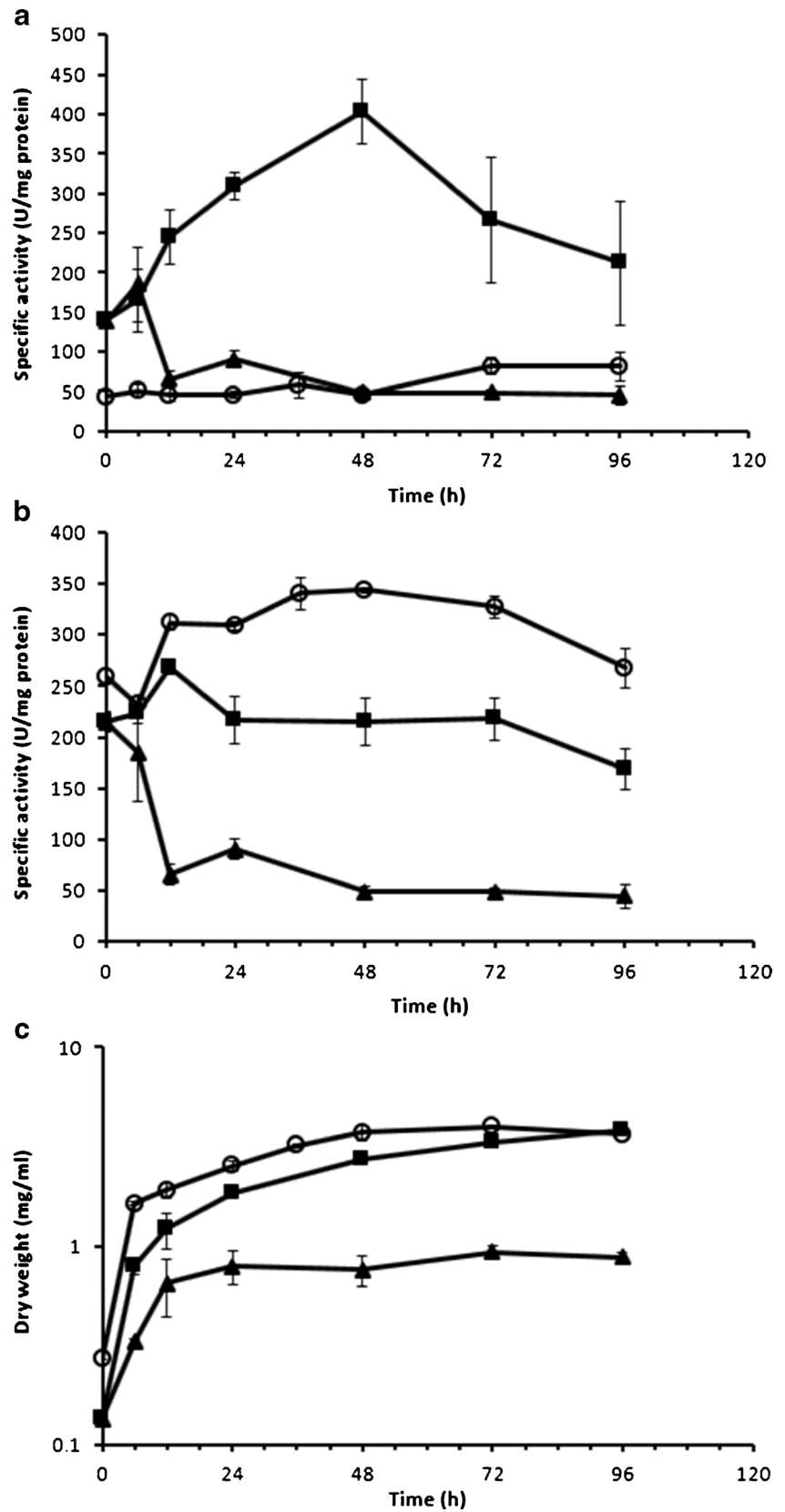


Fig. 1 In situ ATP-Glk activity from *S. peucetius* var. *caesius* (a) from cell extracts cultured for 10 and 22 h in NDYE medium plus 100 mM D-glucose and (b) from cell extracts cultured for 10 and 22 h in NDYE medium plus 20 mM L-glutamate

Fig. 2 Time course of Pp-Glk activity (a), ATP-Glk activity (b), and growth (c) in *S. peucetius* grown in 100 mM glucose (empty circle), *S. peucetius* var. *caesius* grown in 100 mM glucose (filled square), and *S. peucetius* var. *caesius* grown in 20 mM glutamate (filled triangle). All strains were cultivated in NDYE medium



S. coelicolor, *S. lividans*, *S. thermocarboxydus* K155, and *S. peucetius* was lower than 0.3. Conversely, in *S. peucetius*

var. *caesius*, the ratio was 1.87. The wild-type *S. peucetius* showed 37.5 % more ATP-Glk activity than *S. peucetius* var.

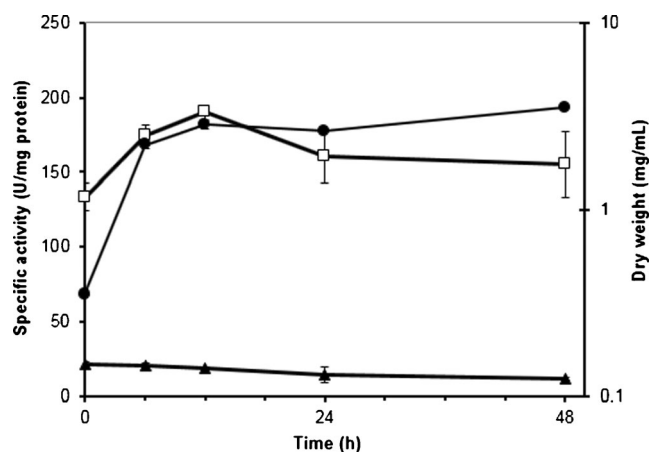


Fig. 3 Time course of ATP- (empty square) and pp-Glk (filled triangle) production by *S. coelicolor* M145 in minimal medium NMMP with 50 mM D-glucose. Growth was estimated by dry cell weight (filled circle)

caesius. However, Pp-Glk activity was almost fivefold higher in the doxorubicin overproducing strain, than the wild-type strain.

S. peucetius var. *caesius* Dog^R mutants, which are insensitive to glucose CCR, show a reduced level of ATP-Glk activity (Segura et al. 1996). To determine whether these mutants were affected in one or both Glks, Pp-Glk activity was also determined. As shown in Table 2, low levels of both Glks were observed in the mutant. However, as observed in its *S. peucetius* var. *caesius* parental strain, Pp-Glk activity was higher than ATP-Glk, maintaining the Pp-Glk/ATP-Glk ratio of 1.95 (Table 2).

Comparison of anthracycline production in three *Streptomyces* strains

Since one of the differences between *S. peucetius*, *S. peucetius* var. *caesius*, and *S. peucetius* var. *caesius* Dog^R strains is their

Table 2 Comparison of ATP- and Pp-Glk activities present in several *Streptomyces* strains

<i>Streptomyces</i> strain	ATP-Glk activity (U/mg protein)	Pp-Glk activity (U/mg protein)	Activity ratio Pp-Glk/ATP-Glk
<i>S. peucetius</i>	344±34.7	44±2.4	0.13
<i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i>	215±22.7	403±40.2	1.87
<i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i> Dog ^R	52±1.5	102±23.6	1.95
<i>S. coelicolor</i>	154±21.9	11±0.7	0.07
<i>S. lividans</i>	19±3.4	5±0.6	0.30
<i>S. thermocarboxydus</i>	34±4.3	9±3.2	0.27

Streptomyces strains including *S. peucetius*, *S. peucetius* var. *caesius*, *S. peucetius* var. *caesius* Dog^R, and *S. thermocarboxydus* were cultured in NDYE medium plus 100 mM glucose. *S. coelicolor* and *S. lividans* were cultured in NMMP medium plus 50 mM glucose. Activity values were taken at 48 h incubation

production of secondary metabolites, we decided to quantify their anthracycline production. In *S. peucetius* var. *caesius*, anthracycline production was 4 and 2.5 times higher than the wild-type *S. peucetius* and its Dog^R mutant derivative (Table 3).

To determine the yield of anthracyclines with regard to the carbon source provided to each strain, the residual glucose concentration was also measured. Glucose intake was very similar in *S. peucetius* and *S. peucetius* var. *caesius*. As expected, the Dog^R mutant utilized only 2.88 mg/ml of glucose, as this strain has diminished uptake and ATP-Glk activity (Segura et al. 1996). The anthracycline yield, with respect to glucose, was higher in the Dog^R mutant followed by its parental strain *S. peucetius* var. *caesius* and the wild-type *S. peucetius*. The biomass yield was very similar between *S. peucetius* and *S. peucetius* var. *caesius* and the highest yield was found for the Dog^R mutant (Table 3).

ppGlc gene cloning and sequencing

The *ppGlc* gene from *S. peucetius* var. *caesius* was cloned by PCR amplification using primers designed through DNA comparison of the orthologous genes reported in the database of the *Streptomyces* genome sequence (<http://strepdb.streptomyces.org.uk>). The DNA sequence obtained from the *ppGlc* gene showed 85 % identity to those of *S. lividans* and *S. coelicolor*, 86 % to *S. thermocarboxydus* K155, and 89 % to *S. avermitilis*. Similarly, the corresponding amino acid sequence obtained showed 85 % identity to that of *S. coelicolor* and *S. lividans*, 86 % to *S. thermocarboxydus* K155, and 88 % to *S. avermitilis*. In all of these strains, the amino acid sequence conserved residues, which are considered relevant for polyphosphate binding: GXDIGGXXIK (Fig. 4), TXGTGIGSA, and KEX₍₄₎SWXXWA (Fig. 5) (Mukai et al. 2003; Liao et al. 2012). In addition, when the amino acid sequences from ATP-Glks, Pp-Glks, and ROK proteins were aligned, the conserved ATP-binding domain (DIGG) was observed in both ATP-Glk and Pp-Glk (Fig. 4), but not in the ROK proteins (XylR, NagR, Mlc). However, in the Pp-Glk amino acid sequences, the ROK consensus sequence ROK1 [LIVM]X₍₂₎G[LIVMFCT]GX [GA][LIVMFMA]X₍₈₎GX₍₃₋₅₎[GATP]X₍₂₎G [RKH] is partially lost (Fig. 5) (Bae et al. 2005). The other ROK-type signature motif (ROK2 in Fig. 5), a Cys-rich sequence [CXCGX₍₂₎GCXE] which forms a zinc-binding domain (Miyazono et al. 2012; Concha and Leon 2000), is completely lost in Pp-Glks. ATP-Glks from Gram-negative bacteria also lack the Cys-rich sequence. Conversely, ATP-Glks from Gram-positive bacteria and other ROK proteins, such as XylR, NagR, and Mlc, possess both ROK consensus sequences (Fig. 5).

Table 3 Comparison of total anthracyclines and biomass yields with regard to glucose consumption in some *Streptomyces* strains^a

Strain	Glucose intake (mg/ml)	Dry cell weight (mg/ml)	Volumetric anthracycline production (µg/ml)	Specific anthracycline production (µg/mg DCW)	$Y_{Ant/glucose}$ (µg Ant/mg glucose)	$Y_{X/glucose}$ (mg DCW/mg glucose)
<i>S. peucetius</i>	22.7	4.2	37.7	8.8	1.65	0.18
<i>S. peucetius</i> var <i>caesius</i>	18.9	4.0	157.4	38.7	8.32	0.21
<i>S. peucetius</i> var <i>caesius</i> Dog ^R	2.8	3.2	58.3	18.2	20.24	1.11

All *Streptomyces* strains were cultured in NDYE medium plus 100 mM glucose

^aData were obtained at 120 h of incubation

Phylogenetic analysis

A phylogenetic analysis of Glks was performed with the sequences from the previous alignment, and including new ones from other Actinobacteria and two ATP-Glk sequences from eukaryotes. The tree showed two main clades (Fig. 6): one comprises the eukaryotic ATP-Glk from human and the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The second clade consists of all ATP- and PP-Glks from prokaryotic microorganisms

(Gram-positive and Gram-negative bacteria) as well as the ROK proteins, Mlc from *Escherichia coli*, the NAG repressor from *E. coli*, and *Salmonella enterica* and the phosphofructokinase from *Zymomonas mobilis*. According to our analysis, the ATP-Glks from Gram-positive bacteria are less related to ATP-Glks from Gram-negative bacteria than to ROK proteins and Pp-Glks, which together form a different group with a common ancestor. In turn, the Pp-Glk group is divided into two clades, one consisting of enzymes from environmental



Fig. 4 Multiple amino acid sequence alignment of Pp-Glk from *S. peucetius* var. *caesius* compared to Pp-Glks, ATP-Glks, and ROK proteins from different bacterial origins. The asterisk indicates the amino acid glycine involved in glucose binding. Bold lines above the sequences show the phosphate 1-binding site and the connect 1 region. The arrow

indicates the Glk catalytic amino acid. *NagR*, *N*-acetylglucosamine utilization regulator; *XylR*, xylose-dependent repressor; *FK*, fructose kinase; *Mlc*, global regulator of sugar metabolism. Sequence alignment was carried out using MUSCLE and the resulting alignment was formatted using BoxShade

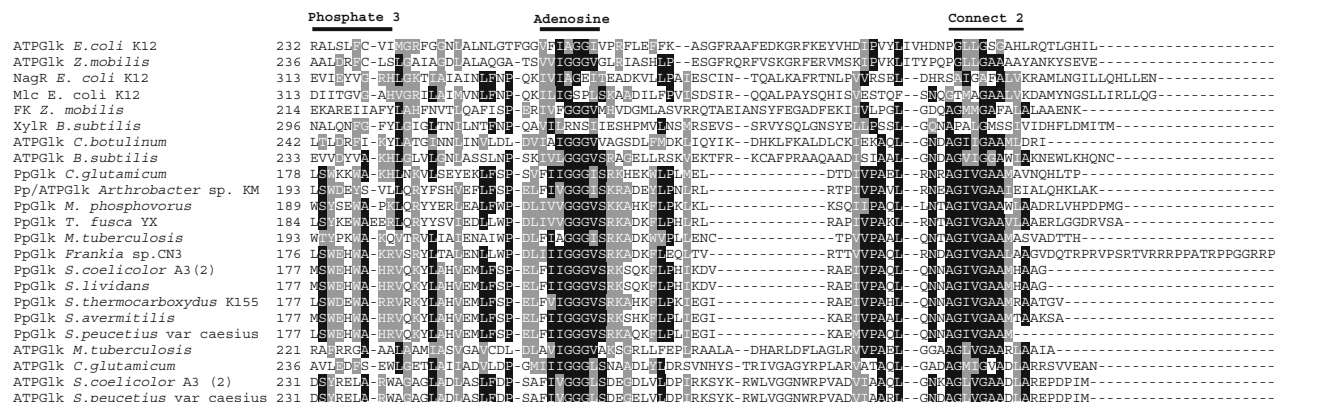
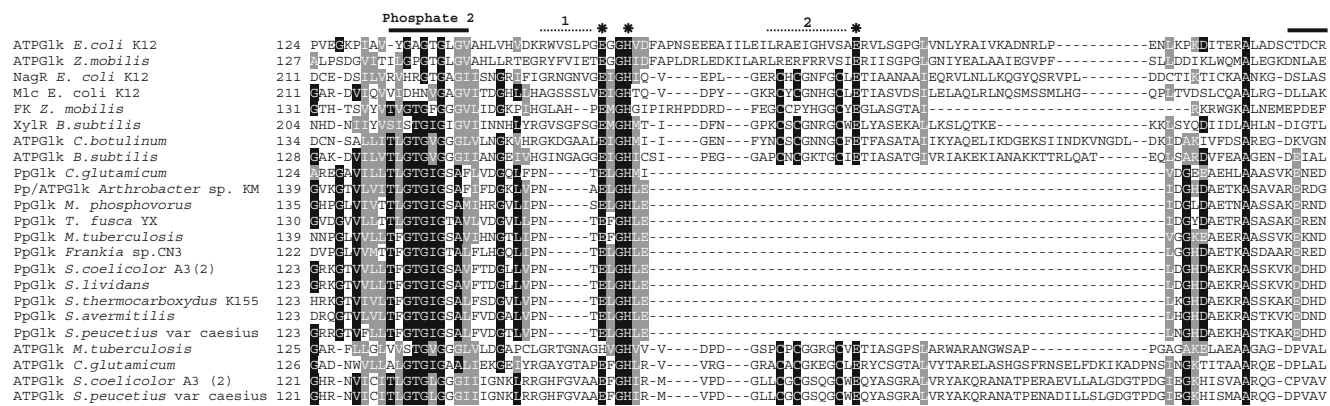


Fig. 5 Multiple amino acid sequence alignment of Pp-Glk from *S. peucetius* var. *caesius* compared to Pp-Glks, ATP-Glks, and ROK proteins from different bacterial origins. ROK1 and ROK2 (Cys-rich motif) sequences have **bold underlines**. Asterisks indicate residues involved in glucose binding. **Bold lines** above the sequences show phosphate binding sites 2 and 3, as well as the connect 2 and adenosine

regions. *Dashed lines* above the sequences show differences in ROK consensus motifs. *NagR*, *N*-acetylglucosamine utilization regulator; *XylR*, xylose-dependent repressor; *FK*, fructose kinase; *Mlc*, global regulator of sugar metabolism. Sequence alignment was carried out using MUSCLE and the resulting alignment was formatted using BoxShade

Gram-negative bacteria and the second formed by the Pp-Glks from *Actinobacteria*, including strains from the genus *Streptomyces*, *Arthrobacter*, *Renibacterium*, *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, and the pathogenic bacteria *Mycobacterium*. As can be seen, despite the fact that Gram-positive ATP-Glks and Pp-Glks are grouped within the same clade of ROK family proteins, Pp-Glks seem to be the least related to this group.

Discussion

In the genus *Streptomyces*, the ATP-Glk enzyme has been the most studied, especially because of its involvement in CCR. In contrast, only limited studies have been published for Pp-Glk activity. Hostalek et al. (1976) described a Pp-Glk from the strain *S. aureofaciens*. Gubbens et al. (2012) discovered a Pp-Glk in *S. coelicolor* and later Koide et al. (2013) expressed and purified that Pp-Glk. However, none of them looked for its activity in vivo nor determined its phosphate donor specificity or physiological impact on *S. coelicolor*. It is

noteworthy to mention that Pp-Glk was not expressed in an ATP-Glk null mutant of *S. coelicolor* forced to grow in minimal medium with glucose as the sole carbon source (Angell et al. 1994). Conversely, the mutants that grew under this condition expressed another protein (SCO6260) unrelated to Glks (van Wezel et al. 2004).

In addition to ATP-Glk, in *S. peucetius* var. *caesius*, expression of a Pp-Glk was detected during its stationary growth phase. The cloned *ppglk* gene from this bacterium showed high DNA and amino acid identity to the same gene in *S. avermitilis* and other streptomycetes. The amino acid sequence of the Pp-Glk has three phosphate regions similar to the conserved motifs for ATP interaction (Tanaka et al. 2003). As in the Pp-Glk from the actinobacterium *Microclunatus phosphovorius*, the Pp-Glk from *S. peucetius* var. *caesius* showed the proposed Pp binding site (phosphate 3) composed of two Trp surrounded by charged amino acids (Liao et al. 2012).

A phylogenetic analysis of both Glks (ATP and Pp-Glk) and ROK proteins revealed two main clades. One comprised the ATP-Glks from human and *S. cerevisiae* and the second included all prokaryotic Glks and ROK proteins. The largest

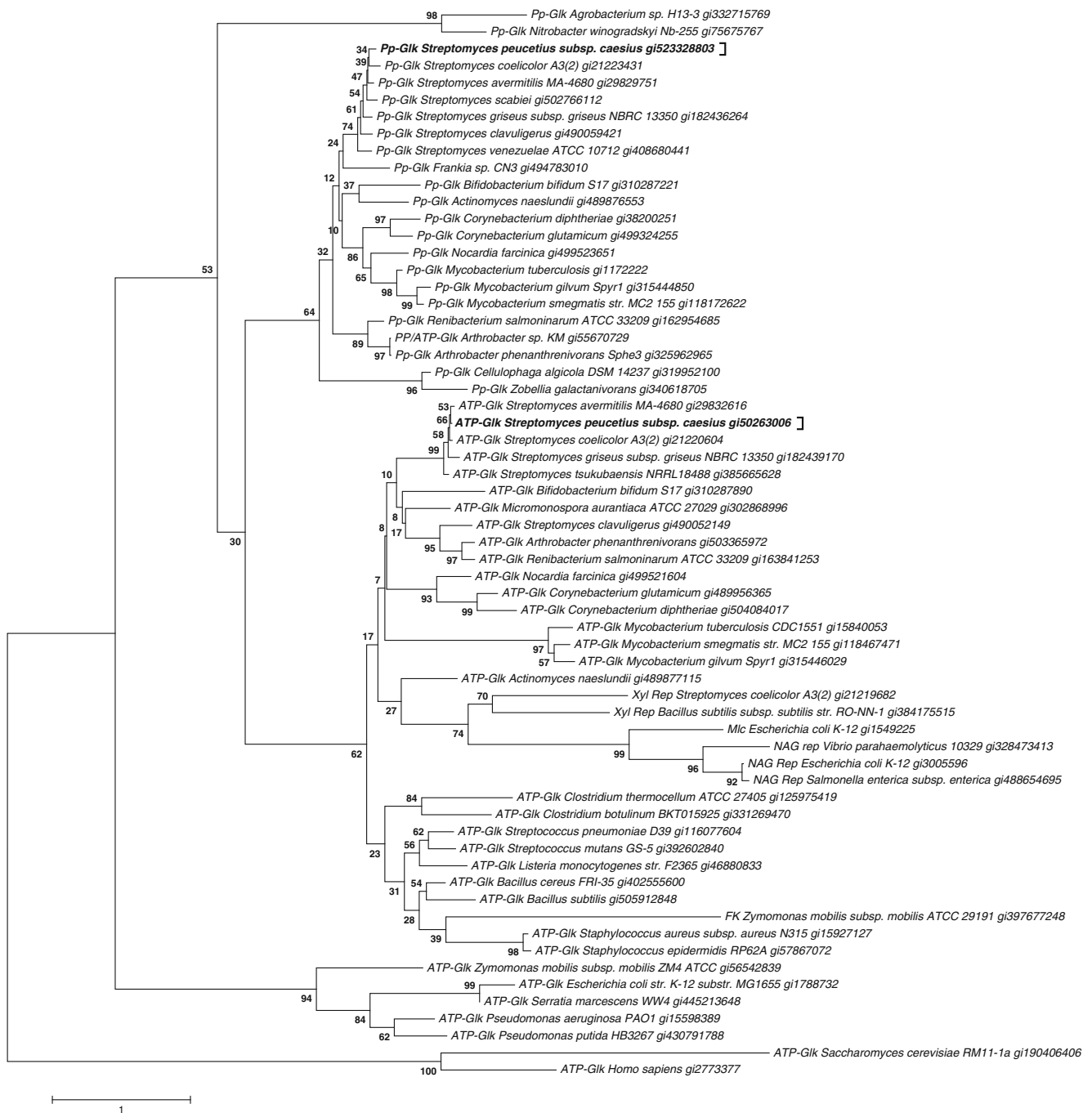


Fig. 6 Phylogenetic tree of ATP-, Pp-Glks, and ROK proteins, from Gram-negative and Gram-positive bacteria. Bootstrap proportions are given as percentage values at the corresponding nodes and were

size of the eukaryotic Glks (range from 50 to 100 kDa), compared to those from a prokaryotic origin (range from 32 to 36 kDa), could explain why these enzymes form an outgroup in the resulting tree (Kawai et al. 2005).

The observed arrangement and clustering is in agreement with the Glk classification of Kawai et al. (2005), since all sequences that belong to each group (HK, A and B) form a different clade. The ATP-Glks from Gram-positive bacteria

calculated using the Neighbour Joining method. ATP- and Pp-Glk enzymes from *S. peucetius* var *caesius* are highlighted by brackets

and the ROK proteins are grouped together. Pp-Glks from Gram-negative and Gram-positive bacteria share a common ancestor with the group of ATP-Glks/ROK proteins. However, the amino acid sequence alignment showed that Pp-Glks lack at least one of the ROK consensus sequences, the Cys-rich sequence of the Zn-binding motif. Although Pp-Glks are located in group B (ROK-related Glks), there is no information about any regulatory function for these proteins.

Although Pp-Glk activity was also detected in other streptomycetes such as *S. coelicolor*, *S. lividans*, and *S. thermocarboxydus* K155, they exhibited lower Pp-Glk activities than their counterpart ATP-Glks. As in those *Streptomyces* strains, the wild-type *S. peucetius* showed lower Pp-Glk activity than *S. peucetius* var. *caesius*. Interestingly, there was a higher concentration of the secondary metabolite in this mutant strain with more Pp-Glk activity than the wild-type strain. Even though both strains consumed all the glucose added to the culture medium, it seems *S. peucetius* preferentially uses the carbon source for the production of proteins (5.9 mg/ml compared to 1.4 mg/ml in *S. peucetius* var. *caesius*), while the doxorubicin overproducing strain uses some part of the glucose for the production of anthracyclines. According to those observations, the Pp-Glk enzyme from *S. peucetius* var. *caesius* may be involved in the production of the antibiotic, as its highest activity occurred during the stationary phase of growth. Conversely, ATP-Glk appears to be more important for the growth of the microorganism since its maximum activity is displayed during the logarithmic growth phase.

Considering the relevant role ascribed to ATP-Glk in CCR (Angell et al. 1994; Kwakman and Postma 1994; van Wezel et al. 2007), the presence of Pp-Glk was examined in a CCR-resistant mutant from *S. peucetius* var. *caesius* (Dog^R). Unexpectedly, compared to its parental strain, the Dog^R mutant showed diminished activity of both ATP- and Pp-Glks, by approximately 80 %, and maintained a Pp-/ATP-Glk ratio of 1.95 similar to the 1.87 of the parental bacteria. These findings support the hypothesis that it is the carbon flux rather than the presence of the ATP-Glk, which exerts CCR in *S. peucetius* var. *caesius*.

In conclusion, *S. peucetius* var. *caesius* showed significantly higher Pp-Glk activity than the other wild-type strains examined in this work. The high activity of this enzyme may be related to the production of secondary metabolites, whereas the ATP-Glk would be important for growth. Finally, for the onset of CCR in this particular strain, the carbon flux may be the most relevant step.

Acknowledgments We are indebted to Dr. Elizabeth Langley for critical reading of the manuscript. This work was supported in part by the grants PAPIIT IN209210 and IN201413 from DGAPA, UNAM, Mexico. We thank Dr. Guillermo Mendoza Hernández† for his useful assistance in Pp-Glk identification by MALDITOF. The technical participation of Marco A. Ortiz Jiménez is greatly appreciated.

References

- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389–3402
- Angell S, Lewis CG, Buttner MJ, Bibb MJ (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, 1,4-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol Bioeng* XI:1101–1110
- Avalos-García M (2010) Polyphasic characterization of a *Streptomyces* strain isolated from soil from Valle de Chalco. Dissertation, Universidad Nacional Autónoma de México
- Bae J, Kim D, Choi Y, Koh S, Park JE, Kim JS, Moon SH, Park B-H, Park M, Song H-E, Hong S-I, Lee D-S (2005) A hexokinase with broad sugar specificity from a thermophilic bacterium. *Biochem Biophys Res Commun* 334:754–763
- Concha MI, Leon G (2000) Cloning, functional expression and partial characterization of the glucose kinase from *Renibacterium salmoninarum*. *FEMS Microbiol Lett* 186:97–101
- Dekleva ML, Titus JA, Strohl WR (1985) Nutrient effects on anthracycline production by *Streptomyces peucetius* in a defined medium. *Can J Microbiol* 31:287–294
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32:1792–1797
- Escalante L, Ramos I, Imriskova I, Langley E, Sanchez S (1999) Glucose repression of anthracyclines formation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Appl Microbiol Biotechnol* 52:572–578
- Forero A, Sanchez M, Chávez A, Ruiz B, Rodríguez-Sanoja R, Servín-González L, Sanchez S (2012) Possible involvement of the *sco2127* gene product in glucose repression of actinorhodin production in *Streptomyces coelicolor*. *Can J Microbiol* 58:1195–1201
- Gubbens J, Janus M, Florea BI, Overkleeft HS, van Wezel GP (2012) Identification of glucose kinase-dependent and -independent pathways for carbon control of primary metabolism development and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* by quantitative proteomics. *Mol Microbiol* 86:1490–1507
- Henzel WJ, Stults JT (1996) Unit 16.2. Matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass analysis of peptides. In: Coligan JE, Dunn BM, Ploegh HL, Speicher DW, Wingfield PT (eds) *Current protocols in protein science*. Wiley, New York, pp 16.1.1–16.2.11
- Hostalek Z, Tobek I, Bobyk MA, Kulayev IS (1976) Role of ATP-glucokinase and polyphosphate glucokinase in *Streptomyces aureofaciens*. *Folia Microbiol* 21:131–138
- Imriskova I, Langley E, Arreguín-Espinosa R, Aguilar G, Pardo JP, Sanchez S (2001) Rapid purification and biochemical characterization of glucose kinase from *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Arch Biochem Biophys* 394:137–144
- Imriskova I, Arreguín-Espinosa R, Guzmán S, Rodríguez-Sanoja R, Langley E, Sánchez S (2005) Biochemical characterization of the glucose kinase from *Streptomyces coelicolor* compared to *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Res Microbiol* 156:361–366
- Kawai S, Mukai T, Mori S, Mikami B, Murata K (2005) Hypothesis: structures, evolution, and ancestor of glucose kinases in the hexokinase family. *J Biosci Bioeng* 99:320–330
- Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA (2000) *Practical Streptomyces genetics*. John Innes Foundation, Norwich
- Koide M, Miyagawa A, Kudo F, Eguchi T (2013) Characterization of polyphosphate glucokinase SCO5059 from *Streptomyces coelicolor*. *Biosci Biotechnol Biochem* 77:2322–2324
- Kwakman JHJM, Postma PW (1994) Glucose kinase has a regulatory role in carbon catabolite repression in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* 176:2694–2698
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Liao H, Myung S, Zhang Y-H P (2012) One-step purification and immobilization of thermophilic polyphosphate glucokinase from *Thermobifida fusca* YX: glucose-6-phosphate generation without ATP. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:1109–1117

- Lindner SN, Knebel S, Pallerla SR, Schoberth SM, Wendisch VF (2010) Cg2091 encodes a polyphosphate/ATP-dependent glucokinase of *Corynebacterium glutamicum*. Appl Microbiol Biotechnol 87: 703–713
- Miyazono K-I, Tabei N, Morita S, Ohnishi Y, Horinouchi S, Takonura M (2012) Substrate recognition mechanism and substrate-dependent conformational changes of an ROK family glucokinase from *Streptomyces griseus*. J Bacteriol 194:607–616
- Mukai T, Kawai S, Matsukawa H, Matuo Y, Murata K (2003) Characterization and molecular cloning of a novel enzyme, inorganic polyphosphate/ATP-glucosyltransferase, of *Arthrobacter* sp. strain KM. Appl Environ Microbiol 69:3849–3857
- Ramos I, Guzmán S, Escalante L, Imriskova I, Rodríguez-Sanoja R, Sánchez S, Langley E (2004) Glucose kinase alone cannot be responsible for carbon source regulation in *Streptomyces peuceletius* var. *caesi*us. Res Microbiol 155:267–274
- Rao NN, Gómez-García MR, Kornberg A (2009) Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival. Ann Rev Biochem 78:605–647
- 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
- Szymona S, Ostrowski W (1964) Inorganic polyphosphate glucokinase of *Mycobacterium phlei*. BBA-Enzymol Subj 85:283–295
- Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR (2013) Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. J Pharm Pharmacol 65:157–170
- Takahashi N, Kalfas S, Yamada T (1995) Phosphorylating enzymes involved in glucose fermentation of *Actinomyces nesiundii*. J Bacteriol 177:5806–5811
- Tanaka S, Lee S-O, Hamaoka K, Kato J, Takiguchi N, Nakamura K, Ohtake H, Kuroda A (2003) Strictly polyphosphate-dependent glucokinase in a polyphosphate-accumulating bacterium, *Microtholunatus phosphovorans*. J Bacteriol 185:5654–5656
- van Wezel GP, Mahr K, König M, Traag BA, Pimentel-Schmitt EF, Willimek A, Titgemeyer F (2004) GlcP constitutes the major glucose uptake system of *Streptomyces coelicolor* A3(2). Mol Microbiol 55:624–636
- van Wezel GP, König M, Mahr K, Nothaft H, Thomae AW, Bibb M, Titgemeyer F (2007) A new piece of an old jigsaw: glucose kinase is activated posttranslationally in a glucose transport-dependent manner in *Streptomyces coelicolor* A3(2). J Mol Microbiol Biotechnol 12:67–74
- Zeman SM, Phillips DR, Crothers DM (1998) Characterization of covalent adriamycin DNA adducts. PNAS 95:11561–11565