



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



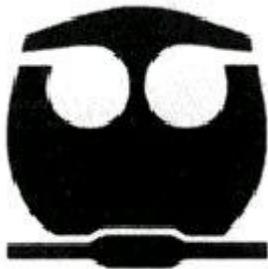
FACULTAD DE QUÍMICA
PROGRAMA DE MAestrÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

ESTUDIO DE LAS POSIBLES INTERACCIONES
PROTEICAS DE LA GLUCOSA CINASA DE
Streptomyces peucetius variedad *caesius*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :
DIANA IVONNE ROCHA MENDOZA



Tutor: DR. SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL

MÉXICO, D. F.

Julio 2011



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.

“ESTUDIO DE LAS POSIBLES INTERACCIONES PROTEICAS DE LA GLUCOSA CINASA DE *Streptomyces peucetius* variedad *caesius*”

RECONOCIMIENTOS

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

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis lo conformaron los siguientes investigadores:

Dra. Maricarmen Quirasco Baruch (Facultad de Química)
Dra. Amelia Farrés González-Saravia (Facultad de Química)
Dr. Sergio Sánchez Esquivel (Instituto de Investigaciones Biomédicas)

Se reconoce la valiosa asesoría técnica de la Maestra Beatriz Ruiz Villafán durante la realización de este proyecto.

Se reconoce la ayuda brindada por la Dra. Romina Rodríguez Sanoja en la realización del trabajo experimental en el Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Se reconoce la ayuda brindada por el Ing. Abel Blancas en la realización del trabajo experimental en el Instituto de Investigaciones Biomédicas.

El jurado de examen para optar por el grado de Maestra en Ciencias (Bioquímicas) estuvo constituido por:

Presidente	Dra. María del Carmen Wachter Rodarte
Vocal	Dra. María Imelda López Villaseñor
Secretario	Dr. Daniel Segura González
Suplente	Dra. Amelia Farrés González-Saravia
Suplente	Dr. Juan Miranda Ríos

A mi mami por ser mi ejemplo a seguir y por ser también mi papi

A mi hermano David por su gran cariño y apoyo incondicional

A mi hermano Diego por su gran cariño y sus jalones de orejas

A mis hermanas Sara y Yose

Y al amor de mi vida Israel García Cano

LOS AMO

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Sergio Sánchez Esquivel por dejarme pertenecer a esta gran familia, por ser un gran maestro, por su valioso tiempo, su amabilidad, su confianza, su amistad y lo más importante, por ser un gran ser humano.

A la Dra. Amelia Farrés González-Saravia por sus consejos, por todo el apoyo que me ha brindado a lo largo de todo este tiempo y por ser un ejemplo a seguir.

A Beatriz Ruiz Villafán por su tiempo dedicado a ayudarme a aprender.

A mis compañeros y grandes amigos del laboratorio que hacen aún más divertido este trabajo, por su ayuda, su amistad y sobre todo su seriedad (aja): Marianne, Adán, Betty, Víctor, Brenda Sánchez, Brenda Cabrera, Hugo, Caty, Mau, Yolis, Silvia, Alba, Allan, Tere, Alex, Anita y Sergio.

A la familia García Cano, porque también ya son mi familia: Isai, Daniel, Lidia, Alforonso, Aramis, Layla, Israel, Robin y Jimmy. Los quiero mucho mucho.

Un agradecimiento especial a **Israel García Cano** por su entusiasmo, su energía, su forma de ver la vida junto a ti todo es más fácil y divertido, por tu alegría y sentido del humor, por tu comprensión y ternura, porque eres mi motor, por ser quien eres **TE ADMIRO y TE AMO. ¡¡¡¡¡ Gracias por existir !!!!!**

A Erika (Pirata) y a Clau porque son unas grandes amigas. Las quiero mucho

“ESTUDIO DE LAS POSIBLES INTERACCIONES PROTEICAS DE LA GLUCOSA CINASA DE *Streptomyces peucetius* variedad *caesius*”

CONTENIDO

Resumen	(1)
1. Introducción	(2)
1.1 ¿Qué son los <i>Streptomyces</i> ?	(2)
1.2 Utilización preferencial de las fuentes de carbono disponibles: represión catabólica por carbono (RCC)	(5)
1.3 ¿Cómo funciona el sistema de represión catabólica por carbono en <i>E. coli</i> ?	(5)
1.4 ¿Y qué pasa con <i>B. subtilis</i> ?	(7)
1.5 ¿Qué se sabe de la RCC en <i>Streptomyces</i> ?	(8)
1.6 La glucosa cinasa parece ser un jugador central en el proceso de represión catabólica por carbono en el género de <i>Streptomyces</i>	(9)
1.7 ¿Qué características tiene la glucosa cinasa?	(10)
1.8 Detección de interacciones proteína-proteína	(12)
1.9 Métodos de análisis de interacciones proteicas <i>in vivo</i>	(13)
1.9.1 Sistema de doble híbrido	(13)
1.9.2 Reactivos Crosslinking	(13)
1.10 Co-inmunoprecipitación	(14)
1.11 Pull-down	(14)
1.12 Resonancia de plasmones de superficie	(14)
2. Antecedentes	(15)
3. Planteamiento del problema	(17)
4. Hipótesis	(17)
5. Objetivo general	(17)
5.1 Objetivos particulares	(17)

6. Diagrama de trabajo	(18)
7. Metodología	(19)
7.1 Construcción de la proteína de fusión 6xHis-Glk	(20)
7.1.1 Subclonación de <i>glk</i>	(20)
7.1.2 Extracción de plásmido a mediana escala (Midiprep)	(20)
7.1.3 Digestión enzimática de pGEM-T Easy- <i>glk</i> y pBAD/HisB	(20)
7.1.4 Purificación de ADN a partir de gel de agarosa	(21)
7.1.5 Desfosforilación pBAD/HisB	(21)
7.1.6 Ligación de los fragmentos <i>glk</i> y pBAD/HisB	(22)
7.1.7 Transformación de células de <i>E. coli</i> TOP10	(22)
7.2 Expresión de la proteína de fusión 6xHis-Glk en pBAD/HisB	(22)
7.2.1 Pre-inóculo	(22)
7.2.2 Inóculo	(22)
7.2.3 Detección de la proteína de fusión 6xHis-Glk por western-blot	(23)
7.3 Mutagénesis dirigida	(23)
7.4 Subclonación de <i>glk</i> en pQE31	(25)
7.5 Expresión de la proteína de fusión 6xHis-Glk en pQE31	(26)
7.5.1 Pre-inóculo	(26)
7.5.2 Inóculo	(27)
7.6 Purificación de 6xHis-Glk	(27)
7.6.1 Lisis celular por sonicación	(27)
7.6.2 Purificación de 6xHis-Glk por cromatografía de afinidad	(27)
7.7 Determinación de actividad enzimática de glucosa cinasa	(28)
7.8 Ensayo de interacción proteína-proteína por pull-down	(29)
7.8.1 Inmovilización de 6xHis-Glk	(29)
7.8.2 Extractos proteínicos de <i>Streptomyces peucetius</i> variedad <i>caesius</i>	(29)
7.8.3 Pre-inóculo de <i>Streptomyces peucetius</i> variedad <i>caesius</i>	(30)
7.8.4 Inóculo de <i>Streptomyces peucetius</i> variedad <i>caesius</i>	(30)

7.8.5 Lisis celular	(30)
7.8.6 Pull-down	(30)
7.9 Far-western	(31)
8. Resultados y Discusión	(33)
9. Conclusiones	(61)
10. Perspectivas	(61)
11. Anexo I	(62)
11.1 Plásmido pBAD/HisB (Invitrogen)	(62)
11.2 Plásmido pQE31 (Qiagen)	(64)
12. Referencias	(66)

RESUMEN

El género *Streptomyces* pertenece al grupo de los Actinomicetos, bacterias Gram-positivas con alto contenido de guanina-citosina en su genoma que presentan un ciclo de vida muy complejo parecido al de los hongos. Han sido reconocidos por su capacidad de producir una gran variedad de compuestos con actividad biológica importante como antifúngicos, inmunosupresores, herbicidas y antibióticos, entre otros. A estos compuestos se les clasifica como metabolitos secundarios al ser producidos en la etapa tardía del crecimiento de la bacteria. Dada la importancia industrial y farmacéutica de estos compuestos, los estreptomicetos han sido objeto de una extensa investigación sobre los mecanismos que regulan la síntesis de los productos bioactivos. Uno de los más frecuentes es la represión catabólica por carbono, que consiste en la utilización preferencial de una fuente de carbono sobre otras fuentes presentes y que afecta directamente la síntesis de metabolitos secundarios. El sistema de fosfotransferasa ha sido descrito como el principal mecanismo de represión catabólica en bacterias como *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, con algunas variaciones entre ellas. Sin embargo, el mecanismo de represión catabólica por carbono global para los estreptomicetos no parece tener relación con el sistema de fosfotransferasa y aún no ha sido esclarecido. En el caso de *Streptomyces coelicolor*, el organismo más estudiado de este género, se sabe que la glucosa cinasa desempeña un papel regulador importante para dicho mecanismo. No presenta dominios de unión a ADN y su actividad reguladora es independiente de la actividad enzimática. Se sospecha que la forma en la que actúa es uniéndose a otras proteínas reguladoras como por ejemplo, el represor del operón de maltosa. Mediante técnicas de biosensores se observó que la glucosa cinasa se une a una proteína no identificada. En *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, productor del antitumoral doxorubicina, la glucosa cinasa también parece formar parte importante en el mismo sistema de regulación por carbono. Aún cuando la glucosa cinasa de *S. coelicolor* es muy parecida a la de *S. peucetius* var. *caesius*, presentan diferencias de estabilidad: la de este último es muy inestable en su conformación como tetrámero y sólo se estabiliza en presencia de un exceso de glucosa. Aún con esta pequeña diferencia se propone que la glucosa cinasa de *S. peucetius* var. *caesius* también se une a proteínas para ejercer su papel como regulador. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad que presenta la glucosa cinasa de *S. peucetius* var. *caesius* para unirse a otras proteínas. Se empleó la metodología de unión proteína-proteína por far-western y pull-down. Sin embargo, no se pudo identificar alguna proteína que establezca una unión estable con la glucosa cinasa bajo las condiciones evaluadas. Quizá esto sea debido a que la glucosa cinasa requiera de alguna modificación post-traducciona para poder unirse a otras proteínas, o quizá la unión podría darse con alguna proteína ubicada en membrana, las cuales no fueron incluidas en este estudio.



1. INTRODUCCIÓN

1.1 ¿Qué son los *Streptomyces*?

El género *Streptomyces* pertenece a la familia Streptomycetaceae y a la clase Actinobacteria. Son bacterias Gram-positivas con alto contenido de guanina y citosina en su genoma, generalmente aerobias estrictas, distribuidas principalmente en suelos. Presentan en su ciclo de vida una diferenciación morfo-fisiológica única dentro de los procariontes. A diferencia de la mayoría de las bacterias que son unicelulares y se multiplican por fisión binaria, los *Streptomyces* presentan un crecimiento vegetativo miceliar parecido al de los hongos, que se nutre principalmente de polímeros insolubles, como almidón y celulosa presentes en las plantas, mediante la secreción y acción de una variada gama de enzimas hidrolíticas extracelulares (Hodgson, 2000).

Una vez que los nutrientes se han agotado, se inicia un proceso complejo de diferenciación, el cual comienza con el surgimiento de hifas aéreas que crecen nutriéndose de la lisis del micelio vegetativo. Posteriormente, las hifas aéreas se enroscan y se septan para dar lugar a la formación de esporas que al germinar vuelven a generar micelio vegetativo (Figura 1).

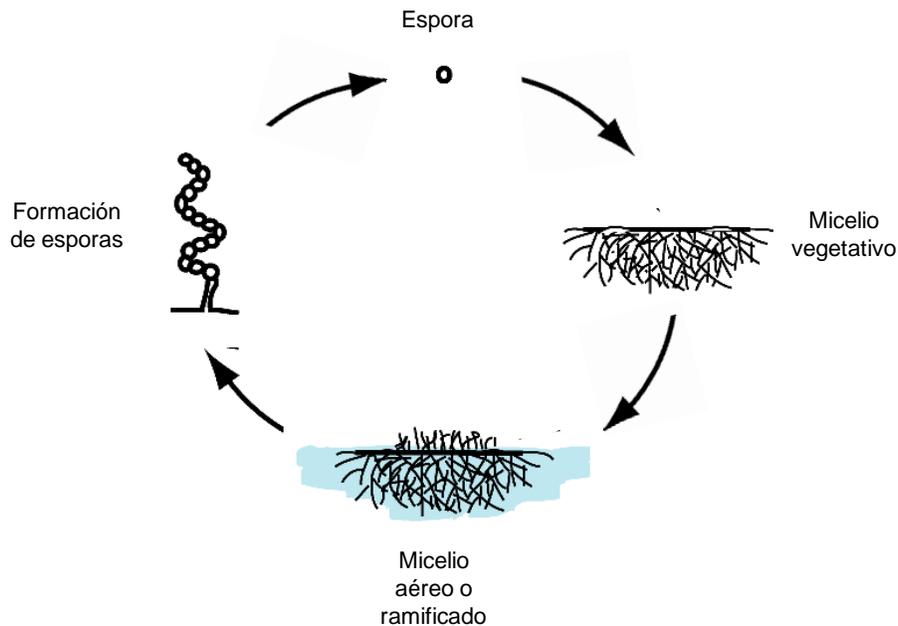


Figura 1. Ciclo de vida de *Streptomyces*. Tomado y modificado de Chater 1998.



El complejo ciclo de vida de los *Streptomyces* culmina con la formación de un micelio aéreo esporulante, la producción simultánea de antibióticos y de enzimas extracelulares capaces de solubilizar polímeros complejos de las plantas le permiten desarrollar el micelio aéreo (Figura 2).

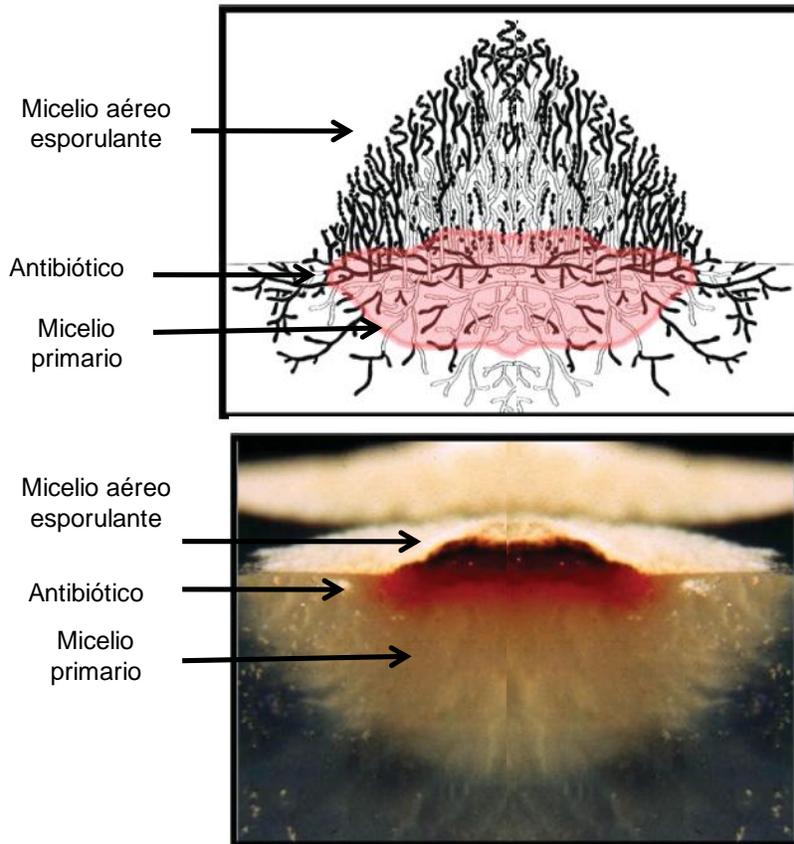


Figura 2. Fotografía del crecimiento de una colonia en agar. El diagrama y la fotografía muestran cómo la presencia del antibiótico (en rojo) protege los nutrientes liberados de las células muertas (en blanco) lo cual permite el desarrollo del micelio aéreo y la formación de esporas (en negro). Tomado y modificado de Chater (2006).

Este género es importante debido a que durante la fase estacionaria de crecimiento produce una gran variedad de metabolitos secundarios con propiedades biológicas relevantes. El metabolito secundario más familiar es la geosmina, el cual imparte a los suelos su olor característico a “tierra mojada”. Los metabolitos secundarios más importantes producidos por el género *Streptomyces* son los antibióticos. En los años 90’s se tenían identificados 6000 antibióticos diferentes producidos por bacterias, de los cuales el 85% fue identificado a partir de bacterias pertenecientes al género *Streptomyces* (Goodfellow y



O'Donnell, 1992). Además de los antibióticos, los *Streptomyces* también producen otros compuestos con diferentes actividades biológicas de gran importancia clínica y en la industria de alimentos (Tabla I).

Tabla I. Algunos ejemplos de compuestos producidos por el género *Streptomyces* (Hopwood, 2000).

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL METABOLITO SECUNDARIO	METABOLITO	MICROORGANISMO
Antibiótico	Estreptomina	<i>S. griseus</i>
	Tetraciclina	<i>S. rimosus</i>
	Neomicina	<i>S. fradiae</i>
	Cloranfenicol	<i>S. venezuelae</i>
	Gentamicina	<i>S. griseus</i>
Antifúngico	Natamicina	<i>S. natalensis</i>
	Anfotericina	<i>S. nodosus</i>
Anticancerígeno	Doxorrubicina	<i>S. peucetius</i>
	Bleomicina	<i>S. verticillus</i>
	Mitomicina	<i>S. caespitosus</i>
Inmunosupresor	Rapamicina	<i>S. hygrosopicus</i>
Herbicida	Bialafos	<i>S. hygrosopicus</i>
Enzimas extracelulares	Mananasas	<i>S. olivochromogenes</i>
	Xilanasas	<i>S. lividans</i>
	α -amilasas	<i>S. venezuelae</i>

Al contrario de los metabolitos primarios, los metabolitos secundarios no son esenciales para el crecimiento de los microorganismos que los producen (Vining, 1992). Sin embargo, les proporcionan ventajas competitivas a los mismos en su habitat, como la inhibición del crecimiento de otros microorganismos que compiten por los mismos nutrientes (Beppu, 1992). Sin embargo, la síntesis de los metabolitos secundarios se encuentra regulada por la fuente de carbono disponible que tenga el estreptomiceto (Chater *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2010).



1.2 Utilización preferencial de las fuentes de carbono disponibles: represión catabólica por carbono

La mayoría de las bacterias pueden usar selectivamente los sustratos de una mezcla de fuentes de carbono. La presencia de fuentes de carbono preferenciales previene la expresión, y frecuentemente, la actividad de sistemas catabólicos que permiten el uso de fuentes de carbono secundarias. Este tipo de regulación es llamada represión catabólica por carbono (RCC), y se puede llevar a cabo por distintos mecanismos reguladores tales como la represión y el control de la traducción por alguna proteína de unión a RNAm en diferentes bacterias. Las fuentes de carbono pueden ser co-metabolizadas o la bacteria puede usar preferentemente la más accesible, cuyo consumo genere un crecimiento más rápido. En muchos organismos la glucosa es la fuente de carbono preferencial y frecuentemente previene el uso de otras fuentes de carbono secundarias. La preferencia por glucosa sobre otras fuentes de carbono genera la llamada represión catabólica por glucosa (RCG), o en forma más general, RCC. En otras bacterias como *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum* y *Pseudomonas aeruginosa* la glucosa no es de uso preferencia, los genes necesarios para la utilización de glucosa son reprimidos por la presencia de su fuente de carbono preferencial, proceso conocido como RCC reversa (Collier *et al.*, 1996; Van den Bogaard *et al.*, 2000; Parche *et al.*, 2006). En la actualidad la RCC se define como un fenómeno de regulación por medio del cual la expresión de los genes que codifican para el uso de fuentes de carbono secundarias y/o las actividades de las enzimas correspondientes, son limitadas en presencia de una fuente de carbono preferencial, como la glucosa (Görke y Stülke, 2008). Alrededor del 5-10% de los genes de las bacterias se encuentran sujetos a regulación por el proceso de RCC (Yoshida *et al.*, 2001). Sin embargo, se sabe de dos bacterias patógenas que no presentan regulación por RCC, *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma pneumoniae* tienen un genoma pequeño y se adaptan sólo a algunos ambientes, no requieren de regulación (Nicholson *et al.*, 2004; Halbedel *et al.*, 2007)

La RCC ha sido estudiada en los microorganismos modelo *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. El sistema que describe la RCC en ambos microorganismos es conocido como sistema de fosfotransferasa carbohidrato-fosfoenolpiruvato (PTS). En *E. coli*, la RCC es regulada por la prevención de la activación transcripcional de genes catabólicos en presencia de glucosa. En contraste, en *B. subtilis*, la RCC está regulada negativamente por una proteína represora expresada en presencia de glucosa (Görke y Stülke, 2008).

1.3 ¿Cómo funciona el sistema de represión catabólica por carbono en *E. coli*?

En el mecanismo de RCC descrito para *E. coli* los componentes esenciales son la proteína CRP (Cyclic AMP Receptor Protein) también llamada CAP (Catabolite gene-Activator Protein), la señal dada por el metabolito AMPc, la adenilato ciclasa y la enzima EIIA componente del PTS. La regulación de la RCC está dada por el estado de fosforilación de la enzima EIIA. Esta enzima se encuentra predominantemente



desfosforilada cuando *E. coli* crece rápidamente en presencia de una fuente de carbono que es metabolizada rápidamente como la glucosa (Hogema *et al.*, 1998; Bettenbrock *et al.*, 2007). La enzima EIIA fosforilada ejerce su efecto regulador activando a la enzima unida a membrana, la adenilato ciclasa. Una vez que se ha sintetizado AMPc por la adenilato ciclasa, éste se une a la proteína CRP. El complejo CRP-AMPc activa los promotores de muchos genes catabólicos y de operones. Estos promotores por lo general son débiles y deben ser activados para que la ARN polimerasa pueda unirse (Busby S y Ebricht R, 1999)

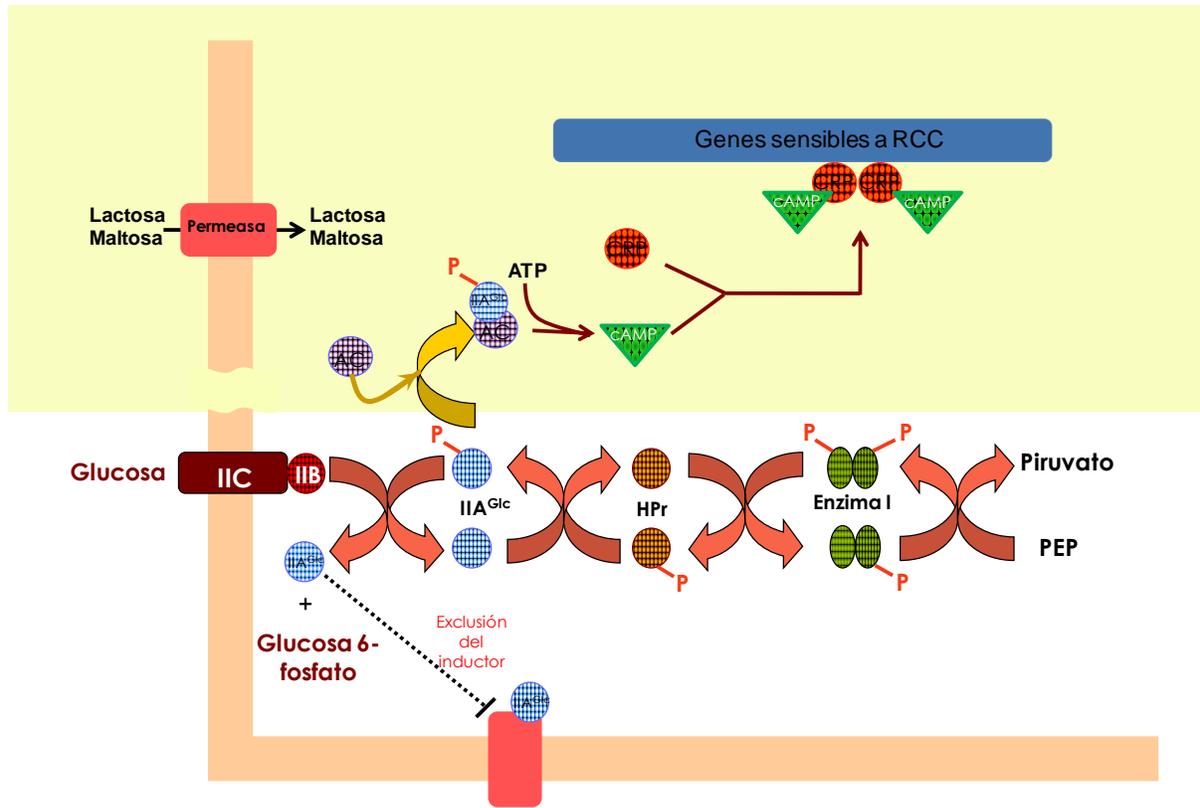


Figura 3. Modelo del mecanismo de represión catabólica por carbono en *Escherichia coli*. En amarillo se muestra el sistema bajo condiciones no represoras y en blanco en condiciones represoras. En el sistema de transporte de fosfotransferasa (PTS) participan las enzimas EI, HPr y EIIA_{Glc} principalmente. En presencia de glucosa, el PTS internaliza y fosforila el carbohidrato tomando el grupo fosfato a partir de la enzima EIIA_{Glc}, la cual ejerce la exclusión del inductor de otra fuente de carbono. Por el contrario, en ausencia de la glucosa, EIIA_{Glc} permanece fosforilada, activa a la adenilato ciclasa (AC). La AC sintetiza AMPc, el cual se une a su receptor (CRP) activando la transcripción de genes sensibles a la RCC. (Tomado y modificado de Sánchez *et al.*, 2010).

El sistema PTS requiere de dos fosfotransferasas, la enzima I (EI) y HPr (Hot shock Protein) además de una gran cantidad de permeasas específicas para diferentes carbohidratos, llamadas enzimas II (EII). En general, la transferencia del grupo fosfato se da desde el fosfoenolpiruvato (PEP) hacia la enzima I, luego HPr, a la enzima II y finalmente hacia el carbohidrato.



El sistema PTS es el más importante en el transporte y fosforilación de carbohidratos en *E. coli*. Fosforila y regula el transporte de carbohidratos, regula indirectamente la expresión de genes cuyos productos están involucrados en el catabolismo de diferentes azúcares y modula la síntesis de AMP cíclico (AMPc). Los niveles intracelulares de AMPc activan la síntesis de muchas enzimas catabólicas sensibles a represión al unirse con la proteína receptora de AMPc (CRP) y actuar sobre los promotores sensibles a RCC estimulando su transcripción (Stülke y Hillen, 1999).

1.4 ¿Y qué pasa con *B. subtilis*?

Los componentes principales del sistema PTS para *B. subtilis* son el factor transcripcional CcpA (catabolite control protein A), la proteína HPr del PTS, la enzima bifuncional HPr cinasa/fosfatasa (HprK) y metabolitos intermediarios de la glucólisis fructosa-1,6-bifosfato (FBP) y la glucosa 6-fosfato (Titgemeyer y Hillen, 2002; Warner y Lolkema, 2003).

La mayoría de las señales en la RCC están dadas por el componente HPr. La enzima HPr puede ser fosforilada por dos mecanismos diferentes, en la histidina-15 por la enzima I del PTS, y en la serina-46 por una HPr cinasa-fosfatasa dependiente de ATP, esta última activada por metabolitos como la FBP (Nessler *et al.*, 2003).

La RCC en *B. subtilis* responde a dos mecanismos diferentes, la represión de genes catabólicos y operones por la proteína de control catabólico CcpA, la cual previene la transcripción de genes al actuar en *cis* sobre elementos de respuesta al catabolito (*cre*), y segundo por la no inducción de los operones. La enzima HPr fosforilada controla las enzimas que generan el inductor o activadores transcripcionales (Jones *et al.*, 1997).

La proteína HPr fosforilada Ser-46 activa a la proteína de control catabólico (CcpA), uniéndose a ella e induciendo una conformación que tiene alta afinidad por elementos de respuesta a catabolitos (*cre*). De esta manera el complejo CcpA y HPr (Ser-P) unido en la secuencia *cre* (reguladoras de los operones sensibles a la RCC) inhibe el inicio de la transcripción (Figura 4).



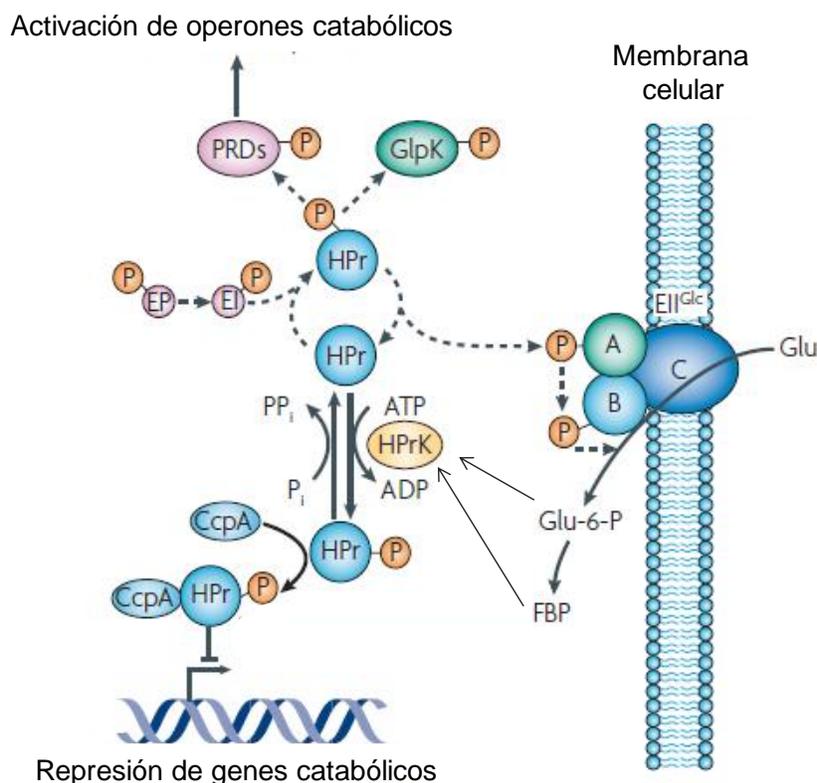


Figura 4. Modelo del mecanismo de represión catabólica por carbono en *B. subtilis*. La proteína HPr puede ser fosforilada en Ser46 por la HPr cinasa/fosfatasa (HPrK). Esta fosforilación ocurre cuando la concentración intracelular de fructosa 1,6-bisfosfato (FBP) y de ATP son altas, reflejo de la presencia de una fuente de carbono preferencial. HPr (Ser-P) se une a la proteína CcpA, interacción promovida por intermediarios de la glucólisis como FBP y glucosa 6-fosfato (Glu-6-P). El complejo CcpA y HPr (Ser-P) se une en secuencias *cre* en el ADN y así reprime la transcripción de genes catabólicos. La HPrK también desfosforila la HPr (Ser-P) bajo condiciones de alta concentración de fosfato inorgánico y bajas de ATP, lo que refleja condiciones nutricionales desfavorables. La HPr (His-P) contribuye a la RCC en ausencia de glucosa, la HPr (His-P) fosforila a la glicerol cinasa (GlpK) y reguladores transcripcionales que contienen dominios reguladores por fosfoenolpiruvato (PRD). En presencia de glucosa, se reprime la activación de los reguladores PRD por su inductor, mecanismo que ha sido nombrado como prevención de la inducción (Tomado y modificado de Görke y Stülke, 2008).

1.5 ¿Qué se sabe de la RCC en *Streptomyces*?

En el género *Streptomyces*, la utilización preferencial de fuentes de carbono fácilmente metabolizables, la síntesis de metabolitos secundarios y la diferenciación morfológica están sujetos de regulación catabólica por carbono (Angell *et al.*, 1992; Brückner y Titgemeyer, 2002; Hodgson, 2000; Titgemeyer y Hillen, 2002). Aunque el fenómeno de RCC ha sido estudiado en actinobacterias pertenecientes al género *Streptomyces*, en *Bifidobacterium longum* y *Corynebacterium glutamicum*, hasta el momento no se han descubierto mecanismos comunes de RCC en este grupo de bacterias. En *S. coelicolor*, la RCC



de genes que están involucrados en la utilización de fuentes de carbono secundarias parece ser independiente del sistema PTS (van Wezel *et al.*, 2007). En *S. coelicolor*, *S. lividans* y *S. griseofuscus* se han identificado dos enzimas del sistema PTS, la enzima I (EI) y HPr, y la permeasa específica de fructosa (enzima EII), las cuales son necesarias para la incorporación de fructosa y para ejercer represión sobre la glicerol cinasa de *S. coelicolor*. También han sido identificados los genes de las enzimas involucradas en el sistema PTS para el transporte y concomitante fosforilación de la N-acetilglucosamina (EI, HPr y EII) (Nothhaft *et al.*, 2003; Titgemeyer *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2002). Sin embargo, la delección del gen *ptsH* que codifica para HPr no tiene efecto en la represión por glucosa sobre la síntesis de agarasa, galactocinasa y glicerol cinasa, lo cual sugiere que este sistema PTS no tiene un papel global en la RCC para el género de *Streptomyces* (Butler *et al.*, 1999; Parche *et al.*, 1999).

1.6 La glucosa cinasa parece ser un jugador central en el proceso de represión catabólica por carbono en el género de *Streptomyces*.

Se ha encontrado que la glucosa cinasa (Glk) juega un papel central en la RCC en *S. coelicolor* (Hodgson, 1982). Existen reportes de mutantes en *S. coelicolor* resistentes al análogo no metabolizable de la glucosa, la 2-desoxiglucosa (DOG) las cuales son deficientes en la represión por glucosa. La pérdida de represión por glucosa en tales mutantes correlaciona con la ausencia de actividad de Glk dependiente de ATP (Seno y Chater, 1983). Interesantemente, cuando estas mutantes fueron complementadas con el gen *glk* de la bacteria Gram-negativa *Zymomonas mobilis*, se restableció la actividad de Glk, la utilización de glucosa, pero no la represión ejercida por este carbohidrato (Angell *et al.*, 1994).

De la misma forma, se realizó la complementación con el gen *glk* de *S. coelicolor*, restaurándose la actividad de Glk y el efecto de represión por glucosa sobre el uso de otros carbohidratos (Ikeda *et al.*, 1984; Angell *et al.*, 1992). Estos resultados sugieren la existencia de la actividad reguladora, diferente de la actividad catalítica de la enzima, necesaria para llevar a cabo la RCC en este microorganismo.

Se obtuvieron resultados similares con una serie de mutantes al azar resistentes a DOG de *S. peucetius* var. *caesius* (Segura *et al.*, 1996; Escalante *et al.*, 1999), microorganismo de importancia industrial, productor del antitumoral doxorubicina. Una de estas mutantes (Dog^R-21) presenta deficiencia en la actividad de Glk, un fenotipo insensible a la represión por glucosa de varios genes, incluyendo aquellos involucrados en la síntesis de antraciclinas y la utilización de otras fuentes de carbono (Segura *et al.*, 1996). Además de presentar una deficiencia en la actividad de Glk, presentó una disminución del 50% en el transporte de glucosa comparado con lo observado en la cepa silvestre (Escalante *et al.*, 1999). La insensibilidad a RCC fue correlacionada con la pérdida de la actividad enzimática de Glk (Segura *et al.*, 1996; Escalante *et al.*, 1999).



Por otra parte, Kwakman y Postma (1994) demostraron que no había efecto de represión por carbono sobre las enzimas glicerol cinasa y agarasa en las mutantes resistentes a DOG de *S. coelicolor*, crecidas en diferentes fuentes de carbono que no son metabolizadas a través de la glucosa cinasa. Debido a que Glk no está involucrada en el metabolismo de fuentes de carbono diferentes a la glucosa, se concluyó que la presencia de la glucosa cinasa, más que el flujo a través de esta enzima, es importante para ejercer la RCC. Adicionalmente, se demostró que la sobre-expresión del gen *glkA* provoca la pérdida de represión por glucosa (Kwakman y Postma, 1994).

Interesantemente, Glk no contiene sitios de unión a ADN, por lo que es poco probable que regule directamente la transcripción (Titgemeyer *et al.*, 1994). Sin embargo, se ha propuesto que la Glk podría transmitir eventualmente la señal de RCC vía la interacción directa con factores reguladores de la transcripción (Angell *et al.*, 1992; Mahr y Titgemeyer, 2001), los cuales pueden incluir reguladores específicos como MalR y GylR, represores de los operones de maltosa y glicerol, respectivamente, o reguladores generales como CcrA y BldB (Pope *et al.*, 1996; van Wezel *et al.*, 1997).

También se ha sugerido que la Glk podría ser activada por algún metabolito y como consecuencia podría sufrir algún cambio conformacional, el cual le permitiría interactuar con reguladores operón-específicos, provocando RCC de los operones catabólicos respectivos (Görke y Stülke, 2008). Existen evidencias de que la Glk está asociada a membrana cuando las células son cultivadas en presencia de glucosa o cuando se sobre-produce la glucosa permeasa (GlcP). La asociación con membrana se correlaciona con la alta actividad de Glk y la presencia de dos isoformas de menor tamaño a Glk. Se ha supuesto que las modificaciones post-traduccionales serían decisivas para que la Glk funcione como enzima o como proteína reguladora (van Wezel *et al.*, 2007).

Mahr y colaboradores (2000) demostraron mediante estudios de resonancia de plasmones de superficie que la proteína recombinante His-Glk de *S. coelicolor* interactúa con otras proteínas del mismo microorganismo. Sin embargo, la técnica no permite identificarlas. Posteriormente, trataron de determinar qué proteínas interactúan con Glk mediante ensayos de pull-down, inmunoprecipitación y con el sistema de doble híbrido. Sin embargo, no se encontró ninguna proteína que interactúe con Glk (Mahr *et al.*, 2000).

1.7 ¿Qué características tiene la glucosa cinasa?

La clonación y secuenciación de *glk* de *S. coelicolor* y *S. peuceetius* var. *caesius* (Angell *et al.*, 1992; Ramos *et al.*, 2004) mostraron que la Glk es un miembro de la familia de proteínas ROK (Repressor, ORF, Kinases), presentando el 95% de identidad entre estas dos proteínas. La diferencia entre estas dos proteínas está dada en los últimos 11 aminoácidos del extremo C-terminal (Imriskova *et al.*, 2001). La



superfamilia ROK representa un grupo diverso de proteínas procarióticas que incluye represores de respuesta transcripcional, los cuales exponen en el amino terminal una secuencia de unión a ADN (hélice-vuelta-hélice), como el de N-acetilglucosamina (NagC) de *E.coli* y el represor del operón de xilosa (XylR) de *B. subtilis*. Esta superfamilia también incluye azúcar cinasas, las cuales poseen una estructura primaria altamente conservada. Sin embargo, a diferencia de las proteínas represoras, la Glk de *S. coelicolor* y de *S. peucetius* var. *caesius* carece de un dominio de unión a ADN en la región N-terminal, presente en las proteínas represoras (Titgemeyer *et al.*, 1994), por lo que no es probable que regulen la transcripción directamente.

Dentro de las cinasas de la familia ROK se encuentran las glucosa cinasas de *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *S. coelicolor*, *Bifidobacterium longum*, *C. glutamicum* y *B. subtilis*. Un alineamiento de sus secuencias reveló que alrededor del 12% de los aminoácidos se encuentran conservados en estas especies. Entre estos residuos se encuentran los que participan en la unión a glucosa y ATP (Pimentel-Schmitt *et al.*, 2007). El motivo de unión al ATP se encuentra ubicado en el extremo N-terminal y es denotado por la secuencia D-X-G-X-T (Kawai *et al.* 2005; Larion *et al.*, 2007). De manera similar, *S. coelicolor*, *S. avermitilis*, *S. griseus* y el propio *S. peucetius* var. *caesius* poseen la secuencia de aminoácidos D-I-G-G-T y es muy posible que esta región constituya el sitio de unión al ATP de la Glk (Angell *et al.*, 1994).

Imriskova *et al.*, (2001) purificó y caracterizó la glucosa cinasa de *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, encontrando que el 96% de la actividad enzimática se localiza en citoplasma y se detecta como una sola banda en un gel de poliacrilamida nativo (zimograma), sugiriendo la ausencia de isoformas. En *S. coelicolor* detectaron la presencia de isoformas de Glk de menor tamaño mediante western-blot obtenido a partir de un gel SDS-PAGE (van Wezel *et al.*, 2007). Sin embargo en estos estudios se utilizaron diferentes medios de cultivo, medio YMG (0.3% Yeast, 0.3% Malt y 1.8% Glucose) y medio mínimo complementado con 1% de glucosa, respectivamente. Al realizar la comparación entre las características de glucosas cinasas de estos microorganismos (Imriskova *et al.*, 2005), se encontró que son muy similares. Los datos de velocidad máxima y K_m observados en la tabla II demuestran que la Glk de *S. coelicolor* presenta mayor eficiencia para realizar la fosforilación de la glucosa. En ambos casos, la Glk está compuesta de cuatro subunidades idénticas de 317 aminoácidos y un tamaño aproximado de 32 kDa cada una.



Tabla II. Propiedades bioquímicas de la glucosa cinasa de *S. coelicolor* y *S. peucetius* var. *caesius*. Tomado y modificado de Imriskova *et al.*, 2005.

Glucosa cinasa		
	<i>S. coelicolor</i>	<i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i>
Temperatura óptima de actividad	33° C	42° C
pH óptimo de actividad	7.6	7.5
Pi	8.4	8.4
V_{max} (nmol/min mg)	1666.7 + 170	1086.7 + 28.6
$K_m^{glucosa}$ (mmol)	1.4 + 0.1	1.6 + 0.2
$K_m^{MgATP^{2-}}$ (mmol)	0.5 + 0.1	0.8 + 0.1

Aún cuando las características de las enzimas Glk de estos microorganismos son muy parecidas, se encontró un dato interesante (Imriskova *et al.*, 2005). La Glk de *S. coelicolor* forma un homotetrámero muy estable en presencia y ausencia de glucosa y, en contraste, la Glk de *S. peucetius* var. *caesius* se encontró como homotetrámero cuya estructura es inestable en ausencia de glucosa, ésta se estabiliza en presencia de glucosa a una concentración de 100 mM (Imriskova *et al.*, 2001). Al ser dos enzimas tan similares, se puede pensar que el mecanismo mediante el cual regulan el proceso de RCC sea el mismo.

A pesar de que aparentemente la Glk es importante en el mecanismo de RCC, aún no se ha esclarecido totalmente su función. Aunque se postule que Glk y GlcP interactúan, esto no ha sido comprobado.

1.8 Detección de interacciones proteína-proteína

El estudio de la interacción entre proteínas se ha vuelto fundamental para entender algunas de las tantas funciones que desempeñan dentro de una célula. Se puede llegar a conocer la función de alguna proteína realizando estudios de interacción proteína-proteína. La función de alguna proteína se puede descubrir si ésta es “capturada” interaccionando con otra proteína de función conocida. Cuando se establece una interacción se pueden medir algunos parámetros que permitan elucidar la función de la proteína en estudio. Algunos de los cambios perceptibles en una interacción proteína-proteína son:

- Modificación de las propiedades cinéticas de las enzimas. Esto puede ser un cambio sutil en el nivel de unión al sustrato o de efecto alostérico.
- Formación de un nuevo sitio de unión, por lo general pequeñas moléculas efectoras.
- Inactivación de la enzima.
- Cambios en la especificidad del sustrato.
- Función como regulador.



Las interacciones proteínicas pueden ser definidas como estables o transitorias, ambas pueden ser fuertes o débiles. Las interacciones estables son aquellas asociadas a la purificación de complejos compuestos por múltiples subunidades. Un ejemplo de ello es la ARN polimerasa y la hemoglobina. Las interacciones transitorias pueden ser rápidas o lentas y controlan la mayoría de los procesos celulares, son temporales en la naturaleza y por lo general requieren de condiciones específicas que promuevan la interacción (Phizicky E y Fields S, 1995).

Tabla III. Métodos de análisis de interacciones proteínicas

Análisis	Método
<i>in vivo</i>	Sistema de doble híbrido
	Reactivos "Crosslinking"
<i>in vitro</i>	Co-inmunoprecipitación (Co-IP)
	Reactivos "Crosslinking"
	Far-western
	Pull-down
	Resonancia de plasmones de superficie

1.9 Métodos de análisis de interacciones proteínicas *in vivo*

Para determinar la interacción de dos o más proteínas es primordial identificar la interacción en condiciones naturales. Esto se puede conocer mediante técnicas de análisis *in vivo*.

1.9.1 Sistema de doble híbrido

El sistema de doble híbrido en levadura usa el proceso de transcripción para hacer predicciones acerca de la interacción entre proteínas (Tabla III). La técnica consiste en la activación de un gen reportero por la acción de un factor transcripcional que se une a la secuencia reguladora UAS (upstream activating sequence), localizada río arriba del sitio de inicio de la transcripción. El factor de transcripción se encuentra dividido en dos fragmentos, uno que reconoce UAS y el otro que promueve la activación de la maquinaria de transcripción. Cada uno de los fragmentos es fusionado a las proteínas cuya interacción se desea analizar. Si las proteínas forman un complejo entre sí, los dos fragmentos del factor de transcripción se encontrarán y el gen reportero será transcrito (Williamson M y Sutcliffe M, 2010).

1.9.2 Reactivos Crosslinking

El "crosslinking" es el proceso de unión química entre dos moléculas mediante un enlace covalente (Tabla III). Los reactivos crosslinking son moléculas que contienen dos extremos reactivos capaces de reaccionar con los grupos funcionales presentes en las proteínas como amina primaria, carboxilo y



sulfhidrido. El reactivo es elegido con base en su reactividad química, especificidad por algún grupo funcional o por alguna otra característica como solubilidad, permeabilidad en membrana, la reversión de la unión o la presencia de grupos foto-reactivos. Esta metodología permite “atrapar” interacciones proteicas estables o transitorias dentro de su ambiente natural. Los nuevos foto-reactivos derivados de aminoácido (L-foto-metionina y L-foto-leucina) pueden ser sustituidos por los aminoácidos intrínsecos de la proteína a analizar. Estas proteínas pueden ser activadas con luz ultravioleta dando lugar a la formación de un enlace covalente con la proteína que se encuentre interaccionando de forma natural. Las proteínas atrapadas en el complejo con el reactivo crosslinking pueden ser detectadas por un decremento en el corrimiento en SDS-PAGE y posteriormente por western-blot (Rehm H, 2006; Tang y Bruce, 2010). Los métodos de análisis de interacciones proteicas *in vitro* se usan comúnmente sólo para confirmar los resultados obtenidos por alguna metodología *in vivo*.

1.10 Co-inmunoprecipitación

El principio de la inmunoprecipitación consiste en que un anticuerpo (monoclonal o policlonal) contra un antígeno específico, forme un complejo con su antígeno en una muestra (como un lisado celular). Después el complejo es capturado en un soporte sólido en el cual la proteína A o la proteína G ha sido inmovilizada (la proteína A o G une al anticuerpo, el cual está unido al antígeno). Se le llama precipitación al proceso de recuperar el complejo formado en la muestra. Las proteínas que no participan en el complejo son eliminadas con lavados del sistema inmovilizado. Finalmente el complejo formado es eluido del soporte y analizado mediante SDS-PAGE y western blot (Phizicky E y Fields S, 1995).

1.11 Pull-down

Consiste en purificación por afinidad, muy similar al método de co-inmunoprecipitación excepto porque la proteína de interés es usada como anzuelo. La proteína de interés es inmovilizada mediante afinidad por una etiqueta (por ejemplo un tallo de histidinas), generando un segundo soporte de afinidad que permita purificar otras proteínas que establezcan una interacción con la proteína inmovilizada. El complejo proteico es eluido y analizado por SDS-PAGE y western-blot (Phizicky E y Fields S, 1995).

1.12 Resonancia de plasmones de superficie

Consiste en inmovilizar la proteína de interés en una placa de metal (oro, plata o paladio). A esta placa se le hace incidir un laser, cuando la luz incide con un ángulo específico, el cual depende de la frecuencia, el grosor de la capa metálica y el índice de refracción del medio que se encuentra inmediatamente sobre la superficie metálica y se mide la luz reflejada. Después se hace pasar el extracto proteico donde se sospecha se encuentran las proteínas que puedan establecer una interacción con la proteína de interés, se lava y se vuelve a hacer incidir el laser. Si se establece una unión proteica se observan cambios en el ángulo de luz reflejada (Phizicky E y Fields S, 1995).



2. ANTECEDENTES

En nuestro grupo de trabajo se ha estudiado el fenómeno de represión por glucosa en la bacteria Gram-positiva *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, el único microorganismo reportado como productor del antitumoral doxorubicina (antraciclina) (Segura *et al.*, 1996; Escalante *et al.*, 1999; Imriskova *et al.*, 2001; Ramos *et al.*, 2004; Imriskova *et al.*, 2005; Guzmán *et al.*, 2005a; Guzmán *et al.*, 2005b). En un medio químicamente definido complementado con 100 mM de glucosa se observó que la síntesis de antraciclinas no era afectada por la presencia de glucosa (Escalante *et al.*, 1999). Sin embargo, en concentraciones mayores, como 495 mM, se observó que la glucosa reprime simultáneamente tanto la síntesis del antitumoral, como la utilización de diversas fuentes de carbono (Segura *et al.*, 1996).

Se aislaron mutantes de *S. peucetius* var. *caesius* resistentes a la 2-desoxiglucosa, las cuales presentaron afectada la represión por glucosa. El análisis de las mutantes mostró afectada la incorporación de dicho azúcar, manteniendo sólo el 30% del transporte con respecto a la cepa original y una deficiencia del 85% en la actividad enzimática de Glk (Escalante *et al.*, 1999). Con el fin de profundizar en el estudio y con base en observaciones realizadas por Angell y col. (1984) en *S. coelicolor*, se buscó la complementación de las mutantes con un plásmido unicopia (pIJ513) que contenía dos ORF's, uno de 1.1 kb que codifica para una proteína de 20.1 kDa con función desconocida y otro de 1.2 kb cuyo producto es la Glk de *S. coelicolor*. Las transformantes revirtieron su fenotipo al de la cepa original, presentando un aumento tanto de la actividad de Glk como del transporte de glucosa y recuperando su sensibilidad a la represión por glucosa. Al igual que para *S. coelicolor*, los resultados anteriores le confieren a la Glk un posible papel regulador en el proceso de RCC en *S. peucetius* var. *caesius*.

Después de purificar la Glk de *S. peucetius* var. *caesius*, la enzima fue caracterizada encontrándose que en su forma nativa está compuesta de cuatro subunidades idénticas de 31 kDa cada una. La enzima pura se disocia a su forma dimérica después de 2 h de almacenamiento a 4° C. Adicionalmente, en presencia de glucosa 100 mM la enzima mantiene su forma tetramérica. Otras fuentes de carbono como fructosa, arabinosa, galactosa o 2-desoxiglucosa no lograron la tetramerización de la enzima (Imriskova *et al.*, 2005). La máxima actividad de Glk se obtuvo a 42°C y pH 7.5. Su pI es 8.4. Asimismo, los estudios cinéticos realizados sugieren que en la fosforilación de la glucosa existe un mecanismo bi bi ordenado en el equilibrio, donde la glucosa entra como primer sustrato, causando así cambios conformacionales y la formación del sitio de unión del segundo sustrato (MgATP²⁻) (Imriskova *et al.*, 2001).

A diferencia de *S. coelicolor* que sólo expresa una glucosa cinasa (GlkA), en un extracto crudo de *S. peucetius* var. *caesius* recientemente se encontraron dos enzimas con actividad de glucosa cinasa, cuya



secuencia reveló que una de ellas es dependiente de ATP (ya reportada) y otra es dependiente de polifosfato. Actualmente, se realiza el estudio de la cinética de expresión de la enzima dependiente de polifosfato evaluando su posible participación en el fenómeno de represión catabólica por glucosa.



3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La glucosa cinasa forma parte del sistema de regulación en el proceso de represión por carbono en *Streptomyces*. Se sabe que no presenta dominios de unión a ADN y que la Glk de *S. coelicolor* interacciona con otras proteínas. Entonces, ¿qué pasa con la glucosa cinasa de *S. peucetius* var. *caesius*?, ¿se unirá a otras proteínas para ejercer la RCC en este microorganismo?

Con este trabajo se pretende evaluar la posible interacción de Glk de *S. peucetius* var. *caesius* con otras proteínas de este microorganismo.

4. HIPÓTESIS

Al carecer de dominios de unión al ADN, la Glk de *S. peucetius* var. *caesius* deberá ejercer su efecto en el proceso de represión catabólica mediante interacción proteína-proteína.

5. OBJETIVO GENERAL

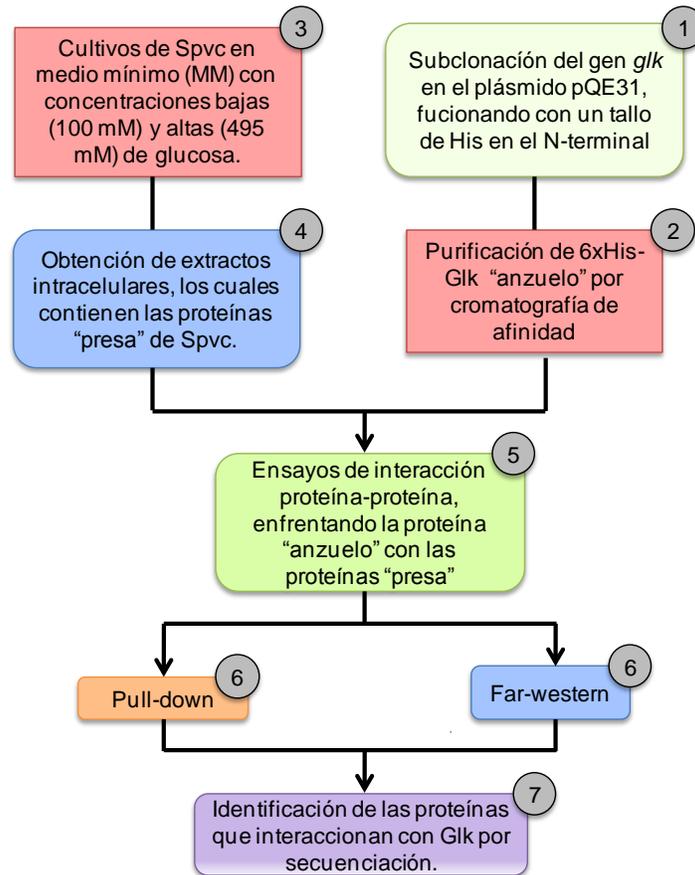
Encontrar las proteínas capaces de establecer interacción con la glucosa cinasa de *S. peucetius* var. *caesius* y tratar de elucidar el mecanismo mediante el cual esta proteína ejerce su efecto en el proceso de represión catabólica.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Subclonar, expresar y purificar la proteína recombinante 6xHis-Glk de *S. peucetius* var. *caesius*.
2. Realizar el ensayo de interacción proteína-proteína por pull-down y far-western.
3. Identificar por secuenciación las proteínas que se hayan unido a Glk.



6. DIAGRAMA DE TRABAJO



7. METODOLOGÍA

En 2005 Mascareñas obtuvo la secuencia de *glk* clonándola por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir del ADN genómico de *Streptomyces peucetius* variedad *caesius*. La secuencia obtenida fue clonada en el plásmido pGEM-T Easy (Promega). A partir de esta construcción, *glk* fue subclonada en el plásmido de expresión pBAD/HisB (Invitrogen). Una vez que se obtuvo la construcción en marco de lectura, se realizaron varios ensayos buscando las condiciones óptimas de expresión de la proteína de fusión. Sin embargo, el rendimiento fue muy bajo, por lo cual se decidió realizar una serie de mutaciones puntuales para cambiar algunas bases nitrogenadas favoreciendo el uso de codones para *E. coli*. El resultado no mejoró el rendimiento en la expresión de la proteína de fusión por lo que se cambió el plásmido de expresión. El gen *glk* fue subclonado en el plásmido pQE31 (Qiagen) (Figura 5). Se buscaron las condiciones óptimas de expresión y purificación de la proteína para que finalmente se realizaran los ensayos de interacción proteína-proteína pull-down y far-western.

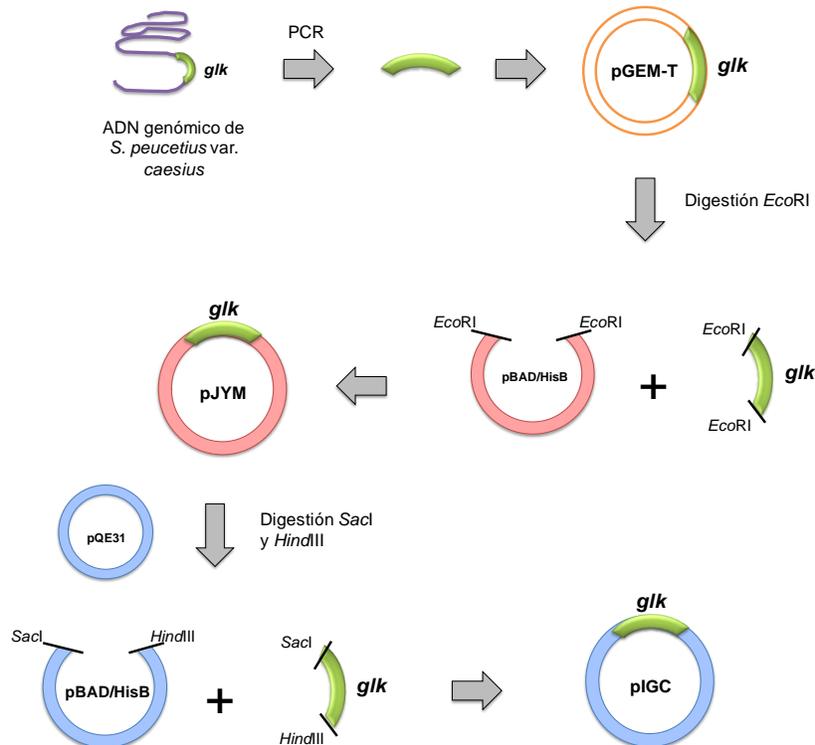


Figura 5. Subclonación del gen *glk* de *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. Se obtuvo *glk* por medio de PCR a partir de ADN genómico de *S. peucetius* var. *caesius*, éste fue clonado en pGEM-T. Se extrajo *glk* de la construcción pGEM-T-*glk* realizando la digestión con la enzima de restricción EcoRI. El gen fue insertado en el plásmido pBAD/HisB, la construcción obtenida fue llamada pJYM. Posteriormente se obtuvo *glk* a partir de pJYM con las enzimas de restricción SacI y HindIII y fue clonado en el plásmido pQE31, la construcción obtenida fue llamada pIGC.



7.1 Construcción de la proteína de fusión 6xHis-Glk

7.1.1 Subclonación de *glk*

Se partió de la secuencia de *glk* clonada en pGEM-T Easy en la cepa de *E. coli* DH5 α para subclonar dicho gen en el plásmido de expresión pBAD/HisB (Anexo I), el cual se encuentra sujeto a la regulación por el operón de arabinosa.

7.1.2 Extracción de plásmido a mediana escala (Midiprep)

Se inoculó con 10 μ L de la cepa *E. coli* DH5 α conservada en glicerol a -20°C, la cual contenía el plásmido pGEM-T Easy-*glk*, en 50 mL de medio líquido Luria-Bertani (LB, 1% bacto-triptona, 0.5% extracto de levadura, 1% NaCl) con ampicilina (100 μ g/mL) contenidos en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Se incubó 12 h a 37°C en agitación (200 rpm), las células fueron recuperadas por centrifugación a 10,000 rpm por 15 min a 4°C. El paquete celular obtenido se resuspendió en 6 mL de Solución I (5 mM sacarosa, 10 mM ácido etilendiaminotetraacético EDTA, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0). Después se adicionaron 12 mL de Solución II (0.2 M NaOH, 1% dodecilsulfato de sodio SDS) a la suspensión, ésta se homogenizó invirtiendo los tubos. Posteriormente se adicionaron 10 mL de Solución III fría (3 M acetato de potasio, pH 5.0) y la muestra, se mezcló invirtiendo los tubos, los cuales se colocaron en reposo a 4°C durante 10 min. Para eliminar el precipitado formado, los tubos se centrifugaron a 13,000 rpm por 10 min a 4°C, el sobrenadante fue transferido, dividiendo el volumen total, en dos tubos estériles. A cada tubo se le añadieron 15 mL de isopropanol frío, se agitaron y se incubaron a -20°C durante 1 h, para después centrifugarlos a 13,000 rpm por 30 min a 4°C y eliminar el sobrenadante de los mismos. El botón formado fue lavado con 15 mL de etanol frío al 70%. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 13,000 rpm por 10 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante. El botón fue incubado a 50°C hasta la eliminación total del etanol. El material genético fue resuspendido en 500 μ L de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) y se le adicionó RNasa (50 μ g/mL), se incubó a 37°C durante 1.5 h. La mezcla de ADN y enzima fue tratada con 500 μ L de solución fenol:cloroformo (1:1), se mezcló invirtiendo los tubos, y se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min. A la fase acuosa se le adicionó 700 μ L de isopropanol frío y 0.1 volumen de NaCl 1M, se incubó a -20°C durante 1 h, se centrifugó bajo las mismas condiciones que el paso anterior. El botón formado fue lavado con 750 μ L de etanol al 70% y se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min a 4°C. El botón fue incubado a 50°C hasta la evaporación total del etanol (Mascareñas, 2005). El material genético obtenido fue resuspendido en 40 μ L de agua bidestilada estéril. De la misma forma se aisló el plásmido pBAD/HisB a partir de la cepa de *E. coli* BL-21.

7.1.3 Digestión enzimática de pGEM-T Easy-*glk* y pBAD/HisB

Para obtener el fragmento que contiene al gen *glk*, se realizó la digestión enzimática del plásmido pGEM-T Easy-*glk* con la enzima de restricción *Eco*RI bajo las condiciones que se describen a continuación: 50



μL de plásmido pGEM-T Easy-*gfk* (0.28 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 7 μL de solución amortiguadora 10x *EcoRI* (Promega), 7 μL de enzima *EcoRI* (Promega) y 6 μL de H_2O bidestilada estéril. La reacción se incubó a 37°C durante 1 h. Al mismo tiempo, se linearizó el plásmido pBAD/HisB empleando los siguientes reactivos: 150 μL de plásmido pBAD/HisB (0.28 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 21 μL de solución amortiguadora 10x *EcoRI*, 21 μL de enzima *EcoRI* y 18 μL de H_2O bidestilada estéril, la mezcla de reacción se incubó bajo las mismas condiciones anteriormente descritas.

7.1.4 Purificación de ADN a partir de gel de agarosa

En un gel preparativo de agarosa al 0.8% se corrieron los productos obtenidos de la digestión enzimática descrita en el punto anterior. Una vez que se identificaron las bandas correspondientes al tamaño esperado, 954 pb para *gfk* y 4100 pb para pBAD/HisB, se realizó la extracción del material genético a partir del gel. Para ello, se cortó la fracción del gel que contenía cada banda, se colocó en columnas de vidrio montadas en microtubos de 500 μL , se centrifugaron tres veces a 3,000 rpm durante 30 s. Se extrajo la fase acuosa dos veces con solución fenol:cloroformo (1:1) y dos veces más con solución de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Para precipitar el ADN, se adicionó 0.1 volumen de NaCl 1 M y 2 volúmenes de etanol absoluto, se agitó y se dejó en reposo a -20°C durante 30 min. Se centrifugó a 13,000 rpm por 30 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante, el ADN precipitado fue lavado con etanol al 70%, se repitió el paso de centrifugación para eliminar el sobrenadante, se incubó a 50°C hasta la total eliminación del etanol y finalmente el botón obtenido fue resuspendido en 20 μL de H_2O bidestilada estéril (Mascareñas, 2005).

7.1.5 Desfosforilación pBAD/HisB

Una vez que se obtuvo el plásmido linearizado, se realizó la remoción del grupo fosfato del extremo 5' usando la enzima fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP, Invitrogen). Para ello se empleó la siguiente metodología: se incubó a 37°C durante 30 min la mezcla de 10 μL de plásmido, 5 μL de solución amortiguadora 10x CIAP (Invitrogen), 7.2 μL de enzima fosfatasa alcalina, 27.8 μL de H_2O bidestilada y estéril. Concluido el proceso, la enzima fosfatasa alcalina fue inactivada a 65°C durante 15 min, posteriormente se llevó a un volumen final de 500 μL con H_2O bidestilada estéril. Se adicionó 500 μL de solución de fenol:cloroformo (1:1), se mezcló invirtiendo el tubo, se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min, la fase acuosa fue transferida a un tubo limpio. Para precipitar el plásmido lineal y desfosforilado, se adicionó 50 μL de NaCl 1 M y 1 mL de etanol absoluto, se agitó, se incubó a -20°C durante 30 min, se centrifugó a 13,000 rpm por 15 min, se eliminó el sobrenadante y se incubó a 50°C hasta la total eliminación del sobrenadante, finalmente el botón obtenido se resuspendió en 20 μL de H_2O bidestilada estéril.



7.1.6 Ligación de los fragmentos *gfk* y pBAD/HisB

Para ligar los fragmentos de *gfk* y pBAD/HisB se mezclaron 8 μ L del gen *gfk* purificado, 8 μ L del vector pBAD/HisB desfosforilado, 2 μ L de solución amortiguadora de ligación 10x (Promega) y 2 μ L de enzima T4 ADN ligasa (Promega). La mezcla anterior se incubó a 16°C durante 1 h. Para verificar que la ligación se llevó a cabo de forma exitosa, se corrieron 5 μ L de la muestra ligada y 5 μ L de la construcción digerida con la enzima *EcoR1* en un gel de agarosa al 0.8%.

7.1.7 Transformación de células de *E. coli* TOP10

Se usó la construcción pBAD/HisB-*gfk* para transformar células de *E. coli*-TOP10 por electroporación. Las células electrocompetentes fueron transferidas de -70°C a un baño de hielo hasta lograr que éstas se descongelaran. Se mezcló 2 μ L del plásmido con las células de *E. coli*, se dejó en reposo en baño de hielo durante 2 min, la mezcla fue transferida a una celda de electroporación de 0.1 cm y se le aplicó un pulso constante de 5 ms de 1.25 kV/cm (Electroporador, PEP Personal Electroporation Pak ECM 399 de BTX). Se agregó a la celda 950 μ L de medio LB adicionado con glucosa al 1%. Esta mezcla se transfirió a un microtubo de 1500 μ L y se incubó con agitación a 37°C durante 1 h. Las células transformadas se sembraron en placas de agar LB con ampicilina (100 μ g/mL) y se incubaron a 37°C por 18 h. De las clonas resistentes se eligieron 5, las cuales se aislaron y cultivaron en 5 mL de medio LB con ampicilina (100 μ g/mL), y se sembraron en placa con el mismo medio en sólido. Después de 18 h de incubación, a partir del medio líquido se adicionaron 10 μ L a 50 mL de medio LB con ampicilina, para realizar la extracción del plásmido a partir de estos cultivos, los cuales fueron cosechados bajo las condiciones descritas en el punto 1.1. El plásmido obtenido de cada clona se envió para su secuenciación a los laboratorios Laragen Sequencing & Genotyping, Los Ángeles, CA, para corroborar que el gen se encontrara en fase. Una vez que se obtuvo la clona con el gen *gfk* se procedió a buscar las condiciones de cultivo para obtener la expresión de la proteína de fusión.

7.2 Expresión de la proteína de fusión 6xHis-Gfk en pBAD/HisB

7.2.1 Pre-inóculo

Se inoculó con 5 μ L de la clona TOP10 pBAD/HisB-*gfk* de reserva (conservada a -20°C en glicerol al 30%) un tubo de 10 ml con 5 mL de medio LB con ampicilina (100 μ g/mL). Se incubó 12 h a 37°C en agitación (200 rpm).

7.2.2 Inóculo

Se tomó una alícuota de 500 μ L del preinóculo para sembrar un tubo de 10 ml con 5 mL del mismo medio con antibiótico. Se incubó a 37°C a 200 rpm hasta obtener un valor de densidad óptica a 600 nm (D.O._{600nm}) de 0.5 – 1.0 (Espectrofotómetro, Spectronic 21D de Spectronic Instruments). Alcanzado dicho



valor se adicionó L-arabinosa como inductor en concentración final de 0, 0.00133, 0.0133, 0.133, 1.33 y 13.3 mM. Se incubó bajo las mismas condiciones durante 4 h. Se tomó una alícuota de 100 μ L del cultivo para el análisis de la proteína de fusión por western blot.

7.2.3 Detección de la proteína de fusión 6xHis-Glk por western blot

De las muestras del cultivo celular se eliminó el sobrenadante después de centrifugar a 8,000 rpm durante 10 min, el botón obtenido fue resuspendido con 100 μ L de solución PBS (137 mM NaCl, 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, pH 7.0), después se adicionó 100 μ L de solución de carga 4x (62 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% glicerol, 2% SDS, 5% 2- β -mercaptoetanol, 0.05% azul de bromofenol) agitando vigorosamente y posteriormente la muestra se llevó a ebullición durante 5 min. De cada una de estas muestras se colocó 15 μ L en un gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE; Laemmli, 1970). Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana PVDF (Immobilon P, Millipore) previamente activada en metanol durante 30 en una celda de transferencia de electroforesis (Mini Trans-Blot, Biorad-170-3930) a 60 V por 90 min, usando solución de transferencia (200 mM glicina, 25 mM Tris, 10% metanol). Posteriormente la membrana se incubó en solución TBS (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5, 0.05% Tween 20) con 3% de leche descremada (Difco) a temperatura ambiente durante 1 h en agitación rotatoria. Concluido el tiempo, la membrana se lavó dos veces con solución TBS 1x en agitación durante 30 s cada lavado. Después se incubó con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-6xHis (GeneTex) en una concentración de 1:5000, en agitación a temperatura ambiente durante 1 h. Se recuperó la solución del anticuerpo y se lavó la membrana dos veces con solución TBS 1x en agitación durante 30 s. Se incubó bajo las mismas condiciones el anticuerpo anti-ratón acoplado a fosfatasa alcalina (Zymed) en concentración 1:5000. Se lavó la membrana dos veces con la solución TBS 1x 30 s cada vez, y finalmente fue revelada con el sustrato cromógeno 5-bromo-4-cloro-3-indoxil fosfato y el cloruro de nitro-azul de tetrazolio (BCIP/NBT) de PerkinElmer Life Sciences y la reacción se detuvo con agua destilada.

7.3 Mutagénesis dirigida

Para aumentar la expresión de la proteína de fusión se realizó el cambio de algunas bases nitrogenadas por medio de mutagénesis dirigida, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en un termociclador Gene Amp PCR System 2400. Se revisó el uso de codones preferenciales para *E. coli* y para *Streptomyces* encontrándose que éste es diferente. En la secuencia de *glk* se encontraron algunos codones de bajo uso para *E. coli*, 14 codones que codifican para Arg, 4 codones para Gly, 4 para Pro, 2 para Leu, y 1 para Ile, Thr, y Ser (Fig. 6). Se decidió entonces realizar el cambio de algunos nucleótidos con la finalidad de dar codones de mayor uso para *E. coli*. Se cambio aquellos que se encontraban al inicio de la secuencia para facilitar el proceso de traducción, aquellos que se encontraban próximos entre



sí para poder hacer el cambio de nucleótidos en un solo proceso de mutación y de 5 tripletes que se modificaron, 3 corresponden a aquellos que codifican para Arg, los que presentan menor frecuencia de uso por *E. coli*.



Figura 6. Comparación en el uso de codones entre *E. coli* y *Streptomyces*. Secuencia de nucleótidos de *glk* clonado en el plásmido pBAD/HisB. Sombreado en gris se muestran los tripletes que presentan un valor menor a 1% del uso por *E. coli*. Debajo de cada triplete sombreado se indica el aminoácido para el cuál codifican. Mediante mutagénesis dirigida se realizó el cambio de algunos nucleótidos para cambiar a tripletes de mayor uso para *E. coli*, el cambio está marcado en rosa. La primera ronda de mutación está marcada con una línea roja, la segunda ronda está marcada con color azul y la tercera ronda está marcada en verde.



Para ello, se realizó la extracción del plásmido pJYM a partir de la cepa de *E. coli*-TOP10. Para obtener la mutación se siguió el protocolo descrito en el manual de QuikChange II de Stratagene. Se realizaron dos rondas de mutación empleando dos pares de cebadores, los cuales se encuentran descritos a continuación:

Primera ronda de mutación:

Directo, 39 nucleótidos (5'-CCGAGCTCGCGTTCTGCAGCTGGTACCATCTGGGGAATTC)

Reverso, 39 nucleótidos (5'-GAATTCCCAGATGGTACCAGCTGCAGAAACGCGAGCTCGG),

Segunda ronda de mutación:

Directo, 39 nucleótidos (5'-GGGAATTCGATTACTCTCGCACCTATGGTCTGACCATCG)

Reverso, 39 nucleótidos (5'-CGATGGTCAGACCATAGGTGCGAGAGTAATCGAATTCCC),

Tercera ronda de mutación:

Directo, 39 nucleótidos (5'-GCCGTCGAGGGTGCCCGTGCCGGGCACGAGATCGTCGGC)

Reverso, 39 nucleótidos (5'-GCCGACGATCTCGTGCCCGGCACGGGCACCTCGACGGC).

La reacción de PCR se llevó a cabo bajo las condiciones descritas en la figura 7.

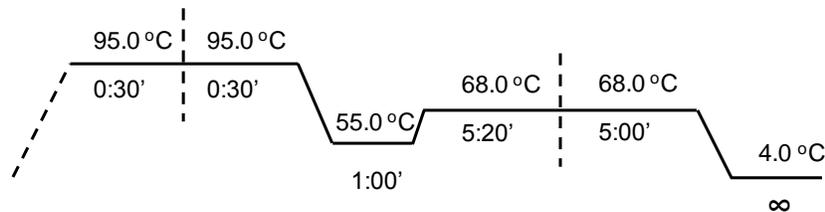


Figura 7. Condiciones de temperatura para realizar el PCR. Se realizaron 18 ciclos los cuales consistían en: la desnaturalización de las cadenas molde de ADN a 95° C durante 1 min, el alineamiento de las cadenas simples con los cebadores a 55° C durante 1 min y la elongación de las cadenas a 68° C por 5 min y 20 s y un segundo periodo de elongación a 68° C durante 5 min.

Una vez que se obtuvo el plásmido con las mutaciones requeridas, se usó para transformar células de *E. coli*-TOP10 y la mutación se corroboró por secuenciación. De las clonas que presentaron la secuencia correcta, se eligió una para evaluar la expresión de la proteína de fusión.

7.4 Subclonación de *gIk* en pQE31

Debido al bajo rendimiento en la expresión de *gIk* con el plásmido pBAD/HisB, se decidió cambiar al plásmido de expresión pQE31. Se partió de la cepa *E. coli* TOP10 que contenía la construcción en



pBAD/HisB-*glk* para realizar la extracción de plásmido. Al mismo tiempo se realizó la extracción del plásmido pQE31 de la cepa de *E. coli* BL-21. Las enzimas de restricción que permitieron extraer *glk* de pBAD/HisB e insertarlo en pQE31 fueron *SacI* y *HindIII*. Las condiciones de digestión de ambos plásmidos se muestran en la tabla IV.

Tabla IV. Condiciones de restricción para pBAD/HisB-*glk* y pQE31.

	pBAD/HisB- <i>glk</i>	pQE31
Plásmido (0.28 µg/µL)	50.0 µL	150.0 µL
Solución amortiguadora Tango 10x (Fermentas)	7.0 µL	21.0 µL
Enzima <i>SacI</i> (Fermentas)	3.5 µL	10.5 µL
Enzima <i>HindIII</i> (Fermentas)	3.5 µL	10.5 µL
H₂O destilada estéril	6.0 µL	18.0 µL

Posteriormente se realizó la purificación de las bandas correspondientes al peso esperado, 954 pb para *glk* y 3400 pb para pQE31 a partir de un gel preparativo. Se realizó la ligación con los fragmentos de ADN puros, se mezclaron 10 µL del gen *glk*, 10 µL del vector pQE31, 3 µL de solución amortiguadora de ligación 10x (Promega), 2 µL de enzima T4 ADN ligasa (Promega) y 5 µL de H₂O destilada. Se incubó a 16°C durante 1 h. Para verificar que la ligación se llevó a cabo de forma exitosa, las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 0.8%: 5 µL del plásmido digerido y 5 µL de la muestra ligada. Posteriormente se realizó la transformación de las células *E. coli* M15 con la construcción obtenida (pQE31-*glk*), en esta ocasión el medio de cultivo usado para la selección de las clonas contenía como antibióticos ampicilina (100 µg/mL) y kanamicina (25 µg/mL), ya que la cepa de *E. coli* M15 contiene el plásmido pREP4 que codifica para el represor *lac* en *trans* y para la resistencia a kanamicina, el cual otorga a la cepa un mayor control en la expresión de la proteína que está bajo el control del operón de lactosa. De las clonas que adquirieron el plásmido, se eligieron 9 para realizar los ensayos de expresión. De las clonas que presentaron expresión de la proteína con el tamaño esperado (~40KDa) y señal en el western blot detectadas por medio del anticuerpo anti-His, la proteína de fusión tiene una tallo de histidinas en el extremo N-terminal. Se aisló plásmido y se secuenció para verificar la secuencia de nucleótidos.

7.5 Expresión de la proteína de fusión 6xHis-Glk en pQE31

7.5.1 Pre-inóculo

Del crecimiento de *E. coli* en LB sólido, se tomó una muestra por picadura de las 9 clonas seleccionadas y se inoculó cada una en 5 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) y kanamicina (25 µg/mL). Las células se incubaron durante 12 h a 37°C con agitación (200 rpm).



7.5.2 Inóculo

Se tomó una alícuota de 500 μ L del preinóculo para sembrar en un tubo estéril con 5 mL de LB más antibióticos. El preinóculo se incubó a 37°C y 200 rpm hasta obtener un valor de D.O._{600nm} de 0.5 – 1.0. Después de alcanzar dicho valor, se agregó 1 mM de IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) como inductor de la síntesis de 6xHis-Glk y el cultivo se incubó bajo las mismas condiciones durante 4 h más. De ésta condición se tomó una alícuota de 100 μ L del cultivo para el análisis de la proteína de fusión por western blot.

7.6 Purificación de 6xHis-Glk

7.6.1 Lisis celular por sonicación

Se realizó una fermentación en matraces tipo Fernbach conteniendo 1 L de medio LB adicionando 100 mL de preinóculo (células de *E. coli* M15 pQE31-*glk*). Después de dejarlas crecer durante 12 h a 37 °C el paquete celular fue colectado por centrifugación (10,000 rpm, 10 min) y después de eliminar el sobrenadante, las células fueron resuspendidas en 5 mL de solución de lisis (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl, 100 mM glucosa, 1:5000 inhibidor de proteasas cocktail de SIGMA). Bajo estas condiciones, las células fueron lisadas por sonicación (tres pulsos de 10 s a 60 W, con 1 min de reposo entre cada pulso a 0°C). La suspensión resultante se centrifugó a 10,000 rpm por 30 min para separar el sobrenadante y el botón fue resuspendido en 5 mL de solución de lisis. El proceso de sonicación y centrifugación fue repetido una vez más y posteriormente se juntaron los sobrenadantes que fueron almacenados a 4°C.

7.6.2 Purificación de 6xHis-Glk por cromatografía de afinidad

El proceso de purificación consistió en pasar 350 mL del sobrenadante obtenido en la sección 6.1 por una columna de 5 mL con sefarosa niquelada (His-tagged Protein Purification, GE Healthcare), la cual permite la interacción del Ni²⁺ con el tallo de histidinas que presenta la proteína de fusión. La purificación se realizó conectando la columna a un equipo de separación FPLC (ÄKTA PRIME, Amersham Biosciences) siguiendo el protocolo del proveedor. Se lavó la columna con 5 volúmenes (25 mL) de agua destilada, se equilibró con 5 volúmenes de solución de unión (20 mM Na₂HPO₄, 500 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 7.4) con flujo de 1.5 mL/min. Una vez que se tuvo la columna equilibrada, se pasaron 350 mL del extracto proteínico que contenía 10 mM de imidazol, a un flujo de 1.0 mL/min. Después se realizó el lavado de la columna para eliminar las proteínas contaminantes pasando una solución de unión al mismo flujo hasta obtener un valor de absorbancia (280 nm) constante y cercano a cero. Posteriormente se realizó un gradiente de 10-500 mM de imidazol. El gradiente se formó en la solución de elución en un volumen total de 100 mL con flujo de 1 mL/min. Se colectaron fracciones de 1.0 y 1.5 mL en cuanto se observó un aumento en la absorbancia y hasta el término del gradiente. Después de ello se pasó a través de la



columna en forma manual, 15 mL de solución de elución II (20 mM Na₂HPO₄, 500 mM NaCl, 500 mM imidazol, pH 7.4), se colectaron 3 fracciones de 5 mL cada una. Las fracciones obtenidas fueron analizadas por medio de SDS-PAGE y western blot.

Una vez que se detectaron las fracciones conteniendo la proteína 6xHis-Glk pura, éstas fueron dializadas contra una solución que contenía 20 mM Na₂HPO₄ y pH 7.4, 100 mM glucosa a 4°C bajo agitación constante durante toda la noche. Concluido el proceso de diálisis, se midió actividad de glucosa cinasa en cada fracción obtenida.

7.7 Determinación de actividad enzimática de glucosa cinasa

La actividad de glucosa cinasa, se midió en una reacción acoplada con la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) en la que se mide la reducción simultánea del NADP⁺ a 340 nm ($\epsilon=6.22 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) (Fig. 8).

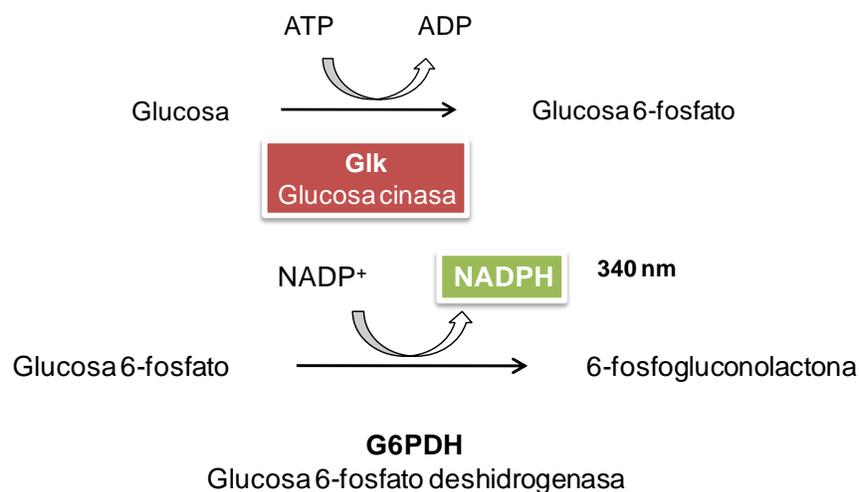


Figura 8. Reacción acoplada para medir la glucosa cinasa.

La mezcla de reacción contenía: Reactivo A (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM NADP, 1 mM ATP), 10 mM D-glucosa y 0.7 U/mL de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa. Posteriormente se adicionaron los reactivos en el orden descrito en la tabla V.



Tabla V. Mezcla de reacción para determinación de glucosa cinasa.

	Reactivo A (μL)	H ₂ O (μL)	Glucosa (μL)	Extracto enzimático (μL)	G6PDH (μL)
Blanco	—	1950	—	50	—
Blanco de reactivos	1746	200	—	50	4
Muestra	1746	—	200	50	4

El reactivo A se preparó justo antes de realizar el ensayo, se distribuyó en tubos de ensayo los cuales se incubaron en baño de agua a 42°C. Se adicionó el resto de los reactivos y la reacción comenzó en el momento que se adicionó la G6PDH. Se tomaron lecturas de absorbancia a $\lambda=340$ nm a los 20, 40, 60, 80, 100 y 120 s, después de iniciada la reacción. Una unidad enzimática (U) fue definida como la cantidad de glucosa cinasa que produce 1 nmol de NADPH $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína (Segura *et al.*, 1996).

7.8 Ensayo de interacción proteína-proteína por pull-down

7.8.1 Inmovilización de 6xHis-Glk

La proteína de fusión 6xHis-Glk purificada fue inmovilizada en la resina de sefarosa niquelada (Ni Sepharose High Performace, GE Healthcare). Para ello se colocaron 6 mL de sefarosa en un tubo de 50 mL y después se centrifugaron a 6,500 rpm por 5 min: Se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 5 volúmenes (25 mL) de agua destilada. Lo anterior se colocó en agitación suave durante 5 min, repitiendo el proceso de centrifugación y eliminación del sobrenadante. Para equilibrar la resina se adicionaron 5 volúmenes de solución de unión (20 mM Na₂HPO₄, 500 mM NaCl y 10 mM imidazol, pH 7.4) y se agitó suavemente durante 5 min, repitiendo el proceso de centrifugación y eliminación del sobrenadante. Se adicionaron 30 mL de la solución (conteniendo 12 mg de proteína total 6xHis-Glk) y se agitó de forma suave durante toda la noche a 4°C para después centrifugar y separar el sobrenadante. Para corroborar que la proteína se unió a la resina, se tomó una alícuota de 20 μL de la resina cargada, se adicionaron 30 μL de solución de carga SDS 4X, y se analizó por SDS-PAGE. La proteína unida a la sefarosa se utilizó como la proteína “carnada” para el análisis de interacción proteína-proteína pull-down.

7.8.2 Extractos proteínicos de *Streptomyces peucetius* variedad *caesius*

Se realizó una fermentación de *S. peucetius* var. *caesius* en medio mínimo (NDM, 10 mM NaNO₃, 0.8 mM K₂HPO₄·3H₂O, 0.5 mM MgSO₄·7H₂O, 0.2% extracto de levadura, pH 7.3) y en medio complejo (YM, 0.4% extracto de levadura, 1% extracto de malta) suplementado con glucosa 100 y 495 mM. (Guzmán *et al.*, 2005a)



7.8.3 Pre-inóculo de *Streptomyces peucetius* variedad *caesius*

Se inoculó 1 mL de la cepa conservada en glicerol a un matraz de 250 mL con deflectores que contenía 50 mL de medio NDM, y otro con 50 mL de medio YM, ambos suplementados con 0.4% de glucosa. Se incubaron a 29°C, 180 rpm durante 48 h. Las células se recuperaron en condiciones estériles, centrifugando a 10,000 rpm por 15 min. El botón fue lavado 2 veces con 50 mL de solución salina estéril (0.75% NaCl) y fue resuspendido en 5 mL de la misma solución salina.

7.8.4 Inóculo de *Streptomyces peucetius* variedad *caesius*

Se inoculó 1 mL del preinóculo en matraces de 250-mL bafleados que contenían 50 mL de medio NDM y YM suplementados con 100 y 495 mM de glucosa. Se incubaron a 29°C, 180 rpm. Para el NDM, se tomó muestra por duplicado de cada condición en los tiempos de fermentación de 0, 2, 7, 12, 24, 32 y 48 h. Para el medio YM, se tomó muestra a tiempos de fermentación de 7 y 96 h. Se recuperó la masa celular centrifugando a 10,000 rpm por 15 min. Se eliminó el sobrenadante y el botón celular fue congelado a -30°C.

7.8.5 Lisis celular

La masa celular se resuspendió con 1 mL de solución de lisis Spvc (PBS, 100 mM glucosa, 1:5000 inhibidor de proteasas cocktail de SIGMA). Las células se lisaron por sonicación (ocho pulsos de 30 s a 60 W, dando un reposo de 1 min entre cada pulso) a 4°C. La mezcla se centrifugó a 13,000 rpm por 30 min, a 4°C, para obtener la fracción soluble en el sobrenadante. Se determinó la proteína total en cada fracción empleando el método de Bradford (1976) usando el reactivo comercial (Bio-Rad) y albúmina sérica bovina como estándar de proteína. El extracto proteico fue utilizado como la fuente de proteína “presa” para realizar el ensayo de pull-down y far-western.

7.8.6 Pull-Down

La interacción proteína-proteína se llevó a cabo con la enzima 6xHis-Glk inmovilizada en la resina de sefarosa “anzuelo” y el extracto proteínico de *S. peucetius* var. *caesius* “presa”. Se transfirió 200 µL de la 6xHis-Glk inmovilizada en sefarosa (2 mg de proteína/mL), a microtubos de 1.5 mL. En cada microtubo se adicionaron 600 µL de cada extracto proteínico obtenido de la fermentación de *S. peucetius* var. *caesius* en medio mínimo y medio complejo. Para permitir que la interacción proteína-proteína se llevara a cabo, se incubaron los tubos en agitación suave durante toda la noche a 4°C. Se centrifugaron a 5,000 rpm por 1 min, se eliminaron los sobrenadantes. Se realizaron 3 lavados de 600 µL con solución de unión, con agitación suave, se centrifugaron y se eliminaron los sobrenadantes. Se tomaron 30 µL de la resina, se resuspendieron en 30 µL de solución de carga SDS 4x, y se analizó por SDS-PAGE. En la figura 9 se describe un ejemplo de cómo se debe realizar el análisis de la metodología pull-down.



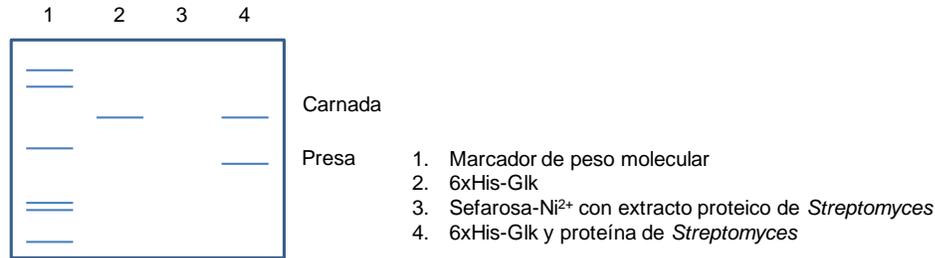


Figura 9. Análisis de pull-down.

Para realizar el análisis del pull-down se emplearon geles SDS-PAGE al 10% donde se analizó cada uno de los extractos obtenidos en los diferentes tiempos del cultivo evaluados con sus respectivos controles. Se analiza la matriz en la que fue inmovilizada la proteína “anzuelo” para corroborar que esté limpia de proteínas. Después se analiza la matriz que ya tiene unida la proteína “anzuelo” para verificar que sólo contenga esta proteína. También la matriz sin Glk que fue enfrentada al extracto citosólico que contiene las proteínas “presa” para evaluar la posibilidad de unión inespecífica de alguna proteína a la matriz. Finalmente, la matriz que tiene inmovilizada a la Glk y por la cual se hizo pasar el extracto citosólico que contiene las proteínas “presa”, si hay una interacción entre estas proteínas se espera observar una banda de diferente tamaño a Glk además de ésta o un aumento en el tamaño del corrimiento de Glk. Posteriormente para su identificación deberán ser secuenciadas.

7.9 Far-western

Para realizar la metodología de far-western, se emplearon los extractos proteínicos que contienen a la proteína “presa” obtenidos de *S. peucetius* var. *caesius* y la enzima 6xHis-Glk purificada. Se corrieron 15 µg de los extractos de la proteína “presa” en geles de poliacrilamida, desnaturalizantes y no desnaturalizantes (nativos). Las proteínas fueron transferidas a una membrana PVDF (Immobilon P, Millipore) previamente activada en metanol durante 30 en una celda de transferencia de electroforesis (Mini Trans-Blot, Biorad-170-3930) a 60 V por 90 min, usando solución de transferencia (200 mM glicina, 25 mM Tris, 10% metanol). Posteriormente la membrana se incubó en solución TBS (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5, 0.05% Tween 20) con 3% de leche descremada (Difco) a temperatura ambiente durante 1 h en agitación rotatoria. Concluido el tiempo, la membrana fue lavada dos veces con solución TBS 1x en agitación durante 30 s cada lavado. Posteriormente, ésta fue colocada en incubación sumergida en 15 mL de solución (100 mM Tris-HCl, pH 7.5) que contenía 2 mg totales de 6xHis-Glk. Para realizar el enfrentamiento entre la proteína “anzuelo” y la “presa” se incubó en agitación suave a temperatura ambiente durante 12 h. Se recuperó la proteína “anzuelo” que no se unió en la membrana. Ésta fue lavada con 25 mL de TBS 1x en agitación muy suave durante 30 s. Después la membrana fue incubada con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-6xHis (GeneTex) en una concentración de 1:5000,



en agitación suave a temperatura ambiente durante 2 h. Se recuperó la solución del anticuerpo y se lavó la membrana con solución TBS 1x en agitación durante 30 s. Se incubó 1 h bajo las mismas condiciones con el anticuerpo anti-ratón acoplado a fosfatasa alcalina (Zymed) en concentración 1:5000. Se lavó con TBS 1x, en agitación por 30 s y finalmente fue revelada con el sustrato cromógeno BCIP/NBT, la reacción fue detenida con agua destilada.

Se repitió el ensayo modificando la temperatura de incubación de la membrana con la proteína “presa” a 4°C. Posteriormente, se realizó la metodología de far-western variando las condiciones de incubación donde se enfrentaron las proteínas “presa” con la proteína “anzuelo” en presencia de los sustratos de la Glk (5 mM MgCl₂, 1 mM ATP y 10 mM D-glucosa en 100 mM Tris-HCl, pH 7.5). Se realizó el experimento tres veces para cada condición de incubación evaluada.



8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvo el gen *glk* de *S. peuceitius* var. *caesius* a partir de la construcción pGEM-T-easy-*glk* (Mascareñas, 2005). Se usó el plásmido de pBAD para conseguir la proteína de fusión Glk con un tallo de histidinas en el N-terminal el cual facilitaría la identificación y purificación de la proteína. Se realizó un análisis *in silico* en el que se observó que al extraer *glk* del plásmido pGEM-T empleando la enzima de restricción *EcoRI*, se podía obtener el gen en fase al clonarlo en el plásmido B del sistema pBAD. El gen *glk* fue subclonado en el vector pBAD/HisB (Anexo I) usando el sitio de corte de la enzima *EcoRI* (Figura 10).

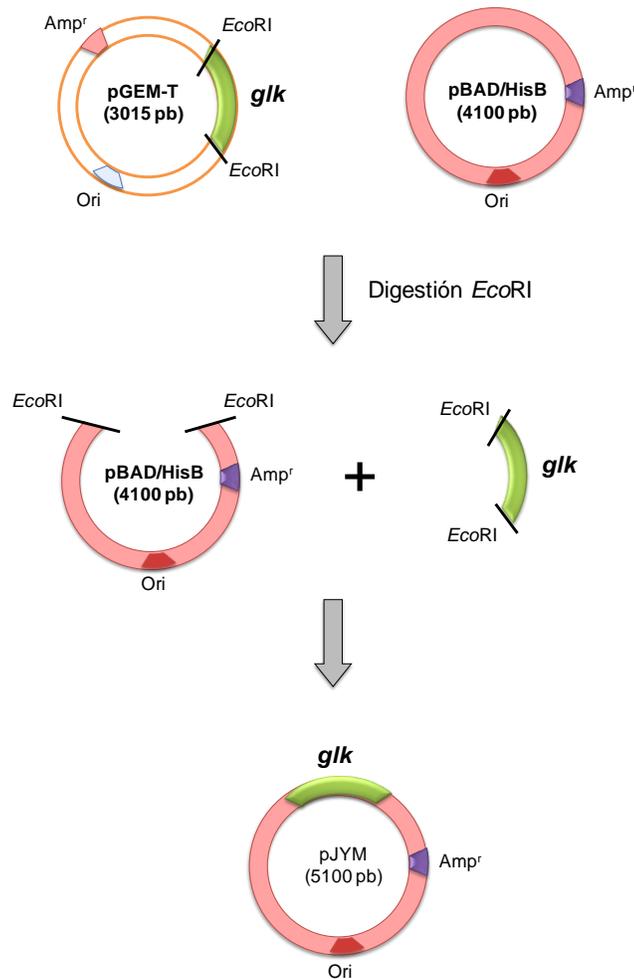


Figura 10. Subclonación de *glk* en pBAD/HisB. El gen *glk* se encontraba clonado en el plásmido pGEM-T-easy y fue subclonado en el plásmido de expresión pBAD/HisB. Se obtuvo *glk* a partir del plásmido pGEM-T-*glk* al digerir con *EcoRI*, el plásmido pBAD/HisB fue linealizado con la misma enzima. Se ligó *glk* en pBAD/HisB para dar origen al plásmido pJYM.



La construcción pGEM-T-*glk* fue digerida con la enzima *EcoRI*. En la figura 11 (A) se observa el fragmento correspondiente a *glk* (954 pb) obtenido de la digestión, éste fue ligado en el plásmido pBAD/HisB el cual fue linearizado previamente con la misma enzima de restricción. Se obtuvo la construcción de pBAD/HisB-*glk* la cual fue nombrada pJYM. La cepa de expresión *E. coli* TOP10 fue electrotransformada con el plásmido pJYM, se aislaron cinco clonas que adquirieron resistencia a ampicilina dada por el plásmido. De éstas se extrajo plásmido y se realizó un análisis de restricción con *EcoRI* para corroborar la presencia del gen, la muestras de pJYM sin digerir y digeridas fueron analizadas por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%. En la figura 11 (B) (carril 3) se observa que el plásmido aislado de una de las cinco clonas contenía el fragmento *glk*. El plásmido pJYM fue secuenciado y se corroboró que el gen *glk* se encontraba completo y en fase.

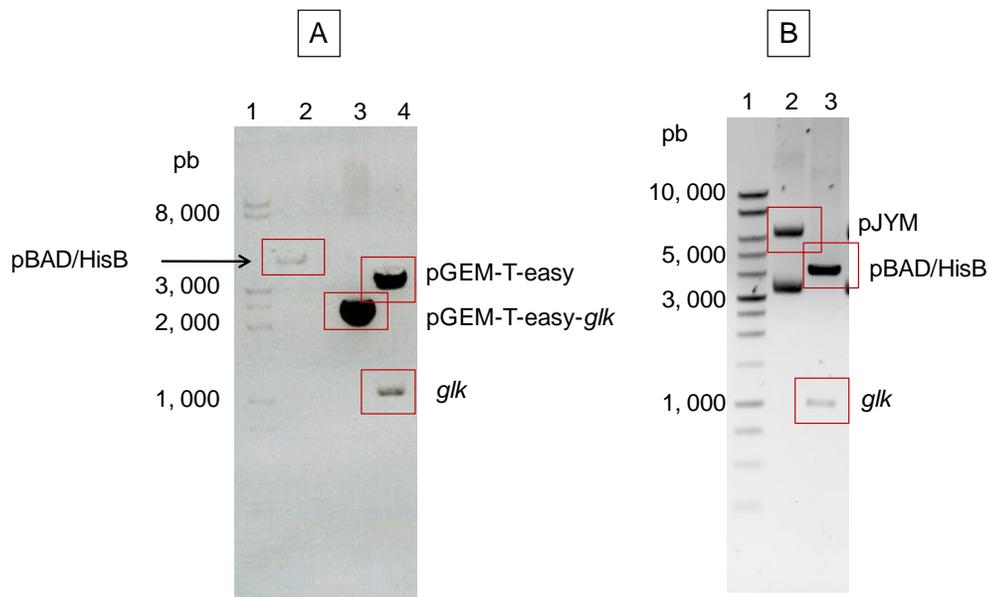


Figura 11. Subclonación de *glk* en pBAD/HisB. El gen *glk* se encontraba clonado en el plásmido pGEM-T-easy y fue subclonado en el plásmido de expresión pBAD/HisB. **(A)** Gel de agarosa 0.8%. Digestión del plásmido pGEM-T-*glk*. Carril 1: marcador 1kb DNA (Promega). Carril 2: plásmido puro pBAD/HisB. Carril 3: pGEM-T-easy-*glk* no digerido. Carril 4: pGEM-T-easy-*glk* digerido. **(B)** Gel de agarosa 0.8%. Digestión del plásmido pJYM. Carril 1: marcador 1kb DNA (Promega). **(C)** Carril 2: pJYM no digerido. Carril 3: pJYM digerido.

Posteriormente se realizaron ensayos de expresión de la proteína de fusión en la cepa de expresión TOP10 la cual contenía el plásmido pJYM. Las células fueron incubadas a 37°C, se evaluaron concentraciones crecientes de L-arabinosa como inductor (0, 0.00133, 0.0133, 0.133, 1.33 y 13.3 mM). Las muestras fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) y posteriormente por western-blot (anti-His). El tamaño de Glk es de 31



kDa (Imriskova *et al.*, 2001). Al realizar la clonación en el plásmido pBAD se tienen 50 aminoácidos adicionales a la secuencia de la proteína Glk, incluyendo 6 histidinas en el extremo N-terminal, lo que provoca que el tamaño de la proteína de fusión esperado sea de 40 kDa aproximadamente. En la figura 12 se muestra el western-blot en el que se puede observar el efecto del inductor sobre la expresión de la proteína de fusión, se obtuvo señal de una proteína con el tamaño aproximado para 6xHis-Glk. Conforme aumentó la concentración del inductor, aumentó la intensidad de la banda correspondiente, a partir de 0.133 mM de arabinosa ya no hay cambios de intensidad de la misma. Aún cuando la proporción de la proteína expresada es muy baja, se consideró 0.133 mM de L-arabinosa como la concentración del inductor adecuada para realizar el resto de los experimentos.

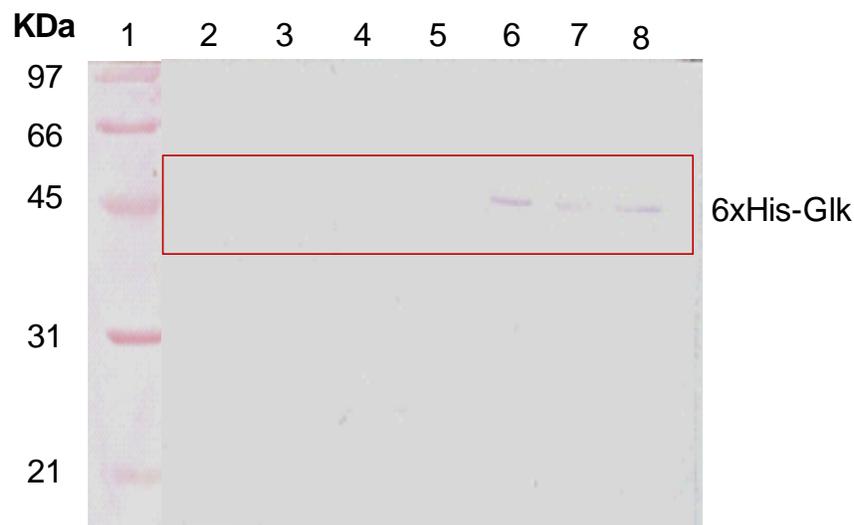


Figura 12. Evaluación de la expresión de 6xHis-Glk variando la concentración del inductor L-arabinosa, incubando *E. coli* TOP10-pJYM a 37°C. Western blot. Se analizó el extracto citosólico de cada muestra. Carril 1: marcador de peso molecular de bajo espectro (BioRad). Carril 2: cepa de expresión TOP10 transformada con el plásmido pQE31 sin *glk* inducido con 13.3 mM de arabinosa. Carril 3: control cepa de expresión TOP10 con plásmido pJYM sin inductor. Carril 4: cepa de expresión TOP10 con plásmido pJYM inducido con 0.00133 mM de arabinosa. Carril 5: 0.0133 mM. Carril 6: 0.133 mM. Carril 7: 1.33 mM. Carril 8: 13.3 mM de L-arabinosa.

Posteriormente, se evaluaron cambios en las condiciones del cultivo esperando obtener un aumento en la proporción de 6xHis-Glk expresada. Para ello se modificó la temperatura de incubación del inóculo y del cultivo (20° y 30°C). A estas temperaturas se monitoreó la expresión a 2, 4, 8, 12 y 16 h de inducción con 0.133 mM de L-arabinosa. También se modificó la velocidad de agitación a 100 y 200 rpm. Al modificar la temperatura, agitación y tiempo de inducción no se observó cambio en la sobreproducción de la proteína de fusión comparando con lo observado al crecer a TOP10-pJYM a 37°C. Por otra parte, se realizó la misma serie de ensayos usando la cepa *E. coli* XL1-Blue. Sin embargo, los resultados fueron los mismos.



Se revisó el uso de codones preferenciales para *E. coli* y para *Streptomyces* encontrándose que éste es diferente. En la secuencia de *glk* se encontraron algunos codones de bajo uso para *E. coli*, 14 codones que codifican para Arg, 4 codones para Gly, 4 para Pro, 2 para Leu, y 1 para Ile, Thr, y Ser (Fig. 6). Se decidió entonces realizar el cambio de algunos nucleótidos con la finalidad de dar codones de mayor uso para *E. coli*. Se cambió aquellos que se encontraban al inicio de la secuencia para facilitar el proceso de traducción, aquellos que se encontraban próximos entre sí para poder hacer el cambio de nucleótidos en un solo proceso de mutación y de 5 tripletes que se modificaron, 3 corresponden a aquellos que codifican para Arg, los que presentan menor frecuencia de uso por *E. coli*.

Para el cambio de nucleótidos se realizó mutagénesis dirigida empleando la metodología descrita en el manual del kit QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis, el cual se basa en el cambio puntual de nucleótidos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tomando como molde los cebadores diseñados con los nucleótidos cambiados en el orden deseado. Se realizaron dos rondas de mutación, en las que se cambiaron algunos nucleótidos ubicados al inicio del gen que codifican para Arg, Ile y Thr. El plásmido obtenido después de las mutaciones fue nombrado pROB, fue analizado por secuenciación y posteriormente utilizado para transformar *E. coli* TOP10. Se seleccionó una de las clonas obtenidas que contenía pROB para evaluar el nivel de expresión de la proteína de fusión en presencia de diferentes concentraciones del inductor. Se analizó el extracto citosólico de TOP10-pROB (Figura 13).

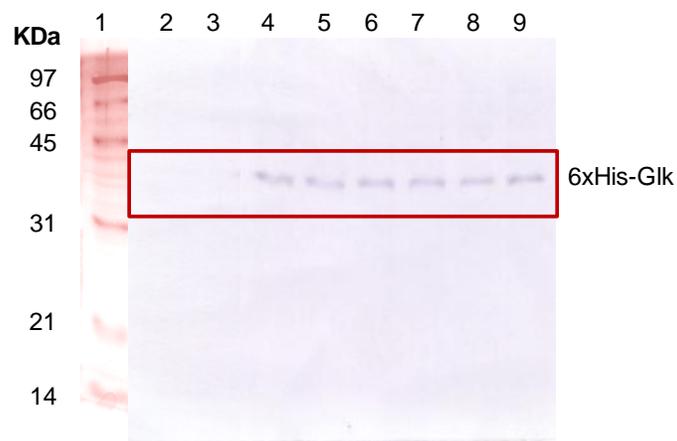


Figura 13. Evaluación de la expresión de *glk* en pROB después del cambio de nucleótidos realizados para favorecer los codones de uso en *E. coli*. Se analizó el extracto citosólico de TOP10-pROB inducido variando la concentración de L-arabinosa. Western-blot. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: extracto citosólico de la cepa de expresión sin pROB inducida con 0.133 mM de arabinosa. Carril 3: extracto citosólico de la cepa de expresión que contiene el plásmido pBAD sin *glk*, inducida con 0.133 mM de arabinosa. Carril 4: TOP10-pROB sin inductor. Carril 5: TOP10-pROB con 0.00133 mM. Carril 6: TOP10-pROB con 0.0133 mM. Carril 7: TOP10-pROB con 0.133 mM. Carril 8: TOP10-pROB con 1.33 mM. Carril 9: TOP10-pROB con 13.3 mM de L-arabinosa.



En el western-blot del extracto citosólico de TOP10-pROB se puede observar que la banda obtenida corresponde al tamaño esperado de 6xHis-Glk de 40 kDa. La secuenciación de pROB muestra los cambios deseados. Se secuenció todo el gen pero no la región del promotor. Sin embargo, la expresión de la proteína de fusión fue la misma independientemente de la concentración del inductor empleada, es decir, se volvió constitutiva. Se secuenció todo el gen pero no la región del promotor, donde quizá se haya dado un cambio permitiendo que el gen sea expresado constitutivamente.

Se realizaron diferentes cultivos de TOP10-pJYMA en los que se variaron las condiciones de incubación temperatura, agitación y tiempo de inducción, buscando las más adecuadas en las que se pudieran observar aumentos del rendimiento en la expresión de la proteína. Se obtuvo por sonicación el extracto citosólico de las células obtenidas en cada condición, se midió actividad enzimática de glucosa cinasa. La actividad encontrada corresponde al valor del control, la cepa de expresión que contiene el plásmido pBAD sin *glk*. No hay actividad enzimática. Tampoco se observó cambio en la proporción de 6xHis-Glk en ninguna de las condiciones evaluadas y en todo momento se observó expresión aún en ausencia de L-arabinosa. La expresión obtenida fue de bajo rendimiento y en ninguna de las condiciones evaluadas se logró incrementarla. Por ello se decidió cambiar el sistema de expresión.

Se partió de la construcción pJYM para obtener el gen *glk* e insertarlo en el plásmido de expresión pQE. Se realizó un análisis *in silico* en el que se observó que al usar las enzimas de restricción *SacI* y *HindIII* para obtener *glk* a partir de pJYM y para linearizar el plásmido pQE, nos permitiría tener el gen *glk* en fase ligándolo en la versión 31 del plásmido pQE.

Se purificó el plásmido pQE31 (Anexo I) y el plásmido pJYM. Se realizó la digestión enzimática de ambos plásmidos con las enzimas de restricción *SacI* y *HindIII*. Los productos de las digestiones fueron corridos en un gel de agarosa al 0.8% para purificar los fragmentos correspondientes al plásmido pQE31 y *glk* (Figura 14 (A)).



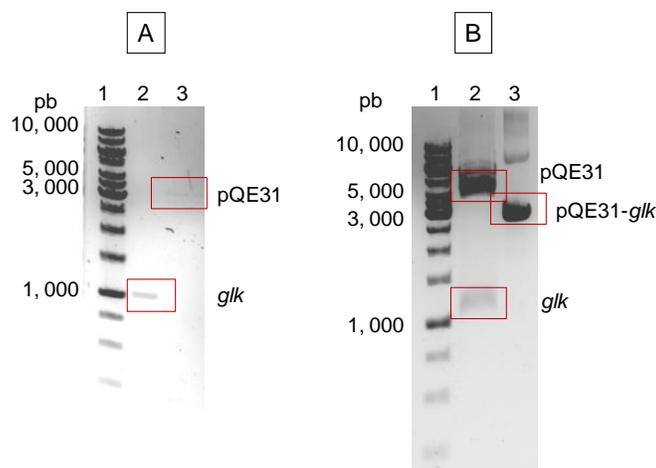


Figura 14. Subclonación de *glk* en el plásmido de expresión pQE31. Se obtuvo el gen *glk* a partir del plásmido pJYM y fue subclonado en el plásmido pQE31 usando las enzimas de restricción *SacI* y *HindIII* para obtener *glk* y linearizar pQE31. Geles de agarosa 0.8%. (A) Carril 1: marcador 1 kb DNA. Carril 2: fragmento de *glk*. Carril 3: plásmido pQE31 lineal. (B) Carril 1: marcador 1 kb DNA. Carril 2: pQE31-*glk* digerido con *SacI* y *HindIII*. Carril 3: construcción pQE31-*glk*, pISR.

Los fragmentos purificados se ligaron por los extremos cohesivos obtenidos. La construcción obtenida pQE31-*glk* fue nombrada pISR. La cepa de expresión *E. coli* M15 fue electrotransformada con el plásmido pISR, se aislaron cinco clonas que adquirieron resistencia a ampicilina dada por el plásmido pISR y a kanamicina dada por el plásmido pREP4 presente en la cepa de expresión. De éstas se extrajo plásmido y se realizó un análisis de restricción con *SacI* y *HindIII* para corroborar la presencia del gen, la muestras de pISR sin digerir y digeridas fueron analizadas por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%. En la figura 14 (B) se muestra el producto de la digestión de una de las cinco clonas analizadas. En el carril 2 se observa que el plásmido el fragmento *glk*. Las cinco clonas fueron empleadas para realizar un ensayo de expresión, de esta forma podíamos corroborar que el gen se encontraba en fase y que expresara la proteína de fusión en el tamaño aproximado que esperábamos. Las células fueron llevadas a una D.O._{600nm} 0.5-1.0, se adicionó 1 mM de IPTG, se incubó 4 h en presencia del inductor a 37°C y agitación de 200 rpm. Se colectó 1 mL del medio de cultivo, se recuperó el paquete celular por centrifugación y se eliminó el medio de cultivo. Las células fueron resuspendidas en 100 µL de solución de carga SDS-2X. Se calentó a 90°C durante 5 min. Se centrifugó a 10,000 rpm 5 min, el sobrenadante fue analizado por electroforesis en gel SDS-PAGE y western blot.

Se observó que las cinco clonas evaluadas mostraron señal en el western-blot correspondiente al tamaño de 40 kDa esperado para 6xHis-Glk (Figura 15 (B)).



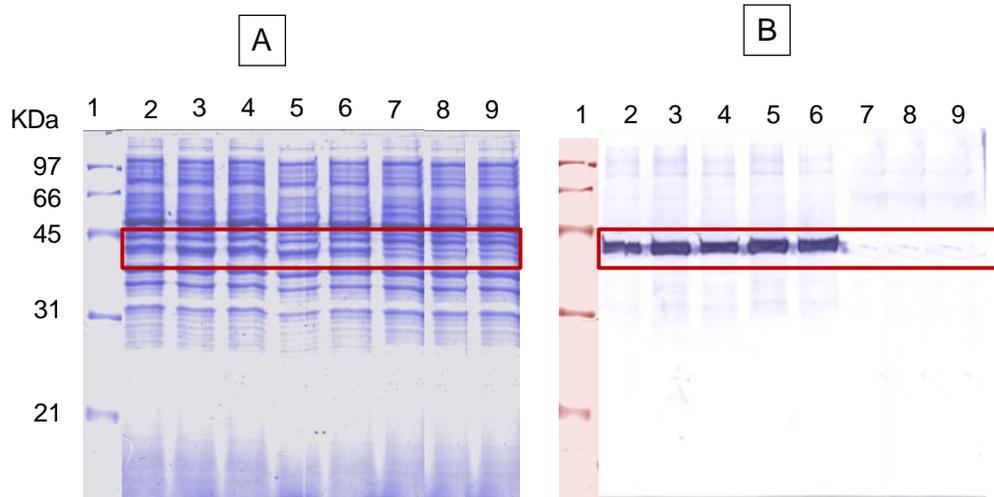


Figura 15. Ensayo de expresión de *glk* en *E. coli* M15 transformada con pISR. Después de haber obtenido la construcción pISR (pQE31-*glk*) se transformó la cepa de expresión *E. coli* M15 con este plásmido. Del proceso de transformación se eligieron cinco clonas para realizar un ensayo de inducción y verificar la expresión de la proteína de fusión esperada. Las células fueron incubadas 4 h a 37°C después de que se adicionó 1 mM de IPTG. Se analizó la fracción citosólica de las células mediante (A) SDS-PAGE 10% y (B) western-blot. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: clona 1 con 1 mM de IPTG. Carril 3: clona 2 con 1 mM de IPTG. Carril 4: clona 3 con 1 mM de IPTG. Carril 5: clona 4 con 1 mM de IPTG. Carril 6: clona 5 con 1 mM de IPTG. Carril 7: clona 1 sin IPTG. Carril 8: *E. coli* M15 con el plásmido pQE31 sin *glk* con 1 mM de IPTG. Carril 9: *E. coli* M15 sin plásmido con 1 mM de IPTG.

El plásmido aislado de cada una de las clonas fue enviado para secuenciación y verificar que el gen se encontrara completo y en fase. Se llevó a cabo un análisis *in silico* de la secuencia del gen obtenido de las cinco clonas y se realizó la traducción de nucleótidos a aminoácidos de las mismas, comparando con la secuencia de aminoácidos reportada para la Glk de *S. peucetius* var. *caesius* (AAT72898.1) en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Se observó que las cinco secuencias presentaban una mutación en el aminoácido número 125 (Figura 16), correspondiente a una alanina en lugar de una valina que es el aminoácido original reportado para la Glk de *S. peucetius* var. *caesius*.



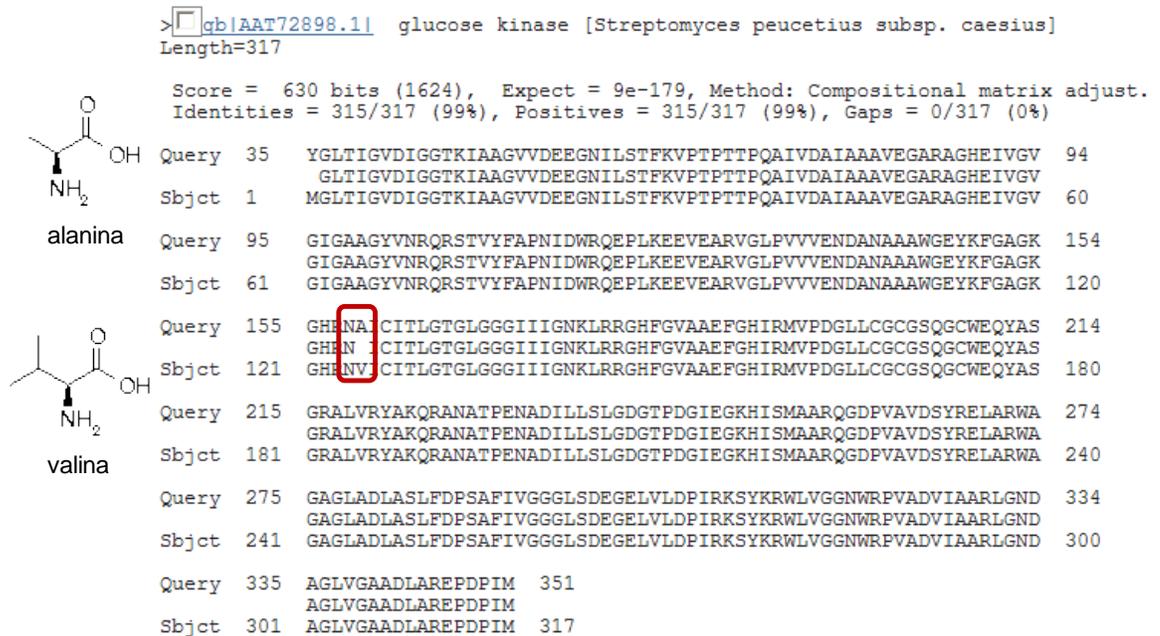


Figura 16. Comparación de la secuencia de aminoácidos de Glk recombinante y la reportada en GenBank (AAT72898.1). Se obtuvo la secuencia de nucleótidos de *gk* clonado en pISR, se realizó *in silico* la traducción para obtener la secuencia en aminoácidos. Ésta (Query) fue comparada con la secuencia de aminoácidos reportada en GenBank para la secuencia de Glk de *S. peucetius* var. *caesius* (Sbjct).

Se realizó un análisis de las secuencias de nucleótidos que se obtuvieron de *gk* clonado en pJYM y pROB y se observó que ya se tenía la mutación del aminoácido 125, el cual surgió quizá durante la clonación de *gk* a partir de ADN genómico mediante PCR.

Se realizó un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la Glk reportada para otros estreptomicetos, *S. avermitilis*, *S. coelicolor* y *S. griseus*, con la intención de verificar qué tan conservado se encontraba el aminoácido 125. En todas ellas se presenta una valina en dicha posición (Figura 17).



```

pISR          GIGAAGYVNRQRSTVYFAPNIDWRQEPLKEEVEARVGLPVVVENDANAAAWGEYKFGAGK 119
S. peucetius var. caesius GIGAAGYVNRQRSTVYFAPNIDWRQEPLKEEVEARVGLPVVVENDANAAAWGEYKFGAGK 120
S. avermitilis  GIGAAGYVNRQRSTVYFAPNIHWRQEPLKDEVEARVGLPVVVENDANAAAWGEYKFGAGK 120
S. coelicolor   GIGAAGYVNRQRSTVYFAPNIDWRQEPLKEEVEARVGLPVVVENDANAAAWGEYKFGGGK 120
S. griseus      GIGAAGYVDDKRAIVLAFAPNIDWRHEPLKDKVEQRVGLPVVVENDANAAAWGEYRFGAGQ 120
*****: :*:** *****:***:***:*** *****:*****:***:*.

pISR          GHRIVICITLGTGLGGGIIIGNKLRRGHFGVAAEFGHIRMVPDGLLCGCGSQGCWEQYAS 179
S. peucetius var. caesius GHRIVICITLGTGLGGGIIIGNKLRRGHFGVAAEFGHIRMVPDGLLCGCGSQGCWEQYAS 180
S. avermitilis  GHRIVICITLGTGLGGGIIIGNKLRRGHFGVAAEFGHIRMVPDGLLCGCGSQGCWEQYAS 180
S. coelicolor   GHRIVICITLGTGLGGGIIIGNKLRRGHFGVAAEFGHIRMVPDGLLCGCGSQGCWEQYAS 180
S. griseus      GHDIVICITLGTGLGGGIIIGNKLRRGRFGVAAEFGHIRVVPDGLLCGCGSQGCWEQYAS 180
** :*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

pISR          GRALVRYAKQRANATPENADILLSLGDGTPDGIEGKHI SMAARQGDPAVDSYRELARWA 239
S. peucetius var. caesius GRALVRYAKQRANATPENADILLSLGDGTPDGIEGKHI SMAARQGDPAVDSYRELARWA 240
S. avermitilis  GRALVRYAKQRANATPENAEVLLALGNGTPDGIEGKHISVAARQGDPAVDSYRELARWA 240
S. coelicolor   GRALVRYAKQRANATPERAEVLLALGDGTPDGIEGKHISVAARQGCPCVAVDSYRELARWA 240
S. griseus      GRALVRYAKQRANATPENAAVLLGLDGSVDGIEGKHISEAARQGDPAVDSYRELARWA 240
*****.* :**:*:***:***** ***** *****:*****

```

Figura 17. Comparación de secuencias de Glk entre estreptomicetos. (pISR) secuencia de la Glk recombinante obtenida de la construcción pQE31-*glk*. *Streptomyces peucetius* var. *caesius* (AAT72898.1), *Streptomyces avermitilis* (NP_822588.1), *Streptomyces coelicolor* (NP_626383.1) y *Streptomyces griseus* (YP_001826889.1).

Se realizaron ensayos de actividad enzimática para evaluar el efecto de dicha mutación en las cinco clonas. La actividad encontrada fue muy baja, 2.5 veces por debajo de la encontrada en *S. peucetius* var. *caesius*. Se tiene la construcción pISR donde el gen *glk* se encuentra completo y en fase, que expresa la proteína de fusión en el tamaño de 40 kDa, pero ésta no tiene actividad enzimática, quizá debido a la mutación del aminoácido 125, por lo que se decidió revertir la mutación del aminoácido 125.

Para revertir el aminoácido se usó el kit de mutaciones dirigidas QuikChange® II. Después del proceso de mutación se obtuvo el plásmido pQE31-*glk* con Val125 el cual fue nombrado pDRM, del cual verificó por secuenciación que se revirtió la mutación del aminoácido 125. El plásmido se usó para transformar la cepa de expresión de *E. coli* M15. La cepa M15 que contiene pDRM fue usada para continuar con los ensayos de expresión y purificación.

Se realizó el ensayo para medir actividad de glucosa cinasa. Las células fueron incubadas 4h a 37°C después de adicionar 1 mM de IPTG. Se midió actividad de Glk en la fracción citosólica. Para ello se tomó como control negativo la actividad de la cepa de expresión *E. coli* M15 sin plásmido (M15) y la cepa M15 con el plásmido pQE31 sin *glk* (Dglk). Se evaluaron simultáneamente las cepas M15 con pISR (Ala125) y M15 con pDRM (Val125). Los resultados se muestran en la figura 18.



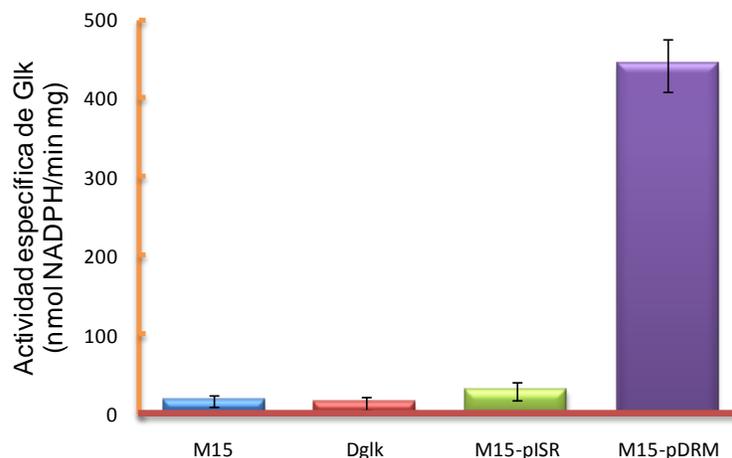


Figura 18. Comparación de actividad de glucosa cinasa. Se realizó la comparación de la actividad enzimática de Glk para evaluar la importancia del aminoácido 125 en la secuencia de Glk. Las células fueron incubadas 4h a 37°C después de haber sido inducidas con 1 mM de IPTG. Se midió actividad de Glk en la fracción citosólica de: la cepa de expresión *E. coli* M15 (M15). La cepa de expresión *E. coli* M15 con plásmido pQE31 sin *glk* (Dglk). La cepa de expresión *E. coli* M15 con pISR Ala125 (M15-pISR). Cepa de expresión *E. coli* M15 con pDRM Val125 (M15-pDRM).

Lo que podemos observar en la figura 18 es que la actividad medida para pISR corresponde al doble de la actividad encontrada para el control negativo (M15). Al corregir el aminoácido mutado (V125A en pDRM), se observó que la actividad fue 16 veces mayor respecto a la cepa que presentaba la mutación (pISR). Lo cual nos mostró que la presencia de la valina en la posición 125 es determinante en la función enzimática de la Glk.

Se midió la actividad enzimática de Glk en la fracción citosólica de *S. peucetius* var. *caesius* como control positivo. Se obtuvo un valor de 73 ± 18 U/mg proteína. Comparando con la actividad medida para pDRM podemos observar que ésta es 6 veces mayor respecto a la encontrada en el estreptomiceto. Aún cuando se está expresando la actividad en U por cantidad de proteína, el aumento en la actividad para la proteína recombinante podría explicarse quizá porque la proporción de Glk encontrada en la fracción citosólica de *Streptomyces* sea menor a la encontrada para pDRM respecto de la proteína total, tomando en cuenta que en *E. coli* se está sobre-expresando la misma proteína.

Dado que la Val125 es determinante en la actividad enzimática de la Glk, se pensó que quizá se encuentre formando parte del sitio activo de la proteína. Para ubicar este aminoácido en la estructura tridimensional de la proteína se realizó la predicción de la estructura 3D de la Glk. Se buscó en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology), EMBL-EBI (European Bioinformatics Institute) y RCSB-PDB (Protein Data Bank), la estructura cristalizada de diferentes glucosa cinasas. Se encontró la secuencia de proteínas homólogas pero ninguna cristalizada perteneciente al género *Streptomyces*. A



partir de las estructuras que presentaron mayor homología (Tabla VII), se realizó la predicción de la estructura tridimensional, utilizando el servicio en web del programa PHYRE (Protein Homology/analogy Recognition Engine) el cual buscó estructuras tridimensionales de proteínas contenidas en la base de datos de SCOPE (Structural Classification of Proteins) y de PDB (Protein Data Bank). Se tomó como molde la estructura cristalizada de la glucosa cinasa de *Enterococcus faecalis* (2qm1) (Tabla VI).

Tabla VI. Estadística de homología de la Glk de *S. peucetius* var. *caesius* con algunos miembros de la familia ROK (bacterial Repressors, uncharacterized Open reading frames, and sugar Kinases).

No.	Proteína (UniProtKB)	Código SCOPE	Valor-E	Precisión estimada	Descripción del plegamiento PDB	Superfamilia	Familia
1	Q830JA	2qm1 (326 aa) 29% i. d.	5.3e-31	100 %	Transferasa	Glucocinasa	Glucocinasa <i>Enterococcus faecalis</i>
2	P45425	2aa4 (289 aa) 33% i. d.	2.6e-29	100 %	Transferasa	N-acetil manosamina cinasa putativa	N-acetil manosamina cinasa putativa <i>E. coli</i>
3	P50456	1z6r (406 aa) 21% i. d.	4.3e-29	100 %	Transcripción	Proteína Mlc	Proteína Mlc <i>E. coli</i>
4	Q82P29	2ap1 (327 aa) 27% i. d.	1e-28	100 %	Regulador proteico putativo	Regulador proteico putativo	Regulador proteico putativo
5	Q9KQJ1	1205 (429 aa) 25% i. d.	4.1e-28	100 %	Transcripción	Regulador transcripcional familia ROK	Regulador transcripcional 2, familia ROK homólogo Mlc de <i>E. coli</i>
6	Q9X0V1	2hoe (380 aa) 22% i. d.	1e-26	100 %	Transferasa	N-acetil glucosamina cinasa	N-acetil glucosamina cinasa <i>Thermotoga marítima</i>
7	Q97NBO	2gup (292 aa) 24% i. d.	1.3e-26	100 %	Transferasa	Proteína familia ROK	Proteína familia ROK <i>Streptococcus pneumoniae</i>
8	O05S10	1xc3 (302 aa) 25% i. d.	5.4e-26	100 %	Transferasa	Fructocinasa putativa	Fructocinasa putativa <i>B. subtilis</i>



El porcentaje de identidad de Glk con la proteína (2qm1) es de 29% (Tabla VI). La precisión estimada con la que se construyó el modelo fue de 100%, lo que indica que aunque no es igual la estructura primaria, la estructura secundaria será muy parecida. La definición del plegamiento dado por PDB (protein data bank), la superfamilia y familia definen a 2qm1 como Glucosa cinasa perteneciente a la familia ROK. El alineamiento entre estas secuencias (Fig. 19) indica los aminoácidos conservados 32% (101/316) y los aminoácidos de polaridad semejante 55% (173/316).

Description	Max score	Total score	Query coverage	E value
gi 29377260 ref NP_816414.1 glucokinase [Enterococcus faecalis	155	155	97%	1e-42

```
>lcl|19133 gi|29377260|ref|NP_816414.1| glucokinase [Enterococcus faecalis
V583]
Length=323

Score = 155 bits (391), Expect = 1e-42, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 101/316 (32%), Positives = 173/316 (55%), Gaps = 11/316 (3%)

Query 5 IGVDIGGKIAAGVVDDEEGNILSTFKVPTPTTPQ-----AIVDAIAAAVEGARAGHE-I 57
IG+D+GGI I ++ +G + + + T +I+++I ++ E
Sbjct 6 IGIDLGGTIIKFAILTTIDGVVQQKWSIETNILEDGKHIVPSIIESIRHRIDLNYMKKEDF 65

Query 58 VGVGIGAAGYVNRQRSTVYFAPNIDWRQ-EPLKEEVEARVGLFVVVENDANAAAWGEYKF 116
VG+G+G G V+ ++ IV A N++N +P+KE++E+ +G+P ++NDAN AA GE
Sbjct 66 VGIGMGTPGSVDIEKGTVVGAYNLNWTIVQPVKEQIESALGIPFALDNDANVAALGERWK 125

Query 117 GAGKGRNVICITLGTGLGGGIIIGNKLRGHFGVAAEFGHIRMVDPDLLCGCGSQGCWE 176
GAG+ + +VI ITLGTG+GGGI+ KL G G A E GH+ + P+G C CG +GC E
Sbjct 126 GAGENNPDI VIFITLGTGVGGGIVAAGKLLHGVAGCAGEVGHVTVDPNGFDCTCGKRGCLE 185

Query 177 QYASGRALVRYAKQRANATPENADILLSLGDGTPDGIEGKHISMAARQGD FVAVDSYREL 236
+S +VR A+ + +++++ ++ DG + K + A +GD A+ +
Sbjct 186 TVSSATGVVVRARHLSEEFAGDSELKQAI DDGQD--VSSKDVFEFAEKGDH FALMVVDRV 243

Query 237 ARWAGAGLADLASLFDPSAFIVGGGLSDEGELVLDPIRKS YKRNLVGGNWRPVADVIAAR 296
+ G +L + +P + +GGG+S GE + + K ++ + R + A
Sbjct 244 CFYLG LATGNLGNLNPDSVVI GGGVSAAGEFLRSRVEKYFQEFTF-PQVRNSTKIKLAE 302

Query 297 LGNDAGLVGAADLARE 312
LGN+AG++GAA LA +
Sbjct 303 LGNEAGVIGAASLALQ 318
```

Figura 19. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la Glk de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* y *Enterococcus faecalis*. Glucosa cinasa de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* (GenBank AAT72898.1) y glucosa cinasa de *Enterococcus faecalis* (PDB 2qm1).

El estudio de la estructura secundaria indicó que la Glk se encuentra formada por 11 α -helices, 7 β -plegadas y 24 regiones de torsión al azar. Con los datos anteriores se realizó la predicción de la estructura tridimensional mostrada en la figura 20.



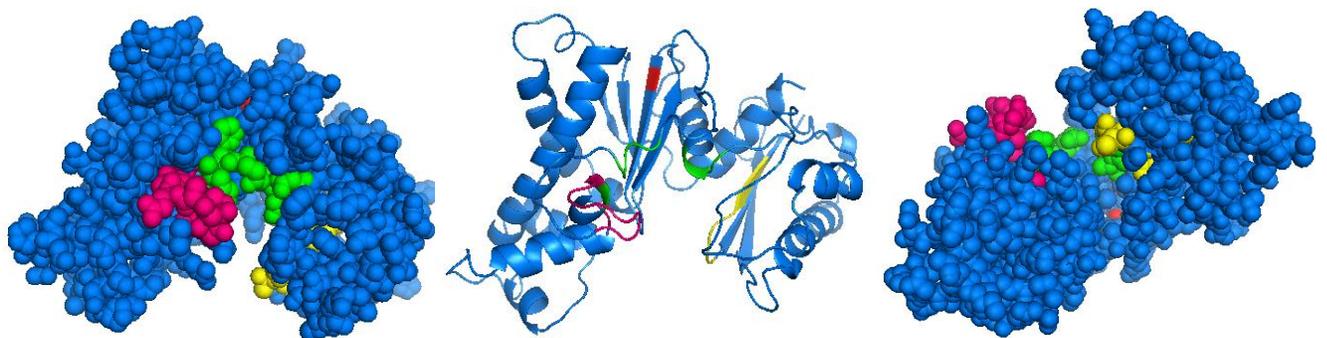
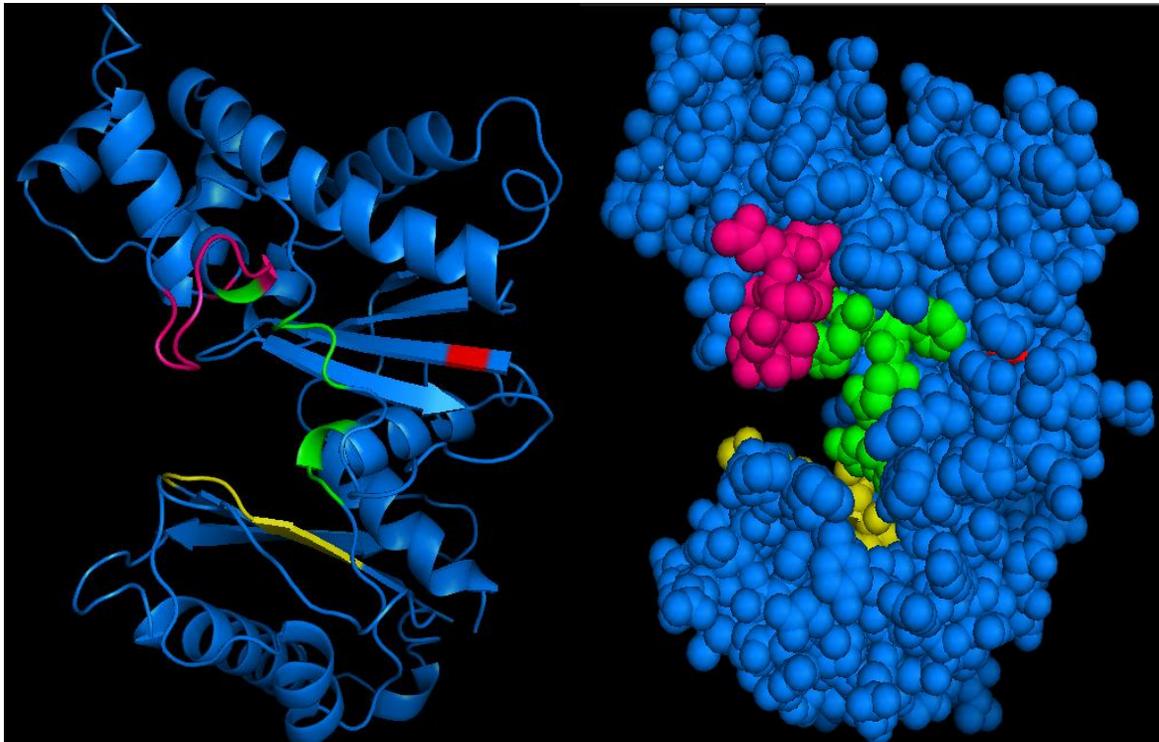


Figura 20. Representación en listón y esferas del modelo computacional de la estructura tridimensional de la Glk de *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. En rojo se representa la posición de la valina 125, en amarillo los aminoácidos propuestos de unión a ATP, en rosa los probables aminoácidos que unen Mg^{2+} y en verde los aminoácidos que quizá participan uniendo glucosa.

En la figura 20 se marcó con colores las secuencias putativas de unión con los sustratos de la enzima (Titgemeyer *et al.*, 1994, Conejo *et al.*, 2010). La valina 125 (en rojo) se encuentra alejada de los aminoácidos que aparentemente se encuentran formando parte del sitio activo. La Val125 se encuentra ubicada en una región hidrofóbica que quizá no se encuentre relacionada con el sitio catalítico, lo cual no explica la pérdida de actividad al mutar este aminoácido por alanina. Imriskova *et al.* 2005, describió que la glucosa cinasa de *S. peucetius* var. *caesius* una primero la glucosa, sufre un cambio conformacional y



después un el complejo MgATP⁻. Con el cambio A125V, quizá se esté afectando el cambio conformacional que se requiere para unir el complejo MgATP⁻ y por ello se pierde la actividad enzimática. Adicionalmente, la estructura mostrada en la figura 20 sólo es una aproximación de lo que podría ser la estructura real, correspondiente a un monómero y sabemos que la Glk nativa se encuentra en forma de tetrámero donde la valina quizá participe en la estabilidad de la estructura cuaternaria, para saberlo sería necesario realizar otros estudios incluyendo la cristalización de la proteína.

En la cepa M15-pDRM se expresó la proteína de fusión 6xHis-Glk con actividad enzimática. Buscando las condiciones más adecuadas para obtener un mayor rendimiento en la expresión de la proteína, se creció a M15-pDRM a 20° y 37°C. Se células obtenidas fueron lisadas por sonicación, se analizó mediante SDS-PAGE y western-blot la fracción citosólica y el debris celular de ambas condiciones de crecimiento. Se encontró que a 37°C se obtuvo mayor cantidad de proteína total en la fracción citosólica en comparación con la obtenida a 20°C. Sin embargo, el análisis por western-blot indicó que toda la proteína se encontraba en la fracción del debris celular en ambos casos (Figura 21).

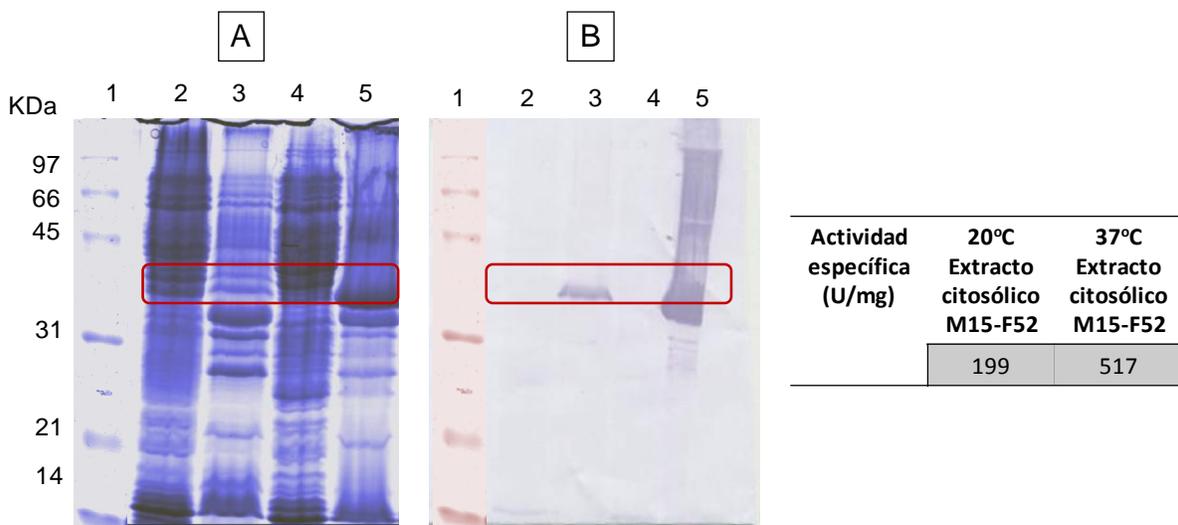


Figura 21. Evaluación de la temperatura de incubación de M15-pDRM sobre el rendimiento en la expresión de Glk. Se creció a M15-pDRM a 20° y 37°C, las células fueron lisadas por sonicación. Se analizó la fracción citosólica y el debris celular de ambos casos mediante: (A) SDS-PAGE 10%. (B) western-blot. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: fracción citosólica de M15-pDRM a 20°C. Carril 3: debris celular de M15-pDRM a 20°C. Carril 4: fracción citosólica de M15-pDRM a 37°C. Carril 5: debris celular de M15-pDRM a 37°C. La tabla muestra la actividad específica medida en la fracción citosólica.

La mayor proporción de la proteína expresada se encuentra en el debris celular quizá como cuerpos de inclusión y sólo se observa una señal muy débil en la fracción citosólica obtenida a 20°C. Estos



resultados sugieren que las condiciones más propicias para obtener la proteína de fusión de forma soluble sería creciendo M15-pDRM a 20°C. Sin embargo, al realizar los ensayos de actividad enzimática de la fracción citosólica correspondiente a cada temperatura, se encontró que en la fracción de 37°C había un valor mayor de actividad específica (517 U/mg proteína) comparado con el obtenido a 20°C (199 U/mg proteína).

Se realizó un ensayo de expresión a 37°C en el que se varió la concentración del inductor (IPTG) y el tiempo de exposición a éste (4 y 6 h). Bajo estas condiciones no se observó diferencia en la proporción de proteína recombinante expresada, desde 0.25 hasta 1 mM de IPTG. Tampoco se observó diferencia entre 4 y 6 h de exposición al inductor (Figura 22). Se eligió la condición de 0.5 mM de IPTG y 4 h de inducción a 37°C para continuar con el estudio.

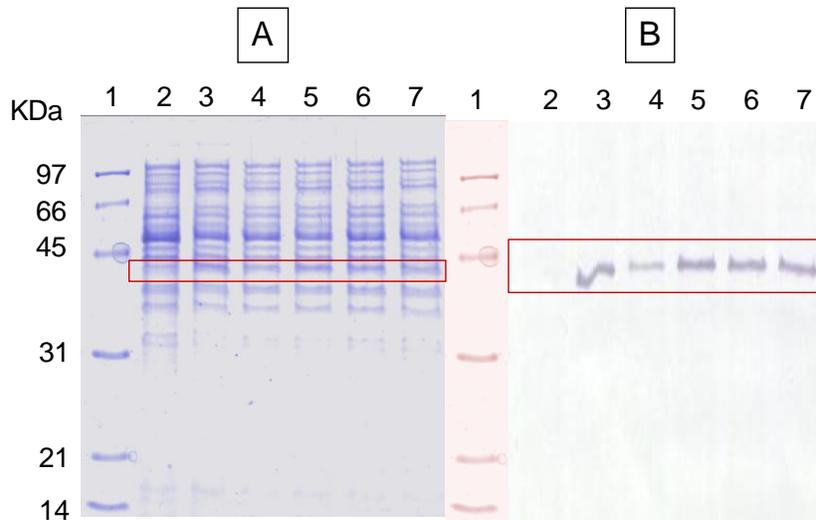


Figura 22. Ensayo de expresión de *gIk* en M15-pDRM para obtener las mejores condiciones de inducción. Se evaluaron diferentes concentraciones del inductor (IPTG) y tiempos de exposición a éste sobre M15-pDRM. (A) SDS-PAGE 10%. (B) western-blot. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: 0 mM IPTG, 6 h inducción. Carril 3: 0.25 mM IPTG, 4 h inducción. Carril 4: 0.5 mM IPTG, 4 h inducción. Carril 5: 0.75 mM IPTG, 4 h inducción. Carril 6: 1 mM IPTG, 4 h inducción. Carril 7: 0.5 mM IPTG, 6 h inducción.

Debido a que las condiciones de incubación utilizadas proporcionaron bajas concentraciones de proteína de fusión en la fracción citosólica, se realizó un cultivo en una jarra de 15-L con 10 L de medio de cultivo LB. El fermentador se inoculó con un 1 L de medio LB crecido a 37°C durante 12 h. El cultivo se llevó a cabo a 37°C y 300 rpm hasta alcanzar una D.O. $_{600\text{ nm}} = 1.217$ y se adicionó IPTG 0.5 mM. El fermentador se incubó bajo las mismas condiciones durante 4 h después de adicionado el inductor. Posteriormente, se rompieron las células con una prensa francesa. Se separó la fracción citosólica mediante



centrifugación y del citosol obtenido se realizó la purificación de la proteína 6xHis-Glk por cromatografía de afinidad. En la figura 23 se puede observar el cromatograma obtenido.

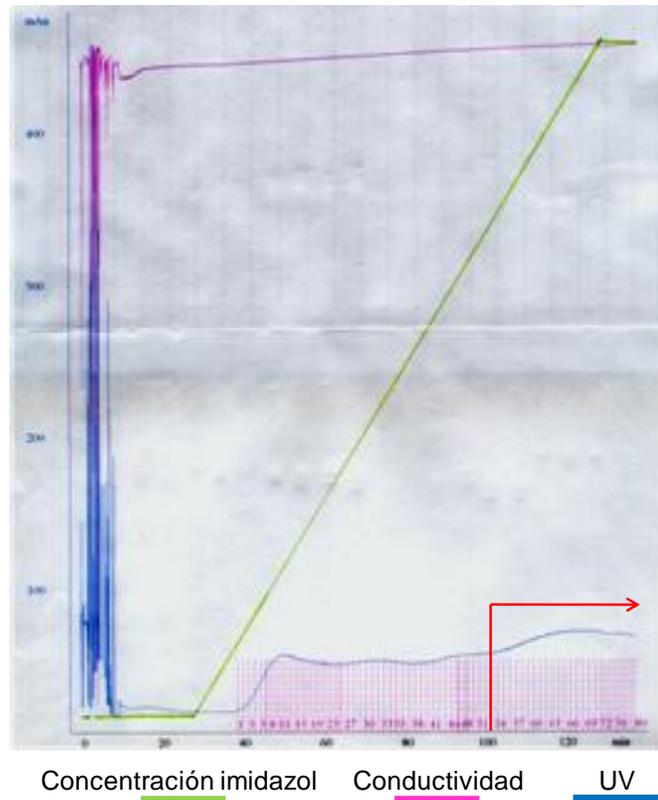


Figura 23. Cromatograma de purificación de 6xHis-Glk por cromatografía de afinidad con sefrosa niquelada. Elución de la proteína con un gradiente de imidazol de 0 a 250 mM en 100 mL a un flujo de 1 mL/min.

En el cromatograma se puede observar una línea verde que indica la elución de las proteínas usando un gradiente de imidazol desde 0 hasta 250 mM en un volumen total de 100 mL con un flujo de 1 mL/min. La línea en azul indica que la elución de las proteínas otras proteínas comenzó alrededor del 10% del gradiente. Se colectaron todas las fracciones de 1.5 mL, desde que se observó un incremento en la D.O. a 280 nm. Una vez terminado el gradiente, se dejó correr la solución de elución durante 10 min. Después se continuó con la elución pero de forma manual con una solución más concentrada de imidazol 500 mM y se colectaron tres fracciones de 5 mL cada una.

Se analizaron por SDS-PAGE algunas de las fracciones colectadas a manera de abarcar todo el cromatograma, incluso aquellas obtenidas de la elución manual.



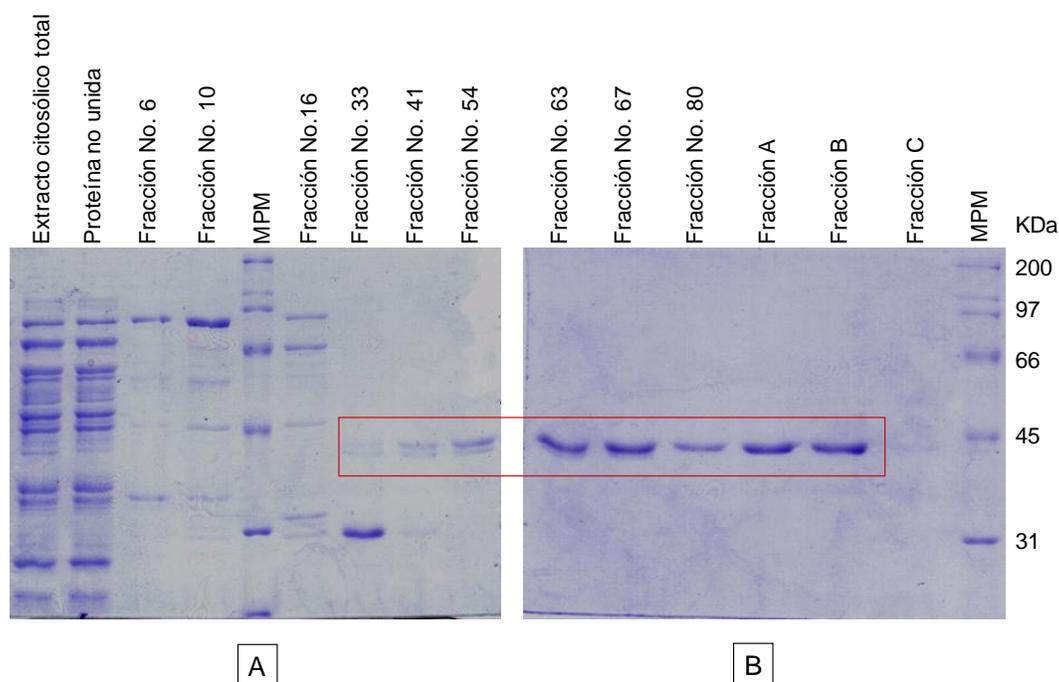


Figura 24. Purificación de 6xHis-Glk. (A) SDS-PAGE 10%. Carril 1: extracto citosólico. Carril 2: proteína no unida en la columna. Carril 3: fracción no. 6. Carril 4: fracción no. 10. Carril 5: marcador de peso molecular de amplio rango (BioRad). Carril 6: fracción no. 16. Carril 7: fracción no. 33. Carril 8: fracción no. 41. Carril 9: fracción no. 54. (B) SDS-PAGE 10%. Carril 1: fracción no. 63. Carril 2: fracción no. 67. Carril 3: fracción no. 80. Fracciones eluidas manualmente: Carril 4: fracción a1. Carril 5: fracción b1 y Carril 6: fracción c1. Marcador de peso molecular de amplio rango: carril 7.

En los geles SDS-PAGE de las fracciones eluidas se observa que la proteína 6xHis-Glk comenzó a despegarse desde la fracción 33 acompañada de proteínas contaminantes. A partir de la fracción 54 se observan dos bandas de peso molecular muy cercano, y a partir de la fracción 80 ya se observa sólo una banda. Se realizó un análisis más detallado entre las fracciones número 54 hasta la 83. Se juntaron las fracciones que presentaban características semejantes, es decir, las que presentaban dos bandas de tamaño similar alrededor de 40 kDa (fracción 54-75), las que presentaban sólo una banda (fracción 76-83) y las que fueron eluidas de forma manual (fracción a1-b1). Éstas fueron dializadas y posteriormente se midió actividad enzimática con cada una de ellas (Tabla VII), observándose que las fracciones obtenidas de la purificación por afinidad presentan actividad enzimática.



Tabla VII. Actividad de glucosa cinasa purificada.

Fracción	Actividad específica (U/mg)
54-75	5886
76-83	24145
a1-b1	5120

Una vez que se obtuvo la proteína de fusión pura y con actividad, se procedió a realizar los ensayos de interacción proteína-proteína empleando las metodologías de far-western y pull-down.

Se comenzó con los ensayos de far-western, para los cuales se utilizó la fracción que presentaba mayor actividad (76-83). Para realizar dicho ensayo se utilizó la metodología descrita en la figura 25.

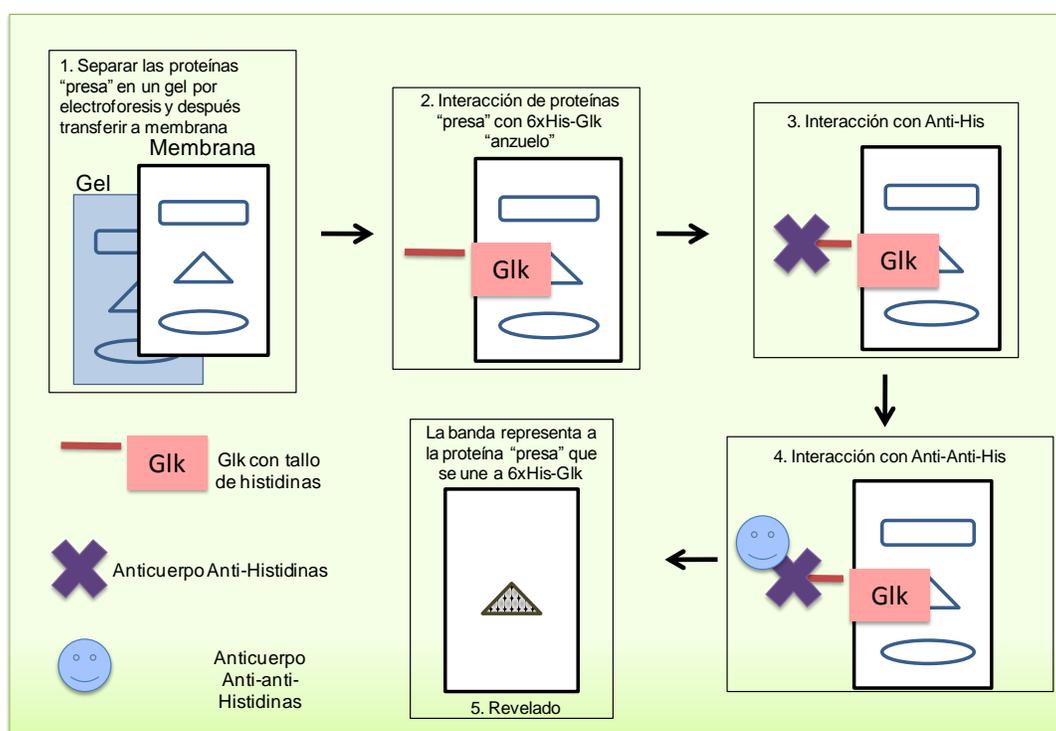


Figura 25. Ensayo de far-western. El ensayo consiste en el enfrentamiento entre la proteína "anzuelo" con las proteínas "presa" que se encuentran inmobilizadas en una membrana de nitrocelulosa. Una vez dada la interacción proteínica, el complejo es detectado por medio de anticuerpos de acuerdo a la siguiente metodología: 1. Las proteínas "presa" contenidas en el extracto citosólico de *S. peucetius* var. *caesius* obtenidas a diferentes tiempos del cultivo son separadas en un SDS-PAGE. Después las proteínas son transferidas a una membrana de nitrocelulosa. 2. La membrana es incubada con la proteína pura "anzuelo" 6xHis-Glk esperando se establezca una unión proteínica. 3. Se incuba la membrana con el anticuerpo anti-Histidinas que reconocerá a 6xHis-Glk uniéndose a ella. 4. La membrana es incubada con anticuerpo anti-anti-Histidinas acoplado a fosfatasa alcalina. 5. Finalmente se hace el revelado del western-blot. Se espera ver señal donde Glk se haya unido a otra u otras proteínas.



El fundamento de esta metodología es la detección por wester-blot del complejo proteínico formado entre la proteína “anzuelo” (6xHis-Glk) y la “proteína presa”, en este caso la proteína hipotética que se uniría a Glk proveniente de *S. peucetius* var. *caesius*.

Se analizaron los extractos citosólicos obtenidos del cultivo de *S. peucetius* var. *caesius* en medio mínimo con glucosa en baja (100 mM) y alta (495 mM) concentración. Se tomaron muestras en la fase logarítmica y estacionaria temprana del crecimiento del estreptomiceto. Se obtuvo la fracción del citosol de cada tiempo, se corrieron en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes y no desnaturizantes para separar las proteínas. Éstas se transfirieron posteriormente a una membrana PVDF, se bloquearon con solución TBS con 3% de leche descremada, lo cual permite la renaturalización de algunas proteínas. Una vez concluido este proceso, se incubó con la proteína 6xHis-Glk pura. Se evaluaron diferentes condiciones de incubación: 12 h a 4°C y 20°C. Se incubó sólo con la proteína de fusión 6xHis-Glk y también en presencia de sus sustratos (ATP, Mg²⁺ y glucosa). Concluido este proceso, se adicionó el anticuerpo monoclonal anti-Histidinas de ratón, posteriormente el anticuerpo anti-ratón acoplado a fosfatasa alcalina y finalmente se reveló con el sustrato de la fosfatasa. Se realizó el ensayo en geles desnaturizantes y no desnaturizantes al 7.5, 10 y 12.5% de acrilamida, esto con la idea de que en el ensayo se abarcaran proteínas de bajo y alto peso molecular.

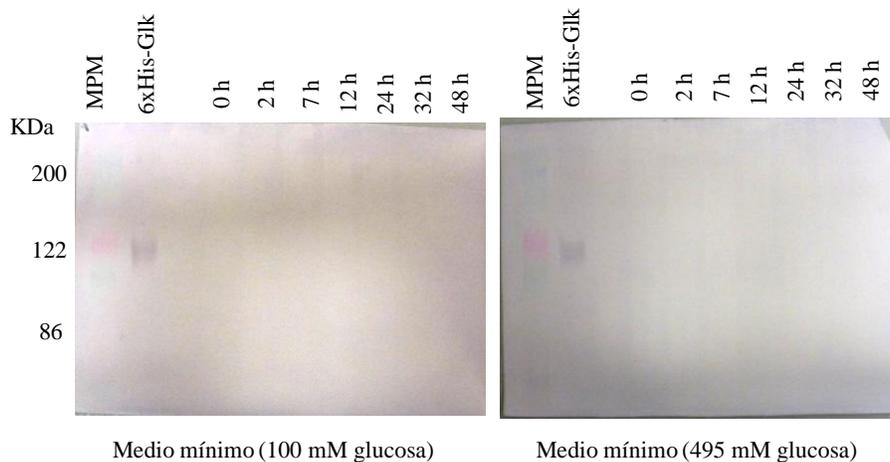


Figura 26. Análisis de interacciones proteínicas mediante la metodología de far-western. Se analizaron los extractos obtenidos del cultivo de *S. peucetius* var. *caesius* en MM en concentración baja (A) y alta de glucosa (B). Las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones no desnaturizantes, posteriormente transferidas a membranas de nitrocelulosa para realizar el ensayo de far-western. (A) Carril 1: marcador de peso molecular Caleidoscopio (BioRad). Carril 2: 6xHis-Glk. Carril 4: citosol 0 h. Carril 5: citosol 2 h. Carril 6: citosol 7 h. Carril 7: citosol 12 h. Carril 8: citosol 24 h. Carril 9: citosol 32 h. Carril 10: citosol 48 h. (B) Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: 6xHis-Glk. Carril 4: citosol 0 h. Carril 5: citosol 2 h. Carril 6: citosol 7 h. Carril 7: citosol 12 h. Carril 8: citosol 24 h. Carril 9: citosol 32 h. Carril 10: citosol 48 h.



La figura 26 muestra el far-western que se obtuvo con los extractos de *S. peucetius* var. *caesius* obtenidos en medio mínimo con 100 mM (A) y 495 mM (B) de glucosa bajo condiciones no desnaturizantes. Las membranas fueron incubadas con la proteína 6xHis-Glk y sus sustratos durante 12 h a 20°C. En el carril 2 de cada gel se corrió la proteína pura como control positivo. Bajo estas condiciones no se observó unión de Glk con alguna proteína contenida en los extractos de *S. peucetius* var. *caesius*.

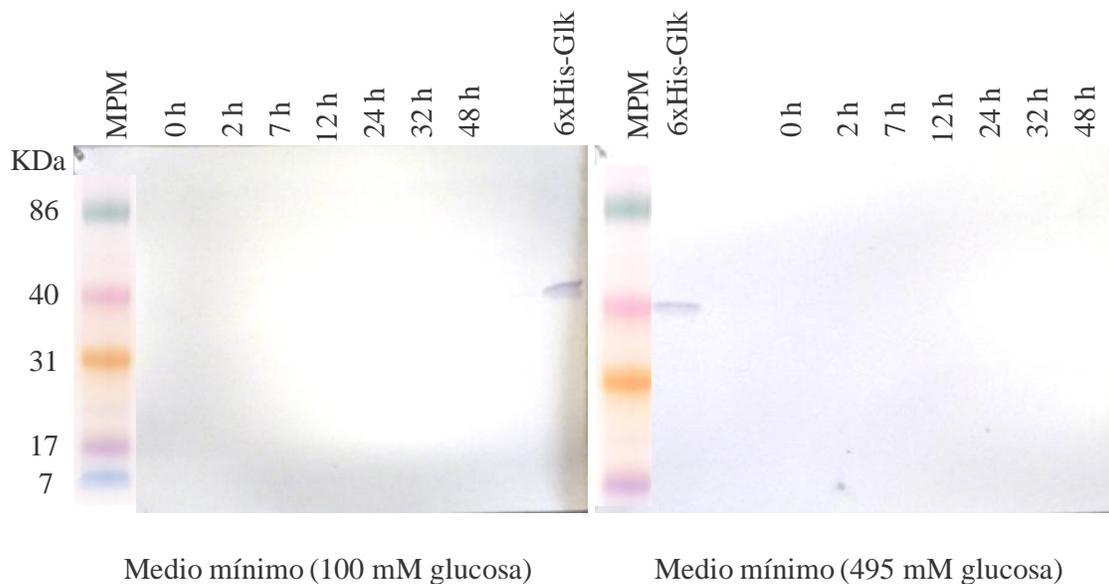


Figura 27. Análisis de interacciones proteínicas mediante la metodología de far-western. Se analizaron los extractos obtenidos del cultivo de *S. peucetius* var. *caesius* en MM en concentración baja (A) y alta de glucosa (B). Las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes, posteriormente transferidas a membranas de nitrocelulosa para realizar el ensayo de far-western. (A) Carril 1: marcador de peso molecular caleidoscopio. Carril 2: citosol 0 h. Carril 3: citosol 2 h. Carril 4: citosol 7 h. Carril 5: citosol 12 h. Carril 6: citosol 24 h. Carril 7: citosol 32 h. Carril 8: citosol 48 h. Carril 10: 6xHis-Glk. (B) far-western, gel 10%, 495 mM glucosa. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: 6xHis-Glk. Carril 4: citosol 0 h. Carril 5: citosol 2 h. Carril 6: citosol 7 h. Carril 7: citosol 12 h. Carril 8: citosol 24 h. Carril 9: citosol 32 h. Carril 10: citosol 48 h.

En la figura 27 se muestra el far-western obtenido en condiciones desnaturizantes en los que se analizaron los extractos y las condiciones descritos para la figura anterior. En el carril 10 (A) y 2 (B) se observa el control positivo 6xHis-Glk. Sin embargo, no se obtuvo señal de unión de Glk con alguna de las proteínas del citosol de *S. peucetius* var. *caesius*.

La proteína de fusión 6xHis-Glk clonada y purificada presentó actividad enzimática, en geles de acrilamida no desnaturizantes se observó que presenta un tamaño aproximado al correspondiente al tetrámero (resultados no mostrados) como fue reportado por Imriskova *et al.*, 2004. Se evaluaron



diferentes condiciones de incubación en las que se modificó la temperatura y la presencia de los sustratos de la Glk, se realizó el análisis en condiciones desnaturalizantes y no desnaturalizantes. En resumen, bajo esta metodología no se encontró ninguna proteína candidata de unión con la glucosa cinasa. Por ello, se decidió evaluar otra metodología de unión proteína-proteína, como lo es el ensayo de pull-down.

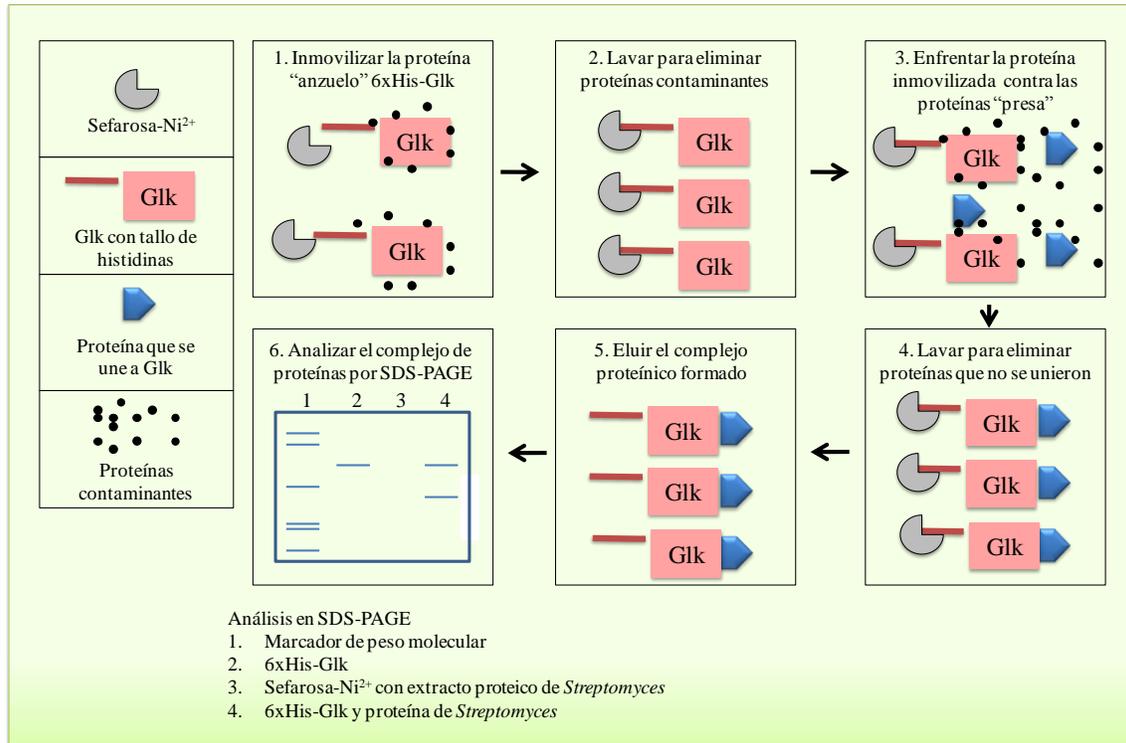


Figura 28. Ensayo de interacción proteína-proteína por la metodología de pull-down. Este ensayo consiste en inmovilizar la proteína que será usado como "anuelo" en una matriz inerte, después pasar el extracto proteínico que contiene las proteínas "presa" a través de la columna para que se lleve a cabo la unión, recuperar el complejo proteínico formado para su análisis e identificación por secuenciación. 1. En este caso se aprovecho el tallo de histidinas que tiene la Glk en el N-terminal para ser inmovilizada en sefarosa Ni²⁺. 2. Se lava la columna para eliminar proteínas contaminantes. 3. Se pasa el extracto citosólico de *S. peucetius* var. *caesius* que contiene las proteínas "presa". 4. Se lava para eliminar proteínas que no se unieron a la proteína "anuelo". 5. Se eluye el coplejo proteínico formado. 6. Se analiza en SDS-PAGE y se secuenciación para su identificación.

El fundamento de la metodología de pull-down es inmovilizar el complejo de proteínas que interaccionan en una columna de afinidad por la proteína "anuelo" que ha sido clonada (Figura 28). Después, el complejo proteínico es analizado en SDS-PAGE y posteriormente identificado mediante secuenciación.



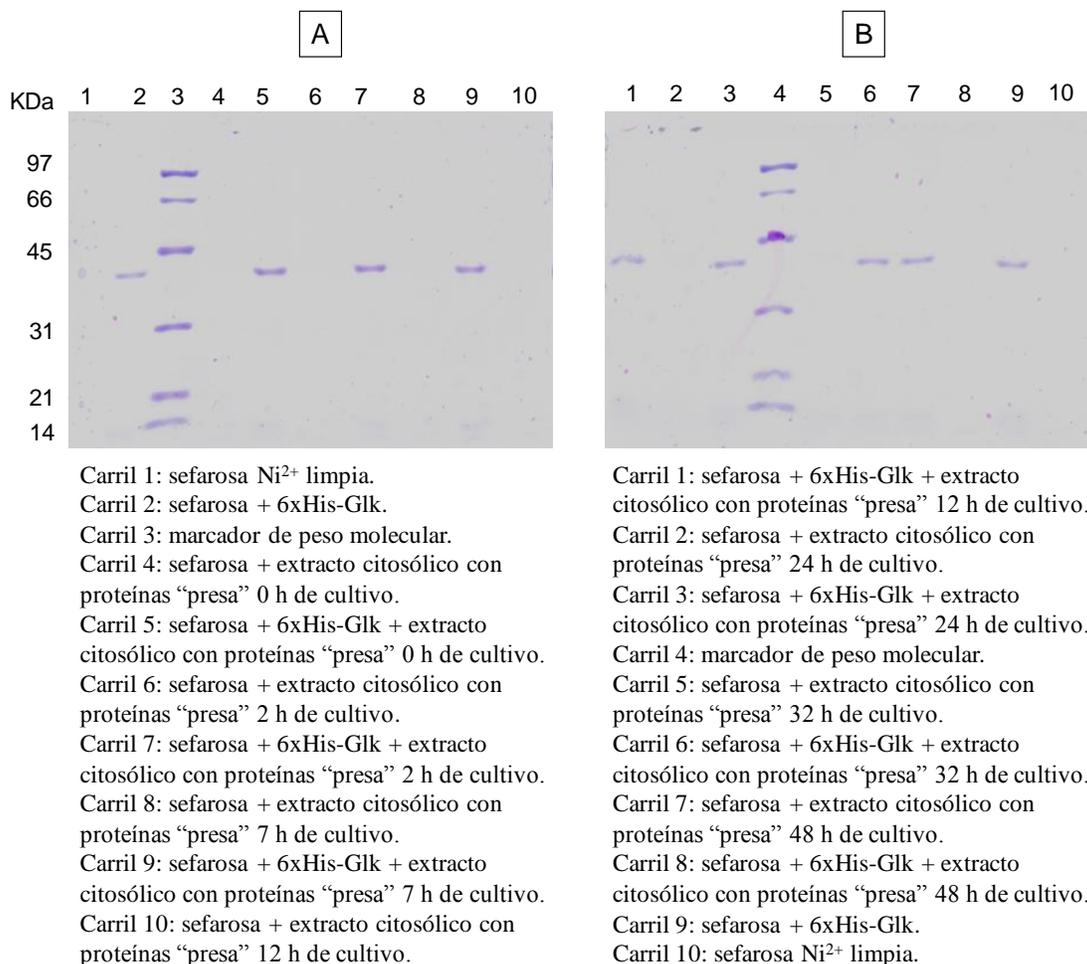


Figura 29. Ensayo de interacción proteína-proteína por pull-down. Los extractos de *S. peuceitius* var. *caesioides* enfrentados con la proteína “anzuelo” se obtuvieron del cultivo de *Streptomyces* en concentración baja de glucosa (100 mM). Los geles SDS-PAGE mostrados contienen el análisis de cada uno de los extractos obtenidos en los diferentes tiempos del cultivo evaluados con sus respectivos controles. Se analiza la matriz en la que fue inmovilizada la proteína “anzuelo” para corroborar que esté limpia de proteínas. Después se analiza la matriz que ya tiene unida la proteína “anzuelo” para verificar que sólo contenga esta proteína. También la matriz sin Glk que fue enfrentada al extracto citosólico que contiene las proteínas “presa” para evaluar la posibilidad de unión inespecífica de alguna proteína a la matriz. Finalmente, la matriz que tiene inmovilizada a la Glk y por la cual se hizo pasar el extracto citosólico que contiene las proteínas “presa”, si hay una interacción entre estas proteínas se espera observar una banda de diferente tamaño a Glk además de ésta o un aumento en el tamaño del corrimiento de Glk. Posteriormente para su identificación deberán ser secuenciadas.

Los extractos de *S. peuceitius* var. *caesioides* obtenidos en baja y alta concentración de glucosa fueron analizados por esta técnica. Los extractos citosólicos fueron los mismos evaluados por far-western obtenidos en medio mínimo con 100 mM y 495 mM de glucosa. La proteína 6xHis-Glk previamente purificada fue inmovilizada en sefarosa Ni²⁺, ésta fue repartida en volúmenes de 200 µL en columnas de



600 μ L. Después se pasó 1 mL del extracto citosólico que contenía las proteínas “presa” obtenido en diferentes tiempos del cultivo. Se realizó un lavado de 1 mL con solución de lavado (20 mM Na_2HPO_4 , 500 mM NaCl y 10 mM imidazol, pH 7.4) para eliminar las proteínas de unión inespecífica. Se tomó una muestra de la sefarosa que contenía el complejo proteínico formado, se adicionó solución de carga SDS 4x para ser analizado por SDS-PAGE. Lo que se observa en los carriles (A) 4, 6, 8, 10, (B) 3, 5, 7 y 9, es que ninguna proteína del estreptomiceto se une a la sefarosa Ni^{2+} libre. Sin embargo, los carriles que contienen 6xHis-Glk + el extracto citosólico con proteínas “presa”, tampoco presentan alguna proteína unida a Glk en ninguno de los tiempos de los cultivos evaluados. Por lo tanto, no se encontró ninguna proteína de unión con la glucosa cinasa en condiciones no represoras.

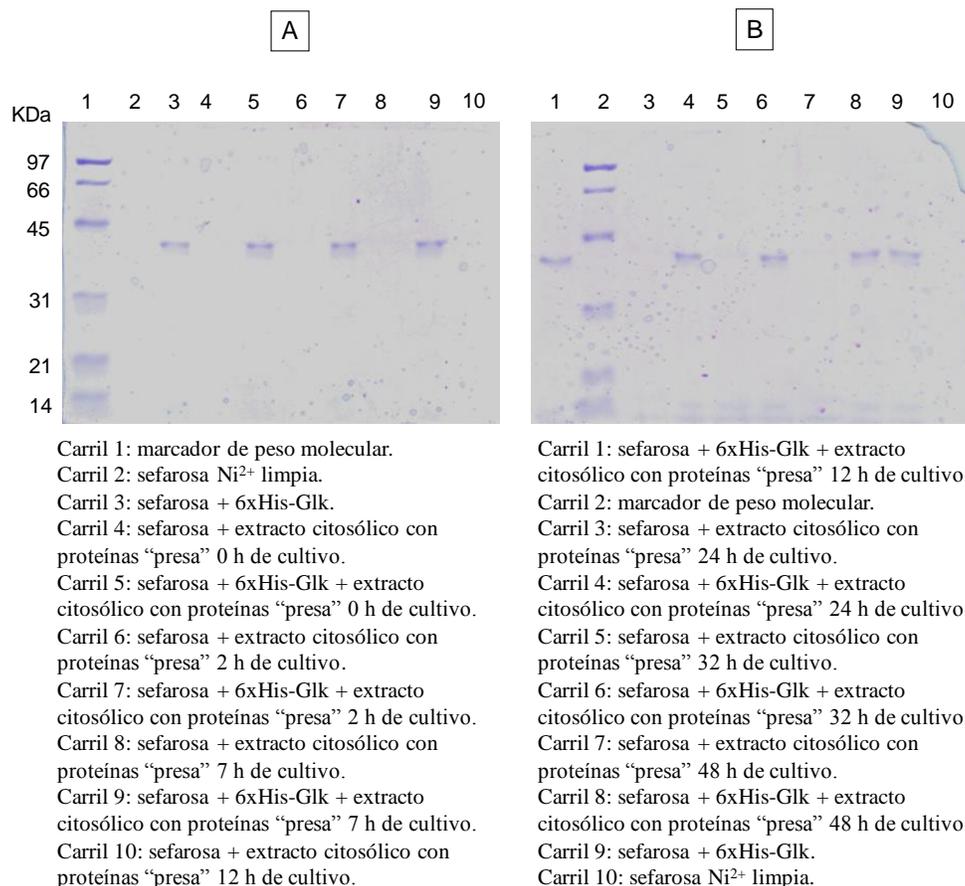


Figura 30. Ensayo de interacción proteína-proteína por pull-down. Los extractos de *S. peucetius* var. *caesius* enfrentados con la proteína “anzuelo” se obtuvieron del cultivo de *Streptomyces* en concentración baja de glucosa (100 mM). Los gels SDS-PAGE mostrados contienen el análisis de cada uno de los extractos obtenidos en los diferentes tiempos del cultivo evaluados con sus respectivos controles. Se analiza la matriz en la que fue inmovilizada la proteína “anzuelo” para corroborar que esté limpia de proteínas. Después se analiza la matriz que ya tiene unida la proteína “anzuelo” para verificar que sólo contenga esta proteína. También la matriz sin Glk que fue enfrentada al extracto citosólico que contiene las proteínas “presa” para evaluar la posibilidad de



unión inespecífica de alguna proteína a la matriz. Finalmente, la matriz que tiene inmovilizada a la Glk y por la cual se hizo pasar el extracto citosólico que contiene las proteínas “presa”, si hay una interacción entre estas proteínas se espera observar una banda de diferente tamaño a Glk además de ésta o un aumento en el tamaño del corrimiento de Glk. Posteriormente para su identificación deberán ser secuenciadas.

En la figura 30 se muestra el análisis del pull-down realizado con los extractos obtenidos en medio mínimo con 495 mM de glucosa. En este caso, en algunos de los carriles se observa una pequeña banda por debajo de la correspondiente a 6xHis-Glk. La banda de menor peso y la de Glk fueron secuenciadas a partir de los geles mostrados en la figura 30 en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM. La identificación de las proteínas se realizó mediante LC/ESI-MS/MS.

Las proteínas fueron extraídas del gel SDS teñido con azul de coomasie, posteriormente fueron digeridas con tripsina de porcino (Promega, Madison, WI). Los péptidos obtenidos fueron analizados mediante espectrometría de masas en tándem usando un espectrómetro 3200 Q TRAP (Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord, ON, Canada). Se realizó la búsqueda e identificación de los péptidos con los datos del espectro MS/MS usando el servicio en web del algoritmo MASCOTA (versión 1.6b9, Matrix Science, London, U.K.)

Las secuencias analizadas revelaron que las dos bandas observadas en el gel SDS del pull-down (Figura 31) corresponden a la Glk de *S. peucetius* var. *caesius*.

```
1  MGLTIGVDIG  GTKIAAGVVD  EEGNILSTFK  VPTPTTPQAI  VDAIAAAVEG  AR  AGHEIVGV
61  GIGAAGYVNR  QRSTVYFAPN  IDWRQEPLKE  EVEARVGLPV  VVENDANAAA  WGEYKFGAGK
121 GHRNVICITL  GTGLGGGIII  GNKLRRGHFG  VAAEFGHIRM  VPDGLLCGCG  SQGCWEQYAS
181 GRALVRYAKQ  RANATPENAD  ILLSLGDGTP  DGIEGKHISM  AARQGDPVAV  DSYRELARWA
241 GAGLADLASL  FDPSAFIVGG  GLSDEGELVL  DPIRKSYSYKRW  LVGGNWRPVA  DVIAARLGND
301 AGLVGAADLA  REPDPIM
```

Figura 31. Secuenciación de Glk. Secuencia peptídica de la glucosa cinasa de *Streptomyces peucetius* var *caesius* (gij50263006). Encasilladas se muestran las secuencias de los péptidos detectados en el proceso de secuenciación.

Estos resultados indican que lo que observamos en el gel SDS como dos bandas, corresponden a la secuencia de Glk *S. peucetius* var. *caesius*. Sin embargo, el efecto de observar 2 bandas pueda deberse a que 6xHis-Glk presentará cierta degradación o simplemente por la forma en que corrieron las proteínas en esos geles en particular.



Resumiendo, bajo las condiciones evaluadas en cada metodología de interacción proteína-proteína, no se encontró alguna proteína que establezca una unión fuerte y estable con la glucosa cinasa de *S. peucetius* var. *caesius*.

Hasta el momento se conoce muy poco acerca del papel que la glucosa cinasa de este microorganismo desempeña en el proceso de RCC.

van Wezel y colaboradores (2007) proponen que la actividad enzimática de Glk está dada por la Glk y por dos isoformas de esta proteína observadas en western-blot. Realizaron un seguimiento de la presencia y actividad de Glk a lo largo de cultivos de *S. coelicolor* en medio mínimo complementado con casaminoácidos y como fuente de carbono glucosa o manitol. Encontraron que en ambas condiciones se encontraba presente la Glk a lo largo del crecimiento, observado por western-blot. En el caso de manitol la actividad encontrada fue de apenas 5 nmol/min mg, incrementándose hasta 200 nmol/min mg en la fase estacionaria. No así para el cultivo que contiene glucosa, donde la actividad fue incrementando con el tiempo hasta alcanzar un máximo de 450 nmol/min mg a mitad de la fase exponencial, a partir de aquí se observó un descenso hasta 200 nmol/min mg. Los mismos extractos fueron analizados por western-blot, observaron que en presencia de glucosa se presentan dos proteínas de menor tamaño a Glk a lo largo de todo el crecimiento, que se piensa corresponden a isoformas de Glk. El pico de actividad observado en el cultivo con glucosa fue correlacionado con un aumento en la proporción de las isoformas de Glk, las cuales no fueron observadas en presencia de manitol (fuente de carbono no represora).

De este trabajo proponen que la Glk pueda estar sujeta de algún procesamiento proteolítico o de alguna modificación post-traducciona l como fosforilación que la module quizá activándola, para que lleve a cabo su actividad catalítica o incluso que sea necesaria para que lleve a cabo su papel de regulación en el proceso de RCC en *Streptomyces* (van Wezel *et al.*, 2007).

Se reportó que la Glk de *S. lividans* se encuentra asociada a membrana en presencia de glucosa en el medio de cultivo, lo que los llevó a pensar que quizá se une al transportador de glucosa (GlcP), dicha hipótesis fue apoyada al observar que aumentaba la proporción de Glk asociada a membrana al sobre-expresar el transportador de membrana en la cepa silvestre de *S. lividans* (van Wezel *et al.*, 2007). De estos resultados los autores proponen un modelo como mecanismo de regulación de la Glk sobre la RCC.



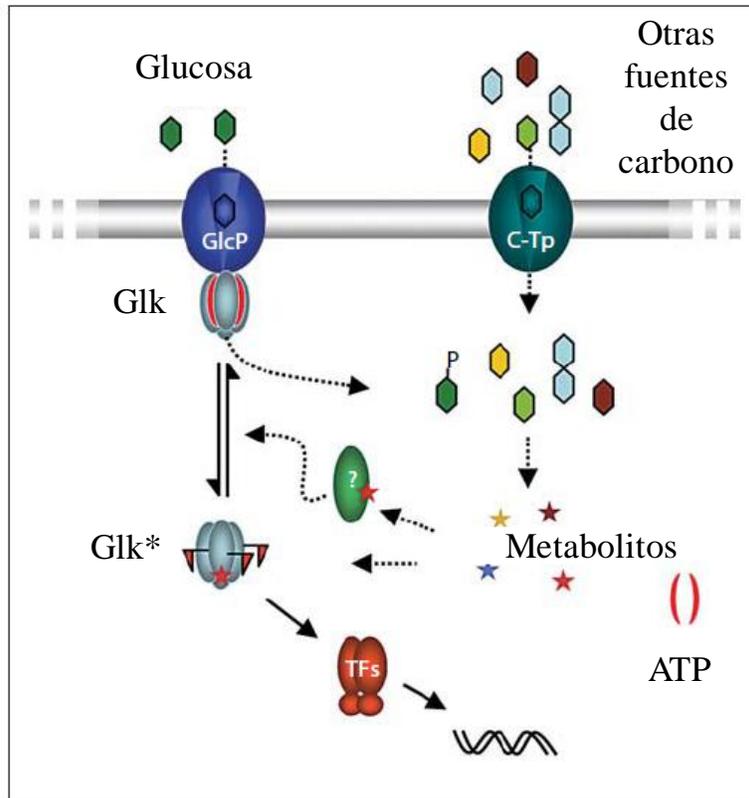


Figura 32. Propuesta de modelo para la función de Glk. La Glk se une al transportador de glucosa (GlcP) en presencia de glucosa para fosforilar al azúcar conforme va entrando en la célula y formar glucosa 6-fosfato. La glucosa y otras fuentes de carbono que entran por medio de otros transportadores específicos para azúcares (C-Tp), generan metabolitos durante su catabolismo. Estos metabolitos pueden activar a la Glk (Glk*) o a una proteína sensora necesaria para la modificación post-traduccional de la Glk. La Glk* modificada interactúa con factores transcripcionales (como MalR, GylR, BldB, etc.) para así regular la RCC en *Streptomyces* (Tomado y modificado de van Wezel *et al.*, 2007)

El modelo propone que la Glk se une a GlcP para llevar a cabo el transporte e inminente fosforilación de la glucosa entrante. El catabolismo de la glucosa y de otros azúcares que entren por transportadores específicos para carbohidratos (C-Tp) genera metabolitos que puedan estar modificando a la Glk o que activen a otra proteína sensora necesaria para la modificación post-traduccional sobre Glk. Una vez modificada la Glk* puede interactuar con factores transcripcionales como los represores del operón de maltosa (MalR) o de glicerol (GylR) y de esta forma estar regulando el proceso de RCC en *Streptomyces*.

Esto podría explicar el por qué no se identificó ninguna proteína que pueda interactuar con la proteína de fusión que evaluamos en este trabajo. Quizá la Glk requiera de alguna modificación para establecer una unión con otra proteína, modificación que no pueda generarse en *E. coli*, microorganismo usado para



la clonación de la proteína 6xHis-Glk. Para probarlo sería necesario obtener la proteína de fusión con tallo de histidinas en alguna mutante de *Streptomyces* que no tenga Glk para que se lleve a cabo cualquier modificación que sea necesaria para el efecto de regulación y repetir los ensayos de interacción entre proteínas.

La resonancia de plasmones de superficie que permitió a Mahr y colaboradores (2000) detectar la unión de la Glk de *S. coelicolor* con una o algunas proteínas, es una técnica que permite identificar interacciones momentáneas además de las interacciones estables. Las metodologías de interacción proteína-proteína evaluadas en este trabajo difícilmente dan resultado ante una interacción momentánea, detectan aquellas interacciones que son muy estables. Esto nos puede dar una pista de que posiblemente las interacciones que la Glk establezca con alguna o algunas proteínas sea momentánea o que quizá la Glk pueda estar actuando como proteína sensora que desencadene una serie de interacciones entre otras proteínas que regulan directamente el proceso de RCC para *Streptomyces*. Para comprobar que la Glk de *S. peucetius* var. *caesius* establece unión con una o varias proteínas sería necesario realizar ensayos que permitan detectar interacciones momentáneas como la resonancia de plasmones de superficie o el cross-linking (Tang X y Bruce J, 2010).

Por otra parte, los extractos de *S. coelicolor* analizados en la metodología de resonancia de plasmones de superficie se obtuvieron de crecer a *S. coelicolor* en medio rico TSB (Tryptic Soy Broth) complementado con glucosa (Mahr *et al.*, 2000). Nosotros decidimos obtener los extractos de *S. peucetius* var. *caesius* crecido en medio mínimo complementado con glucosa, donde también se ha observado RCC, con la intención de observar la diferencia dada por la glucosa presente en condiciones represoras (495 mM) y no represoras (100 mM) en cuanto a las proteínas que se unen a Glk en una y otra condición evaluadas. Evitar la interferencia de algún otro componente en el medio que pudiera estar afectando la respuesta que la glucosa da en la RCC. Es posible que bajo las condiciones que obtuvimos los extractos con las proteínas “presa” se encuentren en menor proporción con respecto a lo que se obtiene en un medio de cultivo rico donde la bacteria tiene mayor crecimiento generando una mayor proporción de las proteínas “presa”. Sería necesario evaluar la posible interacción de Glk de *S. peucetius* var. *caesius* mediante la metodología de resonancia de plasmones de superficie creciendo a la bacteria en medio mínimo y en el medio TSB complementado con glucosa y ver si hay o no diferencia en la respuesta.

Se reportó que la Glk de *S. coelicolor* se expresa de forma constitutiva (Imriskova *et al.*, 2005; van Wezel *et al.*, 2007) pero que requiere de glucosa para que tenga actividad enzimática (van Wezel *et al.*, 2007) y que su estructura nativa es en forma de homotetrámero el cual es muy estable (Imriskova *et al.*, 2005). No así con la glucosa cinasa de *S. peucetius* var. *caesius*, cuya expresión se ve inducida por la presencia



de glucosa y su estructura como homotetrámero es muy inestable, requiere de glucosa para mantener su conformación. Es posible que sea necesario que la Glk de *S. peucetius* var. *caesius* mantenga la estructura de homotetrámero para que pueda establecer la unión con otras proteínas o para que pueda ser modificada y posteriormente establecer la unión proteínica. Aunque se observó que la proteína de fusión 6xHis-Glk aparentemente se encontraba en forma de homotetrámero, quizá durante el desarrollo de las metodologías pull-down y far-western se llegaba a perder la conformación. Para saberlo sería necesario establecer el estado de oligomerización de la Glk de *S. coelicolor* cuando se une a otras proteínas, esta determinación podría realizarse mediante la metodología de dicroísmo circular (Dodero *et al.*, 2011).

Se evaluó la interacción proteína-proteína de la Glk de *S. peucetius* var. *caesius* bajo diferentes condiciones mediante dos métodos diferentes. Se trató de mantener las condiciones más cercanas a las fisiológicas y no se encontró alguna proteína que pueda unirse a Glk bajo las condiciones evaluadas. Sin embargo, esto no descarta la posibilidad de que la Glk se una a alguna proteína y que sea así como ejerza su efecto regulador, dada su aparente imposibilidad para unirse a ADN. Es posible que la interacción sea intermitente y débil, y que por ello no haya podido ser detectada por los métodos evaluados o es posible que las proteínas con las que interacciona se encuentren en membrana, tal como lo sugiere van Wezel *et al.*, 2005, las cuales no fueron incluidas en este trabajo.



9. CONCLUSIONES

Los ensayos de pull-down y far-western de la glucosa cinasa de *S. peucetius* var. *caesius* no mostraron alguna interacción proteínica bajo las condiciones evaluadas. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que la glucosa cinasa de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* ejerza su efecto regulador en el proceso de RCC uniéndose a otras proteínas si la interacción es débil o transitoria.

El no encontrar evidencia de unión proteínica con la glucosa cinasa podría deberse a que:

1. La glucosa cinasa de *S. peucetius* var. *caesius* no establece ninguna interacción proteica necesaria para regular el proceso de represión catabólica por carbono,
2. La interacción proteínica la realice con alguna proteína de membrana, no analizada en este trabajo,
3. Al purificar la glucosa cinasa a partir de un sistema heterólogo como *E. coli*, no le permite ser sujeta de la modificación post-traducciona necesaria para establecer la interacción con otra proteína.
4. Bajo las condiciones que se obtuvieron los extractos citosólicos de *S. peucetius* var. *caesius* no se hayan generado las proporciones de las proteínas “presa” necesarias para ver la interacción proteínica en los métodos evaluados,
5. Que la interacción proteínica sea débil y transitoria.

10. PERSPECTIVAS

- Verificar que la Glk de *S. peucetius* var. *caesius* establece una interacción proteínica con otra u otras proteínas como lo hace la Glk de *S. coelicolor*.
- Obtener la proteína de fusión 6xHis-Glk en algún *Streptomyces* que no tenga Glk para que se lleve a cabo la modificación post-traducciona en caso de que sea necesaria para el proceso de regulación de la RCC.
- Realizar los ensayos de interacción proteína-proteína evaluando las proteínas de membrana de *S. peucetius* var. *caesius*.
- Realizar el ensayo de interacción proteína-proteína mediante otra metodología que permita detectar interacciones débiles y momentáneas como el cross-linking o la resonancia de plasmones de superficie.



11. ANEXO I

11.1 Plásmido pBAD/HisB (Invitrogen)

El plásmido pBAD/His es derivado del vector de expresión pBR322. Usa el promotor *araBAD* (P_{BAD}) de *E. coli*. La proteína reguladora de este promotor (AraC) se encuentra codificada dentro del mismo plásmido. Los principales elementos que constituyen a pBAD/HisB (4092 pb) son:

Tabla VIII. Características del plásmido pBAD/HisB.

Característica	Ventaja
Promotor <i>araBAD</i> (P_{BAD})	Da un estricto nivel de regulación de la expresión del gen heterólogo.
Optimización del sitio de unión a ribosoma	Incrementa la eficiencia en la expresión de la proteína de fusión heteróloga.
Codón de inicio ATG	Provee de un sitio de iniciación para la traducción de la proteína de fusión.
Tallo de polihistidinas ubicado en el N-terminal	La proteína de fusión adquiere afinidad de unión a metales, facilitando su purificación e identificación.
Epitome Anti-Xpress (Asp-Leu-Tyr-Asp-Asp-Asp-Lys)	Permite la identificación de la proteína de fusión con el anticuerpo Anti-Xpress.
Sitio de corte de la enteroquinasa (Asp-Asp-Asp-Asp-Lys)	Permite remover el tallo de histidinas de la proteína de fusión.
Sitio múltiple de clonación	Permite la inserción del gen que será expresado.
Región de termino de la transcripción <i>rrnB</i>	Región fuerte de terminación de la transcripción.
Gen β -lactamasa, resistencia a ampicilina	Permite la selección de las células de <i>E. coli</i> que adquirieron el plásmido.
Origen pBR322	Bajo número de copias.
Gen <i>arac</i>	Codifica para la proteína que regula el promotor P_{BAD} .



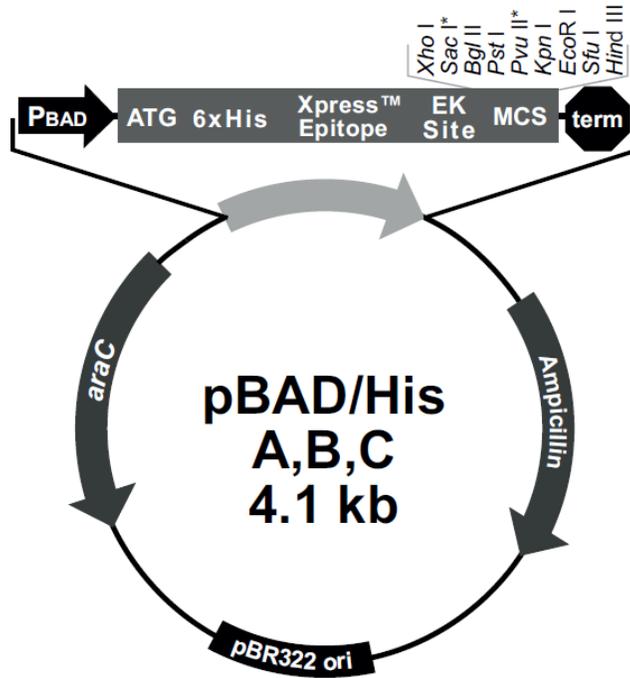


Figura 33. Mapa del plásmido pBAD/HisB.



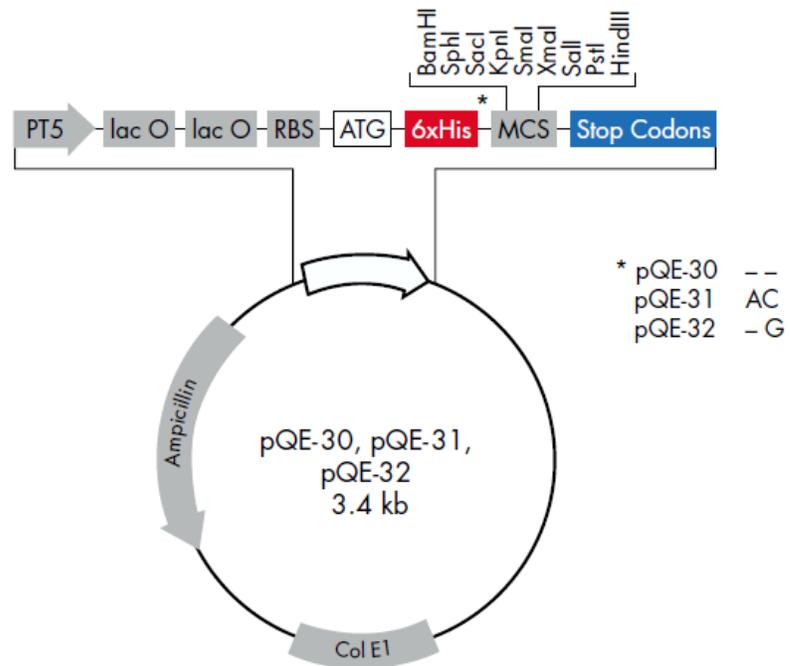
11.2 Plásmido pQE31 (Qiagen)

El plásmido pQE pertenece a la familia de vectores pDS, de bajo número de copias. Basado en el sistema de transcripción-traducción dado por el promotor T5.

Tabla IX. Características del plásmido pBAD/HisB.

Característica	Ventaja
Promotor de fago T5	Altamente reconocido por la ARN polimerasa de <i>E. coli</i> .
Dos secuencias del operador <i>lac</i>	Da lugar a una represión más fuerte sobre el promotor T5.
Sitio de unión a ribosoma RBSII	Aumenta la eficiencia durante la traducción.
Tallo de polihistidinas ubicado en el N-terminal	La proteína de fusión adquiere afinidad de unión a metales, facilitando su purificación e identificación.
Sitio múltiple de clonación	Permite la inserción del gen que será expresado.
Codones de paro en cualquier marco de lectura	Región fuerte de terminación de la transcripción.
Terminadores de la transcripción <i>to</i> del fago lambda y <i>rmB</i> de <i>E. coli</i> .	Estabilizan la expresión de la construcción.
Gen β -lactamasa, resistencia a ampicilina	Permite la selección de las células de <i>E. coli</i> que adquirieron el plásmido.
Origen de replicación ColEI	





pQE-31

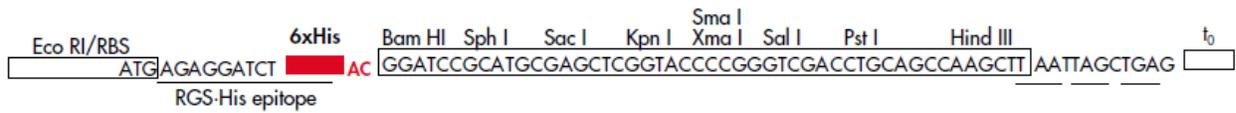


Figura 34. Mapa del plásmido pQE31.



12. REFERENCIAS

- Angell S, Schwarz E y Bibb M (1992) **The glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor* A3 (2): its nucleotide sequence, transcriptional analysis and role in glucose repression.** Mol. Microbiol. 6: 2833-2844.
- Angell S, Lewis C, Buttner M y Bibb M (1994) **Glucose repression in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) a likely regulatory role for glucose kinase.** Mol. Gen. Genet. 244:135-43.
- Beppu T (1992) **Secondary metabolites as chemical signals for cellular differentiation.** Gene. 15; 115(1-2): 159-65.
- Bettenbrock K, Sauter T, Jahreis K, Kremling A, Lengeler J y Gilles E (2007) **Correlation between growth rates, EllACrr phosphorylation, and intracellular cyclic AMP levels in *Escherichia coli* K-12.** J Bacteriol. 189(19):6891-6900.
- Brückner R y Titgemeyer F (2002) **Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization.** FEMS Microbiol. Lett. 209: 141-148.
- Busby S y Ebright R (1999) **Transcription activation by catabolite activator protein (CAP).** J. Mol. Biol. 22; 293(2):199-213.
- Butler MJ, Deutscher J, Postma PW, Wilson TJ, Galinier A y Bibb MJ (1999) **Analysis of a ptsH homologue from *Streptomyces coelicolor* A3(2).** FEMS Microbiol. Lett. 177: 279-288.
- Chater KF (1998) **Taking a genetic scalpel to the *Streptomyces* colony.** Microbiol. 144, 1465-1478.
- Chater KF (2006) ***Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics.** Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 361 (1469): 761-768.
- Collier D, Hager P y Phibbs P (1996) **Catabolite repression control in the *Pseudomonas*.** Res. Microbiol. 147(6-7):551-61.
- Commichau FM y Stülke J (2008) **Trigger enzymes: bifunctional proteins active in metabolism and in controlling gene expression.** Mol. Microbiol. 67(4): 692-702.
- Conejo M, Thompson S y Miller B (2010) **Evolutionary Bases of Carbohydrate Recognition and Substrate Discrimination in the ROK Protein Family.** J Mol Evol. 70:545-556.
- Dodero V, Quirolo Z y Sequeira M (2011) **Biomolecular studies by circular dichroism.** Front. Biosci. 1; 16:61-73.
- Escalante L, Ramos I, Imriskova I, Langley E y Sánchez S (1999) **Glucose repression of anthracycline formation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*** Appl. Microbiol. Biotechnol. 52: 572-578.
- Görke B y Stülke J (2008) **Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients.** Nat. Rev. Microbiol. 6(8): 613-624.



Goodfellow M y O'Donell A (1992) **Search and discovery of industrially-significant actinomycetes.** In: **Microbial Products: New Approaches** (S. Baumberg, I.S. Hunter and P. M. Rhodes, eds) pp.343-383. Cambridge University Press, Cambridge.

Guzmán S, Ramos I, Moreno E, Ruiz B, Rodríguez-Sanoja R, Escalante L, Langley E y Sánchez S (2005a) **Sugar uptake and sensitivity to carbon catabolite regulation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 69(2):200-2006.

Guzmán S, Carmona A, Escalante L, Imriskova I, López R, Rodríguez-Sanoja R, Ruiz B, Servín-González L, Sánchez S y Langley E (2005b) **Pleiotropic effect of the SCO2127 gene on the glucose uptake, glucose kinase activity and carbón catabolite repression in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*.** Microbiology. 151(Pt 5): 1717-1723.

Halbedel S, Eilers H, Jonas B, Busse J, Hecker M, Engelmann S y Stülke J (2007) **Transcription in *Mycoplasma pneumoniae*: analysis of the promoters of the ackA and Idh genes.** J. Mol. Biol. 17; 371(3):596-607.

Hodgson DA (1982) **Glucose repression of carbon source uptake and metabolism in *Streptomyces coelicolor*.** J. Gen. Microbiol. 128: 2417-2430.

Hodgson DA (2000) **Primary metabolism and its control in Streptomyces: a most unusual group of bacteria.** Adv. Microb. Physiol. 42:47-238.

Hogema B, Arents J, Bader R, Eijkemans K, Yoshida H, Takahashi H, Aiba H y Postma P (1998) **Inducer exclusion in *Escherichia coli* by non-PTS substrates: the role of the PEP to pyruvate ratio in determining the phosphorylation state of enzyme IIAGlc.** Mol. Microbiol. 30(3):487-98.

Hopwood D (2000). **Practical *Streptomyces* Genetics I**, p.3 Printed by Crowes, Norwich.

Ikeda H, Seno E, Bruton C y Chater K (1984) **Genetic mapping, cloning and physiological aspects of the glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor*.** Mol. Gen. Genet. 196: 501-507.

Imriskova I, Langley E, Arreguin R, Aguilar G y Sánchez S (2001) **Rapid purification and characterization of glucose kinase from *Streptomyces peucetius* var. *caesius*.** Arch. Biochem. Biophys. 394: 137-144.

Imriskova I, Arreguin R, Guzmán S, Rodríguez R, Langley E y Sánchez S (2005) **Biochemical characterization of the glucose kinase from *Streptomyces coelicolor* compared to *Streptomyces peucetius* var. *caesius*.** Res. Microbiol. 156: 361-366.

Jones B, Dossonnet V, Küster E, Hillen W, Deutscher J y Klevit R (1997) **Binding of the catabolite repressor protein CcpA to its DNA target is regulated by phosphorylation of its corepressor HPr.** J. Biol. Chem. 17;272(42):26530-5.

Kawai S, Mukai T, Mori S, Mikami B y Murata K (2005) **Hypothesis: structures, evolution, and ancestor of glucose kinases in the hexokinase family.** J. Biosc. Bioeng. 4: 320-330.

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



Larion S, Moore L, Thompson S y Miller B (2007) **Divergent evolution of function in the ROK sugar kinase superfamily: role of enzyme loops in substrate specificity.** Biochem. 46: 13564-13572.

Martin JF y Demain AL (1980) **Control of antibiotic biosynthesis.** Microbiol. Rev. 44(2): 230-251.

Mascareñas N (2005) **Clonación del gen de la glucose cinasa de *Streptomyces peucetius* var. *caesius*.** Tesis para obtener el título de Química Farmacéutica Bióloga. UNAM. Facultad de Química.

Mahr K, van Wezel G, Svensson C, Kregel U, Bibb MJ y Titgemeyer F (2000) **Glucose kinase of *Streptomyces coelicolor* A3 (2): large-scale purification and biochemical analysis.** Anton. Leeuw. Int J. G. 78: 253-261.

Mahr K y Titgemeyer F (2001) **Carbon metabolism in *Streptomyces coelicolor*. A molecular view to glucose kinase and its role in carbon regulation and glucose transport.** Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg. 100 s.

Nessler S, Fieulaine S, Poncet S, Galinier A, Deutscher J y Janin J (2003) **HPr kinase/phosphorylase, the sensor enzyme of catabolite repression in Gram-positive bacteria: structural aspects of the enzyme and the complex with its protein substrate.** J. Bacteriol. 185(14):4003-10.

Nicholson T, Chiu K y Stephens R (2004) **Chlamydia trachomatis lacks an adaptive response to changes in carbon source availability.** Infect. Immun. 72(7):4286-9.

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

Parche S, Schmid R y Titgemeyer F (1999) **The phosphotransferase system (PTS) of *Streptomyces coelicolor* identification and biochemical analysis of a histidine phosphocarrier protein HPr encoded by the gene ptsH.** Eur. J. Biochem. 265: 308-317.

Parche S, Beleut M, Rezzonico E, Jacobs D, Arigoni F, Titgemeyer F y Jankovic I (2006) **Lactose-over-glucose preference in *Bifidobacterium longum* NCC2705: glcP, encoding a glucose transporter, is subject to lactose repression.** J. Bacteriol. 188(4):1260-5.

Phyzicky E y Fields S (1995) **Protein-Protein Interactions: Methods for detection and Analysis.** Microbiol Rev. 59(1):94-123.

Pimentel-Schmitt F, Thomae A, Amon J, Klieber M, Roth H, Muller Y, Jahreis K, Burkovski A y Titgemeyer F (2007) **A glucose kinase from *Mycobacterium smegmatis*.** J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 12: 75-81.

Pope MK, Green BD y Westpheling J (1996) **The *bld* mutants of *Streptomyces coelicolor* are defective in the regulation of carbon utilization, morphogenesis and cell-cell signaling.** Mol. Microbiol. 19: 747-756.



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

Rehm H. **Protein biochemistry and proteomics**. Ed. Academic Press. 2006.

Sánchez S, Chávez A, Forero A, García Y, Romero A, Sánchez M, Rocha D, Sánchez B, Ávalos M, Guzmán S, Rodríguez R, Langley E y Ruíz B (2010) **Carbon source regulation of antibiotic production. J. Antibiot. 63(8): 442-459.**

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

Seno E y Chater K (1983) **Glycerol catabolic enzymes and their regulation in wild-type and mutant strains of *Streptomyces coelicolor* A3 (2)**. J. Gen. Microbiol. 129: 1403-13.

Stülke J y Hillen W (1999) **Carbon catabolite repression in bacteria**. Curr. Opin. Microbiol. 2(2):195:201.

Tang X y Bruce J (2010) **A new cross-linking strategy: protein interaction reporter (PIR) technology for protein-protein interaction studies**. Mol. Biosyst. 6(6):939-47.

Titgemeyer F, Reizer J, Reizer A y Saier MH (1994) **Evolutionary relationships between sugar kinases and transcriptional repressors in bacteria**. Microbiol. 140 (Pt 9): 2349-2354.

Titgemeyer F, Walkenhorst J, Reizer J, Stuver M, Cui X y Saier M (1995) **Identification and characterization of phosphoenolpyruvate: fructose phosphotransferase systems in three *Streptomyces* species**. Microbiology, 141, 51-58.

Titgemeyer F y Hillen W (2002) **Global control of sugar metabolism: a Gram-positive solution**. Antonie Van Leeuwenhoek. 82: 59-71.

van den Bogaard P, Kleerebezem M, Kuipers O y de Vos WM (2000) **Control of lactose transport, beta-galactosidase activity, and glycolysis by CcpA in *Streptococcus thermophilus*: evidence for carbon catabolite repression by a non-phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system sugar**. J. Bacteriol. 182(21):5982-9.

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

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

van Wezel G, König M, Mahr K, Nothhaft H, Thomae A, Bibb M y Titgemeyer F (2007) **A new piece of an old jigsaw: glucose kinase is activated posttranslationally in glucose transport-dependent manner in *Streptomyces coelicolor* A3 (2)**. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 12: 67-74.



Vining LC (1992) **Secondary metabolism, inventive evolution and biochemical diversity--a review.** Gene. 15: 155(1-2): 135-140.

Wang F, Xiao X, Saito A y Schrempf H (2002) ***Streptomyces olivaceoviridis* possesses a phosphotransferase system that mediates specific, phosphoenolpyruvate dependent uptake of N-acetylglucosamine.** Mol. Genet. Genom. 268: 344-351.

Williamson M y Sutcliffe m (2010) **Protein-protein interactions.** Biochem. Soc. Trans. 38: 875-878.

Warner J y Lolkema J (2003) **CcpA-dependent carbon catabolite repression in bacteria.** Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67(4):475-90.

Yoshida K, Kobayashi K, Miwa Y, Kang C, Matsunaga M, Yamaguchi H, Tojo S, Yamamoto M, Nishi R, Ogasawara N, Nakayama T y Fujita Y (2001) **Combined transcriptome and proteome analysis as a powerful approach to study genes under glucose repression in *Bacillus subtilis*.** Nucleic. Acids. Res. 1; 29(3):683-92.

