



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Caracterización preliminar de la glucosa cinasa  
dependiente de polifosfato de  
*Streptomyces peucetius* var. *caesius***

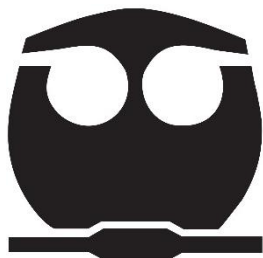
**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**P R E S E N T A:**

**HERNÁNDEZ CORDERO BERENICE**



Ciudad Universitaria, Cd. Mx. 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profa. Amelia María de Guadalupe Farrés González Sarabia

**VOCAL:** Profa. Martha Giles Gómez

**SECRETARIO:** Profa. Beatriz Ruiz Villafán

**1er. SUPLENTE:** Profa. Carmina Montiel Pacheco

**2° SUPLENTE:** Prof. Genaro Jiménez Reyes

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:** Esta tesis se realizó en el Laboratorio del Dr. Sergio Sánchez Esquivel, en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

### **ASESOR DEL TEMA**

**Dra. Beatriz Ruiz Villafán**

---

### **SUPERVISOR TÉCNICO**

**Dr. Sergio Sánchez Esquivel**

---

### **SUSTENTANTE**

**Berenice Hernández Cordero**

---

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Sergio Sánchez Esquivel por todo su apoyo y confianza.

A la Dra. Beatriz Ruiz Villafán por haber compartido sus conocimientos conmigo y ser una tutora invaluable.

Al CONACyT por la beca de ayudante de investigación proporcionada durante todo el proyecto.

Esta tesis fue realizada con el apoyo del proyecto de PAPIIT IN205519.

Agradezco a la Dra. Romina Rodríguez por sus comentarios críticos a este trabajo y por el préstamo del equipo FPLC para los ensayos de purificación.

Agradezco al Dr. Daniel Alejandro Guillén Santos por su asesoría y apoyo para la realización de los ensayos de purificación con el equipo FPLC.

# ÍNDICE

	Página
1. Índice	1, 2
1.1 Índice de figuras	3
1.2 Índice de tablas	4
2. Abreviaturas	5
3. Resumen	6
4. Introducción	7
5. Antecedentes	
5.1 Definición y clasificación de las glucosa cinasas	8
5.2 Importancia de la glucosa cinasa en el género <i>Streptomyces</i>	9
5.3 Trabajos de purificación de ATP-Glk en <i>Streptomyces</i>	10
5.4 Trabajos con PP-Glk en <i>Streptomyces</i>	12
6. Justificación	15
7. Hipótesis	15
8. Objetivo	15
9. Diseño experimental	
9.1 Cepas y medios de cultivo	16
9.2 Clonación del gen <i>ppglk</i>	16
9.3 Fermentación de <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i>	17
9.4 Preparación del extracto libre de células	18
9.5 Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	18
9.6 Determinación de la actividad de PP-Glk	18

9.7 Proteína total	19
9.8 Ensayos de purificación de la enzima PP-Glk nativa	19
9.9 Pruebas de estabilidad de la PP-Glk	21
9.11 Determinación de pH y temperatura óptima	21
9.12 Determinación de las constantes cinéticas de la PP-Glk	22
10. Resultados y discusión	
10.1 Clonación del gen <i>ppglk</i>	23
10.2 Purificación de la PP-Glk nativa y pruebas de estabilidad	24
10.3 Temperatura y pH óptimo	29
10.4 Determinación de constantes cinéticas	33
10.5 Efecto de la manosa y ATP sobre la actividad de la PP-Glk	37
11. Conclusiones	40
12. Perspectivas	41
13. Bibliografía	41
14. Anexo	45

## 1.1 Índice de figuras

	Página
Figura 1. Clasificación de las glucosas cinasas y ejemplos.	8
Figura 2. Reacción de fosforilación de PP-Glk en <i>S. coelicolor</i> .	12
Figura 3. Actividad específica de ATP-Glk y PP-Glk medida en el citosol de diferentes cepas de <i>Streptomyces</i> crecidas con glucosa como fuente de carbono.	13
Figura 4. Geles de agarosa 0.8 % DNA genómico <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i> .	23
Figura 5. Gel de electroforesis en acrilamida al 10% de las fracciones de precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a partir del extracto crudo de <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i> .	25
Figura 6. Actividad de ATP-Glk y PP-Glk en cada fracción de precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .	26
Figura 7. Actividad residual de la PP-Glk después de dializarla contra diferentes agentes estabilizantes.	29
Figura 8. A) Gráfica del efecto de la temperatura sobre la actividad de la PP-Glk. B) Gráfica de Arrhenius para la determinación de la energía de activación (35 a 50°C).	31
Figura 9. Gráfica del efecto del pH sobre la actividad de la PP-Glk.	32
Figura 10. Gráfica de dobles recíprocos y curva de Michaelis-Menten de la PP-Glk para el sustrato polifosfato.	33
Figura 11. Gráfica de dobles recíprocos y curva de Michaelis-Menten de la PP-Glk para glucosa.	35
Figura 12. Gráfica de actividad específica de la PP-Glk a diferentes concentraciones de manosa, manteniendo la glucosa constante.	39

## 1.2 Índice de tablas

	Página
Tabla 1. Propiedades bioquímicas de las enzimas ATP- Glk de <i>S. coelicolor</i> y <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i> .	11
Tabla 2. Parámetros cinéticos de la enzima GlkA de <i>Streptomyces griseus</i> .	11
Tabla 3. Parámetros cinéticos de la enzima PP-Glk de <i>S. coelicolor</i> .	12
Tabla 4. Parámetros cinéticos de la ATP-Glk en varias cepas del género <i>Streptomyces</i> .	14
Tabla 5. Parámetros cinéticos de la PP-Glk en varias cepas del género <i>Streptomyces</i>	14
Tabla 6. Preparación de las mezclas de reacción para la determinación de la actividad de la PP-Glk.	19
Tabla 7. Amortiguadores para determinar el pH óptimo de la PP-Glk.	22
Tabla 8. Comparación de temperaturas óptimas de otras PP-Glks en actinobacterias.	30
Tabla 9. Comparación de pH óptimo de otras PP-Glks en actinobacterias.	32
Tabla 10. Comparación de valores de $K_m$ para polifosfato de PP-Glk en actinobacterias.	34
Tabla 11. Comparación de valores de $K_m$ para glucosa de otras PP-Glk en actinobacterias	36
Tabla 12. Comparación de valores de $K_m$ para ATP de otras PP-Glk en actinobacterias.	37



## 2. Abreviaturas

$\mu\text{L}$	microlitro	Glk	glucosa cinasa
DNA	ácido desoxirribonucleico	PP-Glk	glucosa cinasa dependiente de polifosfato
Dog	2-desoxiglucosa	ATP-Glk	glucosa cinasa dependiente de ATP
G6PDH	glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	PP	polifosfato
Dog <sup>R</sup>	resistente a 2-desoxiglucosa	$V_{\text{max}}$	velocidad máxima
Dog <sup>S</sup>	sensible a 2-desoxiglucosa	$K_m$	constante de Michaelis
KDa	kilodaltones	$(\text{NaPO}_4)_6$	hexametafosfato
nmol	nanomol	var	variedad
min	minutos	ROK	proteínas represoras, marco de lectura abierto y cinasas
mg	miligramos	<i>glkA</i>	gen de la ATP-Glk
M	molar	RCC	represión catabólica por carbono
$\mu\text{mol}$	micromol	$K_{\text{cat}}$	constante catalítica
Rpm	revoluciones por minuto	PCR	reacción en cadena de la polimerasa
mL	mililitros	nm	nanómetros
mM	milimolar	mV	milivoltios
YMG	Yeast Extract-Malt Extract Glucose	CTC	clortetraciclina
mmol	milimol	mm	milímetros
MTT	metil-tioazoil-tetrazolio	U	1 unidad internacional
V	volts	ADP	adenosín difosfato
MPM	marcador de peso molecular	Ea	energía de activación
ATP	adenosín trifosfato	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	sulfato de amonio
SgGlkA	ATP-Glk de <i>S. griseus</i>	ng	nanogramos
W	vattios		
kJ	kilojoules		
pb	pares de bases		
ms	milisegundos		

### 3. RESUMEN

La glucosa cinasa (Glc) cataliza la fosforilación de glucosa utilizando ADP, ATP y/o polifosfato inorgánico (PP) como donadores de fosfato. Las Glcs que utilizan PP solo se han reportado en bacterias Gram-positivas, tales como *Arthrobacter* sp., y el patógeno *Mycobacterium tuberculosis* entre otros. Los primeros estudios sobre la fisiología de una glucosa cinasa dependiente de polifosfato (PP-Glc) se realizaron en *Streptomyces aureofaciens*, una cepa productora de clortetraciclina. Recientemente, se clonó la PP-Glc de *Streptomyces coelicolor* y se expresó con una etiqueta de histidinas en *Escherichia coli*, para su posterior purificación y caracterización bioquímica. *Streptomyces peucetius* var. *caesius* ha mostrado una alta actividad de PP-Glc en comparación con varias cepas silvestres del mismo género, pero no ha sido caracterizada bioquímicamente. Por lo anterior, este proyecto se planteó como objetivo la caracterización bioquímica de la PP-Glc en *S. peucetius* var. *caesius* para comparar con las enzimas ya reportadas de este mismo género. Los valores de pH y temperatura óptimos fueron 8.9 y 50°C respectivamente. Se determinó una  $K_m$  para glucosa y polifosfato ( $\text{NaPO}_4$ )<sub>6</sub> de  $4.5 \pm 0.39$  mM y  $0.11 \pm 0.012$  mM respectivamente. Para polifosfato la  $V_{\max}$  fue de  $166.03 \pm 8.54$  nmol/min mg y para glucosa la  $V_{\max}$  fue de  $577.34 \pm 18.86$  nmol/min mg. Por último, se observó que la PP-Glc no tiene ninguna afinidad por el ATP.

## 4. INTRODUCCIÓN

*S. peucetius* var. *caesius* es una bacteria Gram-positiva con alto contenido de guanina y citosina en su genoma, aerobia estricta, distribuida principalmente en suelos (Song *et al.*, 2015). Este tipo de bacterias presentan un ciclo de vida complejo en donde se dan procesos de diferenciación de micelio vegetativo a micelio aéreo y, posteriormente, a la formación de esporas (Chater *et al.*, 2010).

*S. peucetius* var. *caesius* fue aislada después del tratamiento mutagénico con N-nitroso N-metil uretano de la cepa *Streptomyces peucetius* productora de antraciclinas como la daunorrubicina. *S. peucetius* se caracteriza principalmente por la formación de abundante micelio aéreo de color azul-verdoso o gris verdoso, mientras que el micelio vegetativo es de color rojo (Arcamone *et al.*, 1969). *S. peucetius* var. *caesius* es importante desde el punto de vista industrial por su capacidad de producir un poderoso antitumoral muy utilizado llamado adriamicina o doxorrubicina (DXR) (Otten *et al.*, 1990). La producción de DXR se ve afectada por el mecanismo de represión catabólica por carbono o RCC (mecanismo que permite la utilización secuencial y jerárquica de las fuentes de carbono disponibles en el medio). Segura *et al.*, (1996), aislaron mutantes de *S. peucetius* var. *caesius* de la enzima ATP-Glk que son insensibles a RCC. Este y otros estudios en *S. coelicolor* han probado que esta enzima tiene algún papel dentro de la RCC, aunque aún no se conoce cómo lo realiza.

En *S. peucetius* var. *caesius* se ha detectado la presencia de una PP-Glk que presenta una alta actividad en comparación con otras PP-Glks de otras especies, tales como *S. coelicolor*, *S. lividans*, *S. thermocarboxydus* K155, e incluso respecto a su cepa parental *S. peucetius* (Ruiz *et al.*, 2015). Ya que la ATP-Glk ha demostrado tener un papel relevante en la RCC, es de interés el estudio bioquímico de esta PP-Glk que parece encontrarse activa en algunas cepas, principalmente en aquéllas sobreproductoras de antibióticos.

## 5. ANTECEDENTES

### 5.1 Definición de la glucosa cinasa y clasificación

La glucosa cinasa (Glc) es una enzima que cataliza la fosforilación de la glucosa usando como donadores de fosfato al ATP, ADP y/o polifosfato inorgánico (PP). Las Glks se han dividido en dos grandes familias debido a su similitud en estructura primaria, secundaria y terciaria. Las dos familias son la Ribocinasa (RK) que incluye todas las Glks y hexocinasas que utilizan el ADP como donador fosfato, y la familia Hexocinasa (HK) que incluyen las Glks y hexocinasas que pueden utilizar ATP y/o polifosfato como donador de fosfato (figura 1). Esta última familia está subdividida a su vez en tres grupos: HK, A y B (Kawai *et al.*, 2005).

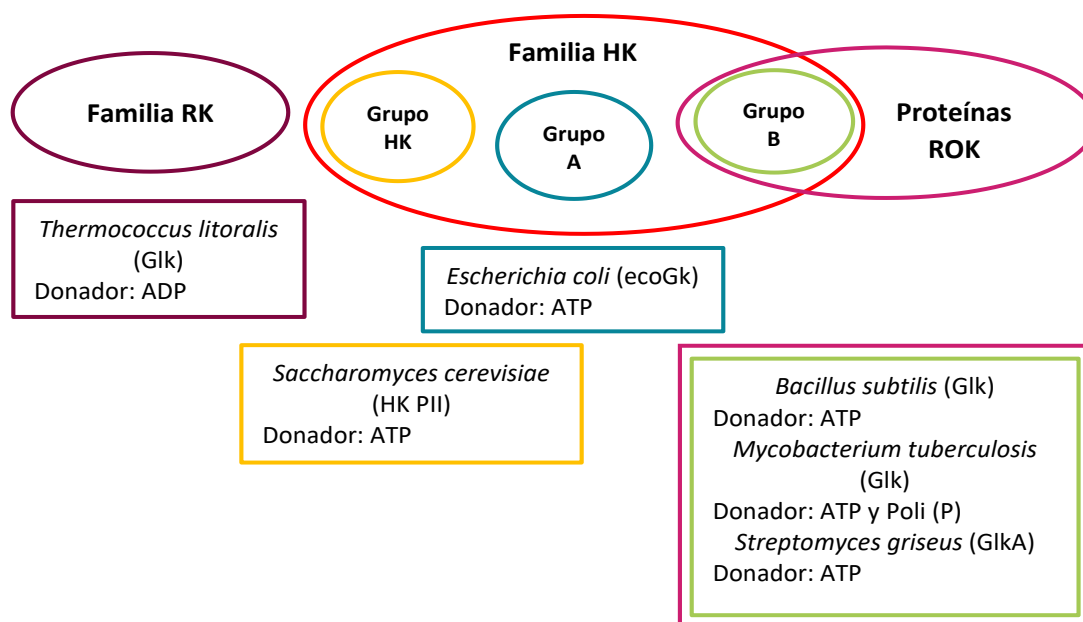


Figura 1. Clasificación de las glucosas cinasas en diferentes familias y ejemplos.  
Tomada y modificada de Kawai *et al.*, 2005.

Las Glks del grupo HK poseen pesos moleculares que oscilan entre 50 y 100 kDa y utilizan como donador de fosfato el ATP. Este grupo comprende Glks y hexocinasas de eucariontes como por ejemplo las humanas (HK I, II, III y la Glc conocida como HK IV), y las de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (HK PI y PII).

El grupo A contiene Glks de bacterias Gram-negativas como *E. coli*, *Zymomonas mobilis* y la cianobacteria *Synechocystis* sp. y las provenientes de protozoarios amitocondriados como *Trichomonas vaginalis* y *Giardia lamblia*. Estas enzimas tienen pesos moleculares que van de 33 a 42 KDa y también utilizan ATP como donador de fosfato.

El grupo B comprende a las Glks provenientes de bacterias Gram-positivas como ejemplo se tiene a *Bacillus subtilis*, también incluyen las Glks de las arqueas *Aeropyrum pernix* y *Thermoproteus tenax* pertenecientes a la familia Crenarchaeota. Los pesos moleculares de estas enzimas van de 30 a 36 KDa y pueden usar como donadores del grupo fosfato al ATP y/o polifosfato (PP). Adicionalmente, las Glks de este grupo contienen secuencias consenso que caracterizan a la familia de proteínas ROK (proteínas represoras, marco de lectura abierto y cinasas), exceptuando la secuencia de unión a DNA (figura 1) (Kawai *et al.*, 2005).

El mecanismo catalítico de las Glks en general es análogo al de otras cinasas, en donde se lleva a cabo un ataque nucleofílico del átomo de oxígeno O6 de la glucosa hacia el átomo de fósforo del grupo  $\gamma$ - fosforilo del ATP (Lunin *et al.*, 2004). Todas las Glks de la familia HK están conformadas por dos dominios, un dominio grande y otro pequeño que forman la hendidura del sitio activo en donde se une la glucosa y el ATP (Kamata *et al.*, 2004).

## **5.2 Importancia de la glucosa cinasa en el género *Streptomyces*.**

En el género *Streptomyces* la enzima glucosa cinasa dependiente de ATP (ATP-Glk), parece tener un papel importante en el proceso de RCC.

Hodgson (1982) aisló mutantes de *S. coelicolor* que eran resistentes a 2-desoxi-D-glucosa (Dog) un análogo tóxico de la glucosa. Las mutantes mostraron un decremento en la sensibilidad a represión por varias fuentes de carbono, incluyendo la glucosa, lo que se veía reflejado en el aumento de la síntesis de antibióticos tales como actinorrodina y undecilprodigiosina. Adicionalmente, Hodgson observó que había una reducción en la actividad de ATP-Glk y afectación del transporte de glucosa. Fue así que Angell *et al.* (1994), realizó la complementación de mutantes

*glkA* de *S. coelicolor* con el gen *glk* de la bacteria Gram-negativa *Z. mobilis*. Este gen fue capaz de restablecer la utilización de la glucosa y la actividad de ATP-Glk, pero no la sensibilidad a RCC. Por otro lado, Kwakman y Postma en el mismo año demostraron que la RCC debida a la presencia de fuentes de carbono que no se catabolizan vía glucólisis se elimina en ausencia de ATP-Glk, lo que sugiere que esta enzima podría tener un papel más global en la regulación por RCC.

Segura *et al.* (1996), aislaron mutantes de *S. peucetius* var. *caesius* capaces de soportar Dog (Dog<sup>R</sup>) que se volvían resistentes a RCC, conservaban la capacidad para usar glucosa y presentaban baja actividad de ATP-Glk. Ramos *et al.* (2004), a partir de una de esas mutantes Dog<sup>R</sup> aislaron una nueva serie de mutantes, ahora sensibles a Dog (Dog<sup>S</sup>), que continúan siendo resistentes a RCC, con deficiencias en la incorporación de glucosa y en la actividad de ATP-Glk. Los resultados reflejan que en *S. peucetius* var. *caesius* no hay correlación directa entre la actividad de ATP-Glk, la sensibilidad a Dog y la RCC, como se observó en las mutantes de *S. coelicolor* (Hodgson *et al.*, 1982).

### **5.3 Trabajos de purificación de ATP-Glk en *Streptomyces***

Mahr *et al.* (2000), clonaron, sobreexpresaron y purificaron la ATP-Glk recombinante de *S. coelicolor* a partir de *E.coli*. Más tarde, Imriskova *et al.* (2005), purificaron y caracterizaron bioquímicamente las ATP-Glks nativas de *S. coelicolor* y *S. peucetius* var. *caesius*. En la tabla 1 se presentan dichas características bioquímicas de las ATP-Glks, y se observa que hay diferencia en la temperatura óptima, la velocidad máxima y la afinidad por ATP, las características bioquímicas como pH, punto isoeléctrico, afinidad por glucosa y peso molecular son muy similares entre sí. Las constantes cinéticas fueron determinadas a 25°C y un pH de 7.5 para la ATP-Glk de *S. peucetius* var. *caesius* y un pH de 7.6 para la ATP-Glk de *S. coelicolor*.

Propiedades bioquímicas	ATP-Glk		
	Cepas	<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 <sub>max</sub> (nmol/min mg)		1666.7 ± 170	1086.7 ± 28.6
K <sub>m</sub> glucosa (mmol)		1.4 ± 0.1	1.6 ± 0.2
K <sub>m</sub> MgATP <sup>2-</sup> (mmol)		0.5 ± 0.1	0.8 ± 0.1
Veces de purificación		-	292
Peso molecular (KDa)		32	31

Tabla 1. Propiedades bioquímicas de ATP-Glk de *S. coelicolor* y *S. peucetius* var. *caesius*. (Tomado y modificado de Imriskova *et al.*, 2001 y 2005).

En la tabla 2 se aprecian las constantes cinéticas que obtuvieron Miyazono *et al.* (2012), al purificar y cristalizar la ATP-Glk de *Streptomyces griseus* en complejo con glucosa. Se observa que esta enzima tiene una mayor afinidad por ATP en comparación con las afinidades antes mencionadas de *S. coelicolor* y *S. peucetius* var. *caesius*.

Constantes cinéticas de ATP-Glk	
K <sub>m</sub> (mM)	0.207 ± 0.011
V <sub>max</sub> (μmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )	0.935 ± 0.049
K <sub>cat</sub> (s <sup>-1</sup> )	0.504 ± 0.015
K <sub>cat</sub> /k <sub>m</sub> (s <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )	2.43 ± 0.03

Tabla 2. Parámetros cinéticos de la ATP-Glk de *Streptomyces griseus*. Las constantes cinéticas se determinaron a pH 8 y 30°C (Miyazono *et al.*, 2012).

Hasta el momento solo se habían estudiado a las enzimas ATP-Glk, pero como se mencionó anteriormente existen otras Glks que pueden utilizar otro donador de fosfato, tal es el caso de la PP-Glk.

## 5.4 Trabajos con PP-Glk en *Streptomyces*

Hostalek *et al.* (1976), estudiaron el papel de la PP-Glk en la bacteria *S. aureofaciens* que sobreproduce clortetraciclina (CTC). En una cinética de crecimiento y producción de Glk, se encontró que la actividad de PP-Glk aparece hasta el final de la fase logarítmica y aumenta en paralelo con la biosíntesis de CTC en la fase estacionaria.

Años más tarde Gubbens *et al.* (2012), observaron por proteómica cuantitativa la presencia de una PP-Glk en *S. coelicolor* (SCO5059). A partir de este análisis Koide *et al.* (2013), sobreexpresaron en *E. coli*, purificaron y caracterizaron parcialmente la PP-Glk. En la figura 2 se muestra la reacción general de fosforilación de la PP-Glk usando glucosa y polifosfato, durante la reacción hay un ataque nucleofílico y liberación de la cadena de polifosfato para continuar con la reacción. En la tabla 3 se muestran sus constantes cinéticas y se observa que tiene una gran afinidad por polifosfato.

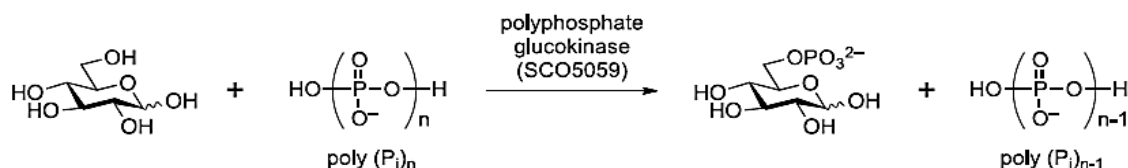


Figura 2. Reacción de fosforilación de PP-Glk en *S. coelicolor*. (Tomado de Koide *et al.*, 2013).

Sustratos	Glucosa	(NaPO <sub>3</sub> ) <sub>6</sub>
K <sub>m</sub> [mM]	(1.24 ± 0.038) x 10 <sup>-2</sup>	(3.87 ± 0.21) x 10 <sup>-3</sup>
K <sub>cat</sub> [s <sup>-1</sup> ]	0.25 ± 0.04	0.31 ± 0.02

Tabla 3. Parámetros cinéticos de la enzima PP-Glk de *S. coelicolor*. Las constantes cinéticas se determinaron a pH 7.7 y 28°C (Koide *et al.*, 2013).



El estudio más reciente que se tiene de una PP-Glk en *Streptomyces* lo reportan Ruiz *et al.* (2015). Ellos detectaron mediante zimograma una PP-Glk en *S. peucetius* var. *caesius*, que mostró una alta actividad en comparación con PP-Glks provenientes de otros *Streptomyces* (Figura 3).

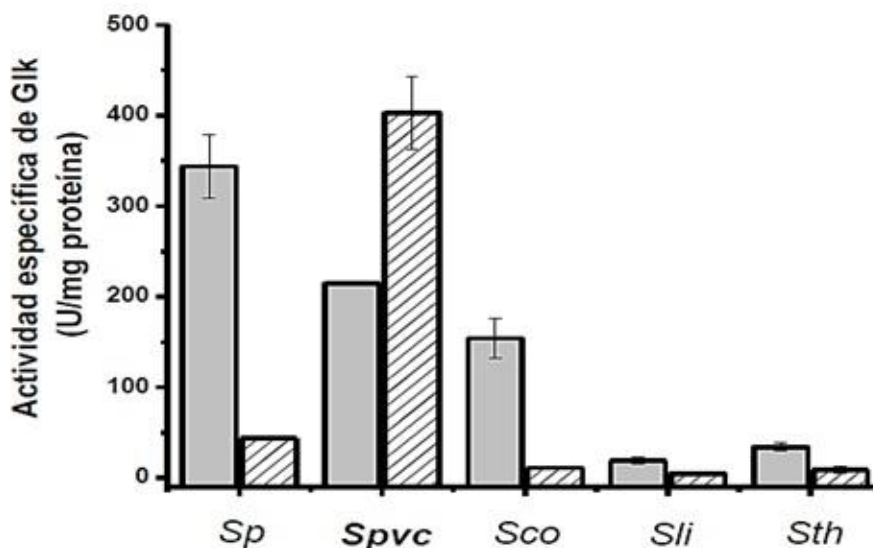


Figura 3. Actividad específica de ATP-Glk (barras grises) y PP-Glk (barras rayadas) medida en el citosol de diferentes cepas de *Streptomyces* crecidas con glucosa como fuente de carbono. *S. peucetius* (Sp), *S. peucetius* var. *caesius* (**Spvc**), *S. coelicolor* (Sco), *S. lividans* (Sli), *S. termocarboxydus* K-155 (Sth), (Rocha *et al.*, 2018).

Finalmente, en las tablas 4 y 5 se muestran las características bioquímicas reportadas hasta el momento, de las enzimas ATP-Glk y PP-Glk de varias cepas del género *Streptomyces*. Como se puede observar, la actividad específica de las enzimas en *S. peucetius* var. *caesius* es mayor en comparación con la actividad de las Glks de *S. coelicolor*.

En *S. coelicolor* se observa que la PP-Glk es más afín a sus sustratos (glucosa y polifosfato) que su ATP-Glk por glucosa y ATP. En *S. peucetius* var. *caesius* solo se tienen las características bioquímicas de la ATP-Glk, por tanto, fue de nuestro interés averiguar las características bioquímicas de la enzima PP-Glk para saber si muestra el mismo comportamiento que en *S. coelicolor*.

<b>ATP-Glk</b>			
<b>Sustrato</b>	Glucosa K <sub>m</sub> [mM]	ATP K <sub>m</sub> [mM]	Actividad (U/mg)
<b><i>S. coelicolor</i></b>	1.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1	154 ± 21.9
<b><i>S. peucetius var. caesius</i></b>	1.6 ± 0.2	0.8 ± 0.1	215 ± 22.7
<b><i>S. griseus</i></b>	0.207 ± 0.011	-	-

Tabla 4. Parámetros cinéticos de la ATP-Glk en varias cepas del género *Streptomyces*. Tomado de Ruiz *et al.*, 2015, Imriskova *et al.*, 2001, 2005 y Miyazono *et al.*, 2009.

<b>PP-Glk</b>			
<b>Sustrato</b>	Glucosa K <sub>m</sub> [mM]	(NaPO <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> K <sub>m</sub> [mM]	Actividad (U/mg)
<b><i>S. coelicolor</i></b>	(1.24 ± 0.038) x10 <sup>-2</sup>	(3.87 ± 0.21) x10 <sup>-3</sup>	11 ± 0.7
<b><i>S. peucetius var. caesius</i></b>	**	**	403 ± 40.2

Tabla 5. Parámetros cinéticos de la PP-Glk en varias cepas del género *Streptomyces*. (Tomado de Ruiz *et al.*, 2015 y Koide *et al.*, 2013).

\*\*Parámetros a determinar en el presente trabajo.

## 6. JUSTIFICACIÓN

En el género *Streptomyces* se han reportado la presencia de dos glucosa cinasas. Una de ellas se encuentra en mayor concentración y cataliza la fosforilación de glucosa utilizando ATP. La otra, menos caracterizada, utiliza polifosfato inorgánico (PP) como donador de fosfato. Nuestro grupo de trabajo ha estudiado y caracterizado la ATP-Glk de *S. peucetius* var. *caesius*. Recientemente, detectamos también la presencia de la PP-Glk en este microorganismo. Comparada con la ATP-Glk, dicha cepa presenta una alta actividad de PP-Glk, pero tal actividad no ha sido caracterizada bioquímicamente.

La caracterización bioquímica de la PP-Glk nos permitirá comparar las constantes cinéticas de las dos Glks activas de *S. peucetius* var. *caesius* para inferir su posible importancia en la fisiología de esta cepa.

## 7. HIPÓTESIS

La PP-Glk de *S. peucetius* var. *caesius* tendrá una mayor afinidad por glucosa y PP comparada con la de ATP-Glk por sus sustratos glucosa y ATP.

## 8. OBJETIVO

Determinar las características bioquímicas de la glucosa cinasa dependiente de polifosfato en la actinobacteria *S. peucetius* var. *caesius*

## 9. Diseño experimental

### 9.1 Cepas y medios de cultivo

La cepa de *S. peucetius* var. *caesius* provino de la NRRL B-5337 (Peoria, USA) y se mantuvo como micelio en glicerol al 20%. Para la propagación de dicha bacteria se usó medio de extracto de levadura y malta con glucosa (YMG, ver anexo), se incubó a 29°C y 180 rpm. Para el aislamiento de ADN genómico se usó adicionalmente un cultivo en medio de extracto de levadura y malta (YEME, ver anexo) con 0.5% de glicina incubando bajo las mismas condiciones (Kieser *et al.*, 2000). La cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* (Thermo Fisher) fue utilizada para los procesos de clonación y subclonación, esta cepa fue conservada en glicerol al 10% y el cultivo se hizo en medio Luria-Bertani (LB, ver anexo) incubando a 37°C y 200 rpm.

### 9.2 Clonación del gen *ppgIk*

La clonación del gen *ppgIk* de *S. peucetius* var. *caesius* se realizó por amplificación mediante la técnica de PCR. Por una parte, se realizó el aislamiento de ADN genómico de *S. peucetius* var. *caesius* según el método reportado por Kieser *et al.*, 2000. Por otro lado, se diseñaron y sintetizaron los oligos con sitios de restricción *Bam*HI y *Hind*III compatibles y en marco de lectura para su clonación en el plásmido de expresión pQE31. Los cebadores utilizados fueron: forward con sitio *Bam*HI (5' GACGGATCCTAGAGCCATGCAGATCTTCGGCGTGG 3') y reverso con sitio *Hind*III (5' AAGCTTCCACGGCCTGAGGTCACACCCGCGCTAGT 3'). La PCR se realizó con una desnaturalización inicial de 5 min a 95°C, 25 ciclos con desnaturalización a 95°C por 45 s; alineamiento a 58°C por 1 min, extensión a 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 5 min. El amplicón obtenido fue ligado en plásmidos para la clonación de productos de PCR como pJET1.2 (ThermoFisher), pGEM-T easy (Promega) y en el plásmido de expresión pQE31 (Qiagen) siguiendo las instrucciones de los respectivos proveedores. En algunos casos se desfosforiló el plásmido pQE31 digerido usando la enzima fosfatasa alcalina (Invitrogen). La reacción de desfosforilación se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del proveedor incubando 10 min a 37°C, para posteriormente inactivar la reacción calentando a 75°C por 5 min. Con el plásmido pQE31 y el amplicón de *ppgIk*

digeridos con *Bam*HI y *Hind*III, se realizaron entonces pruebas de ligación con T4 DNA ligasa (Promega) usando proporciones de plásmido: amplicón, 1:1, 2:1 y 3:1; se siguieron las instrucciones del proveedor incubando 10 min a 22°C. Las ligaciones fueron transformadas por electroporación a 50 µL de células competentes de *E. coli* DH5α, usando un choque por 5 ms a 1250 mV. Las células se recuperaron incubando 1 h a 37°C adicionando 950 µL de medio LB complementado con 100 mM de glucosa en agitación. Después del periodo de recuperación, se inocularon dos cajas de medio LB con 150 µg/mL de ampicilina, con 500 µL de células y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Para verificar los plásmidos se hicieron mini preparaciones según el método alcalino (Engebrecht *et al.*, 2000), y se realizaron las digestiones correspondientes con *Bam*HI y *Hind*III. Una vez terminadas las digestiones se realizó una electroforesis en gel de agarosa 0.8% en amortiguador TAE 1X a voltaje constante de 60 mV durante 1.5 h.

### **9.3 Fermentación de *S. peucetius* var. *caesius***

Para la obtención del extracto libre de células con Glk se realizaron fermentaciones en medio complejo con glucosa para inducir la producción de la enzima, según el siguiente procedimiento:

- Pre- inóculo

Se inocularon 200 µL de la cepa conservada en glicerol 20% en 16 matraces bafleados de 250 mL que contenían 50 mL de medio YMG (Guzmán *et al.*, 2005). 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 dos veces con 50 mL de solución salina estéril (SSI, 0.85% NaCl) y cada botón fue suspendido en 5 mL de SSI.

- Fermentación

Se adicionaron 2 mL del pre-inóculo anterior en 40 matraces de 250 mL, bafleados que contenían 50 mL de medio definido de nitrato (NDM) suplementado con glucosa 100 mM. Se incubaron a 29°C, 180 rpm durante 48 h. Se recuperó la masa celular centrifugando a 10,000 rpm por 15 min. El paquete celular fue lavado dos veces con

un volumen de SSI, se eliminó completamente el sobrenadante y el botón fue congelado a -20°C.

#### **9.4 Preparación del extracto libre de células**

Los botones recuperados de la fermentación se descongelaron y suspendieron en 5 mL de amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 7.2. Las células se lisaron por sonicación (6 pulsos de 30 s a 5 W), dando reposo de 1 min a 4°C entre cada pulso. El lisado celular se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min a 4°C, el sobrenadante se depositó en un vaso de precipitados para su posterior precipitación, mientras que al botón se le aplicó nuevamente el proceso de sonicación para favorecer la extracción de proteína. Al sobrenadante que se obtuvo después de todo el proceso se le denominó extracto crudo.

#### **9.5 Precipitación con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**

Como un primer paso de purificación, se realizó una precipitación diferencial usando sulfato de amonio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. De esta manera, una vez obtenido el extracto crudo se agregó de manera secuencial la cantidad necesaria de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para saturar la solución a diferentes concentraciones (0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% y 80-100%). Para cada fraccionamiento se añadió la sal y se dejó en agitación constante por 24 h a 4°C. Posteriormente se centrifugó a 18,000 rpm y el botón de cada fracción de precipitación se suspendió en Tris-HCl 20 mM. Por último, a cada fracción se le adicionó inhibidor de proteasas (2 mL /100 mL, Sigma-Aldrich). (Dawson *et al.*, 1969).

#### **9.6 Determinación de la actividad de PP-Glk**

La actividad de PP-Glk se midió espectrofotométricamente monitoreando la reducción de NADP<sup>+</sup> a NADPH ( $\epsilon = 6.22 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ ) en una reacción acoplada con la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). La mezcla de reacción A contenía 100 mM Tris-HCl, pH 7.2, 250 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM NADP, 2 mg/mL de polifosfato de sodio (cristales, +80 mesh, 96%, Aldrich y hexametáfosfato de sodio, tech Aldrich). Esta mezcla de reacción A se preparó al momento, y los demás

reactivos que son 200 mM de D-glucosa, 0.7 U/mL de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, extracto enzimático y agua (solo para el blanco), se adicionan según se indica en la tabla 6.

	Reactivo A ( $\mu\text{L}$ )	H <sub>2</sub> O ( $\mu\text{L}$ )	Glucosa ( $\mu\text{L}$ )	Extracto enzimático ( $\mu\text{L}$ )	G6PDH ( $\mu\text{L}$ )
<b>Blanco</b>	-	975	-	25	-
<b>Blanco de reactivos</b>	873	100	-	25	2
<b>Muestra</b>	873	-	100	25	2

Tabla 6. Preparación de las mezclas de reacción para la determinación de la actividad de la PP-Glk.

La mezcla completa de reactivos se midió en una celda de cuarzo utilizando un espectrofotómetro Thermo Scientific acoplado a un equipo Peltier (Thermo Scientific) que controla la temperatura. Para este ensayo la temperatura que se utilizó fue de 50°C. Las lecturas de absorbancia se tomaron a 340 nm cada 20 s. Las unidades de actividad fueron expresadas como  $\text{nmol NADPH reducido} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$  a 25°C (Imriskova *et al.*, 2001).

## 9.7 Proteína total

Para cuantificar específicamente la actividad de la PP-Glk, se determinó la proteína total en cada fracción empleando el método de Bradford (1976) usando el reactivo comercial de Bio-Rad según las instrucciones del proveedor y albúmina sérica bovina como estándar de proteína.

## 9.8 Ensayos de purificación de la enzima PP-Glk nativa

Con el fin de purificar la enzima PP-Glk de *S. peucetius* var. *caesius*, después del fraccionamiento con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y de la medición de su actividad, se utilizó la fracción con mayor actividad para realizar los ensayos de purificación posteriores.

- Cromatografía de intercambio iónico

Para realizar este tipo de cromatografía se usó un equipo FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) con una columna de intercambio iónico HiTrap™ DEAE FF de 1 mL, utilizando como amortiguador de unión Tris-ácido maleico 0.2 M pH 7 y como amortiguador de elución Tris-ácido maleico con NaCl 0.2 M pH 7. Se hicieron pasar por la columna 5 mL de la fracción con mayor actividad de la enzima, colectándose 1 mL por minuto durante 120 min. En el cromatograma se observó un cambio en la absorbancia desde la fracción 27 hasta la 48; posteriormente se midió actividad en dichas fracciones. Con el fin de estabilizar la proteína los amortiguadores se suplementaron con 20 mM de glucosa.

- Purificación por electroelución (Imriskova *et al.*, 2001)

Esta técnica consiste en correr un gel de electroforesis nativo y posteriormente se localiza la proteína de interés por zimografía. Para la detección de la PP-Glk se realizó un gel de acrilamida nativo al 10% donde se corrieron 20 µL de la fracción con mayor actividad de PP-Glk a 20 mA, hasta que el colorante de seguimiento llegara al borde inferior del gel (más o menos 1 h 30 min). Para la zimografía se preparó un gel de empalme de agarosa al 0.8% que contenía 100 mM Tris pH 7.2, 200 mM glucosa, 250 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM NADP, ATP 10 mM, 0.8 mg/mL sulfato de fenazina y 0.5 U/mL de G6PDH. El sándwich se incubó en cámara húmeda a 42°C en obscuridad por 20 min, pasado el tiempo se logró observar una banda azul marino que representaba la actividad. El sistema de reacción se basa en la detección de la actividad de la G6PDH la cual oxida la glucosa 6-fosfato usando como coenzima el NADP, produciendo 6-fosfogluconato y NADPH. La coenzima reducida transfiere sus electrones al metil-tiazol-tetrazolio (MTT) generando formazán, un compuesto de color azul. Una vez obtenida la banda con actividad, se cortó y se depositó en una bolsa de diálisis (diámetro 14.3 mm, 10 kDa de exclusión, Spectrum™) con amortiguador Tris-HCl 20 mM a pH 7.2 suplementado con glucosa 20 mM. Esta bolsa de diálisis se colocó dentro de la misma cámara de electroforesis y se electroeluyó a 20 V toda la noche con amortiguador nativo (Tris-Glicina más 20



mM de glucosa) a 4°C. Después de la incubación se retiró el pedazo de gel, se tomó el amortiguador dentro de la bolsa de diálisis y se midió actividad.

Adicionalmente se realizó una diálisis en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.2 más glucosa 100 mM y otra diálisis con glucosa 100 mM más glicerol 10%, durante 12 h a 4°C.

### **9.9 Pruebas de estabilidad de la PP-Glk**

Ya que los ensayos de purificación de la enzima PP-Glk resultaron en su inactivación, se hicieron pruebas para estabilizar la enzima usando Tris-HCl 10 mM, pH 7 adicionando diversos agentes que se encontraron reportados en la literatura como los más utilizados para dicho fin (Creighton *et al.*, 1997). Estos agentes estabilizantes fueron sacarosa, glicerol, glucosa, glutamato de sodio, lisina, cloruro de sodio, arginina, cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>) todos a una concentración de 1M y polietilenglicol 1000 (PEG 1000).

Se dializaron 300 µL de la fracción con mayor actividad frente a las soluciones antes mencionadas en un volumen de 1 L por 12 h en agitación a 4°C. Por último, se tomó el extracto de la bolsa de diálisis al finalizar el proceso y se midió actividad.

### **9.11 Determinación de pH y temperatura óptima**

La temperatura óptima se determinó midiendo la actividad en amortiguador Tris-HCl 0.1 M pH 7.2 a diferentes temperaturas (45, 48, 50, 52, 55 y 60 °C) utilizando un equipo Peltier acoplado al espectrofotómetro. La energía de activación de la PP-Glk se calculó según la ecuación de Arrhenius:

$$k = Ae^{\frac{-Ea}{RT}}$$

donde k es la constante de velocidad, A es la constante de Arrhenius, Ea es la energía de activación, R es la constante universal de los gases (0.008314 kJ/mol\*K) y T es la temperatura absoluta en grados Kelvin.

El pH óptimo fue determinado midiendo la actividad a 50°C sustituyendo el amortiguador Tris-HCl 0.1 M pH 7.2 por los siguientes amortiguadores de la tabla 7.

pH	Amortiguadores
6	Ácido cítrico - citrato de sodio 0.1 M
7	Tris- ácido maleico-NaOH 0.2 M
8	Tris-HCl 0.1 M
8.9	Tris-HCl 0.1 M
9.2	Carbonato de sodio - bicarbonato de sodio 0.1 M
9.5	Carbonato de sodio - bicarbonato de sodio 0.1 M
10.1	Carbonato de sodio - bicarbonato de sodio 0.1 M

Tabla 7. Amortiguadores utilizados para la determinación del pH óptimo de la PP-Glk.

### 9.12 Determinación de las constantes cinéticas de la PP-Glk

Con el fin de determinar las constantes  $K_m$  y  $V_{max}$  para cada sustrato de la enzima PP-Glk se midió su actividad usando diferentes concentraciones de glucosa desde 1 mM hasta 100 mM. Lo mismo se hizo para la sal de polifosfato, en donde se utilizaron concentraciones de hexametáfosfato de 0.025 mM hasta 1.5 mM. Para determinar  $V_{max}$  y  $K_m$  de cada sustrato, los datos obtenidos se ajustaron al modelo de Michaelis-Menten.

También se determinó el efecto de posibles inhibidores competitivos de la PP-Glk para sus dos sustratos, usando manosa y ATP. Las concentraciones de manosa fueron 6, 10, 50 y 100 mM, más glucosa también a diferentes concentraciones (6, 8, 10, 25, 50 y 100 mM). Para ATP se usaron concentraciones de 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 y 200 mM.

## 10. Resultados y discusión

### 10.1 Clonación del gen *ppgIk*

El objetivo de clonar el gen *ppgIk* fue, por un lado, facilitar la obtención de la proteína al usar un hospedero de fácil cultivo como lo es *Escherichia coli* y, por otro lado, realizar la expresión heteróloga de la enzima con un tallo de histidinas para facilitar su purificación.

De esta manera, se realizó la amplificación del gen a partir del ADN genómico de *S. peucetius* var. *caesius*. El aislamiento de ADN se realizó según Kieser *et al.*, (2000), con lo que se obtuvo ADN íntegro y listo para realizar la amplificación por PCR. En la figura 4 se muestran diferentes diluciones del ADN genómico en un gel de agarosa al 0.8 %. Posteriormente se cuantificó el ADN genómico y se colocaron 250 ng por cada 50  $\mu$ L de reacción de PCR. La reacción inició con una desnaturalización de 5 min a 95°C, 25 ciclos con desnaturalización a 95°C por 45 s; alineamiento a 58°C por 1 min, extensión a 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 5 min. Como se muestra en la figura 4 se purificó el producto de PCR y se corrió un gel de agarosa para comprobar que había una sola banda y que correspondía al peso esperado del gen de 750 pb.

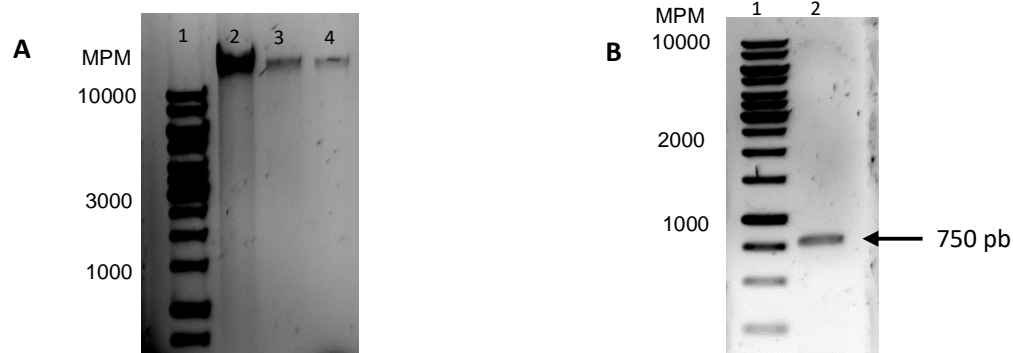


Figura 4. Geles de agarosa 0.8 % DNA genómico *S. peucetius* var. *caesius*. Panel A: diluciones de ADN genómico de *S. peucetius* var. *caesius*. Carril 1: marcador de peso molecular 1 kb Ladder (Thermoscientific), carril 2: ADN genómico sin diluir, carril 3: dilución 1:20 y carril 4: dilución 1:50. El DNA genómico se encuentra por arriba de las 10000 pb. Panel B: Amplicón del gen *ppgIk* a partir de ADN genómico de *S. peucetius* var. *caesius*. Carril 1: marcador de peso molecular 1 kb Ladder (Thermoscientific), carril 2: producto de PCR 750 pb.

Se hicieron diversos intentos de clonación del gen *ppgIk* usando vectores para productos de PCR y directamente sobre el vector pQE31, sin embargo, en ninguna condición experimental probada se obtuvieron clonas con el gen. Más aún, se sintetizó el gen *ppgIk* con codones optimizados para *E. coli* en un vector de expresión, pero la enzima expresada no presentó ninguna actividad.

Algunas dificultades en la clonación del gen de *ppgIk* pudieron deberse a su alto contenido de G-C, ya que esto muchas veces equivale a tener secuencias repetidas. Este tipo de fragmentos de ADN muchas veces son difíciles de clonar por su inestabilidad, sobre todo en vectores con sitios múltiples de clonación (Kieser *et al.*, 2000).

En el caso del vector de expresión con codones optimizados para *E. coli*, es posible que se formaran cuerpos de inclusión; estos son agregados insolubles de proteínas incorrectamente re-naturalizadas, las que carecen de actividad biológica.

Debido a lo anterior se decidió emplear otra metodología y trabajar con la enzima PP-GIk nativa, como lo reporta Imriskova *et al.* (2001).

## **10.2 Purificación de la PP-GIk nativa y pruebas de estabilidad.**

Con el fin de obtener suficiente cantidad de extracto libre de células, se realizó una fermentación de 2 litros en medio NDM con glucosa como inductor de la enzima PP-GIk (Ruiz *et al.*, 2014).

El paquete celular se lavó, congeló a -20°C y posteriormente se rompieron las células por sonicación en frío. El extracto crudo obtenido fue fraccionado realizando una precipitación diferencial con sulfato de amonio, la cual puede separar las proteínas de acuerdo con su hidrofobicidad (Scopes, 1987). Una vez obtenidas las fracciones de precipitación se corrió un gel de acrilamida al 10% bajo condiciones desnaturizantes, para observar la distribución de las proteínas en cada fracción. En la figura 5 se muestran las 6 fracciones y se marca con una flecha el tamaño esperado de la proteína, que es de 27 KDa.

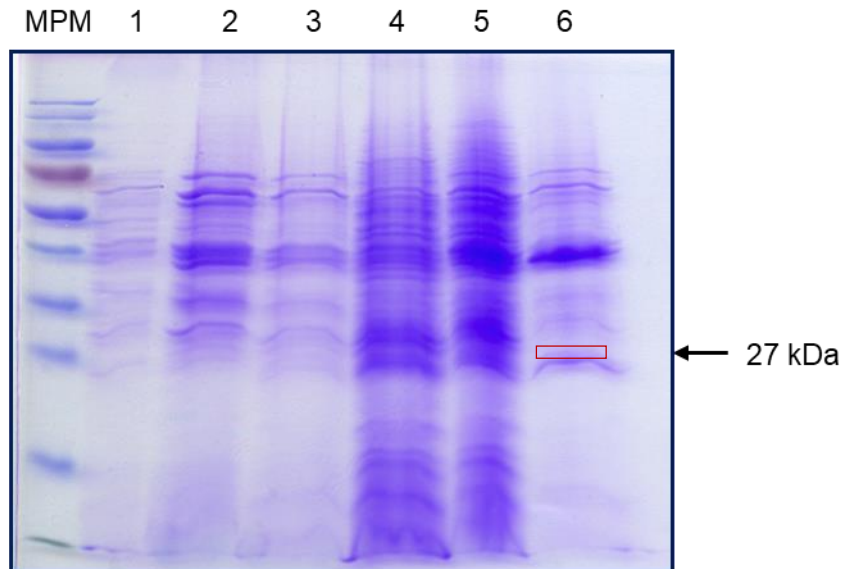


Figura 5. Gel de electroforesis en acrilamida al 10% de las fracciones de precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a partir del extracto crudo de *S. peucetius* var. *caesius*. MPM marcador de peso molecular Kaleidoscope (BioRad), carril 1: extracto crudo, carril 2: fracción 0-20%, carril 3: fracción 20-40%, carril 4: fracción 40-60%, carril 5: fracción 60-80%, carril 6: fracción 80-100%.

Con el objetivo de identificar la fracción en la que se encontraba la PP-Glk, se midió su actividad en cada fracción de precipitación, es decir, 0-20, 20-40, 40-60, 60-80 y 80-100%. Adicionalmente se midió la actividad de la ATP-Glk, dado que se induce al mismo tiempo que la PP-Glk y que, si apareciera en la misma fracción de precipitación, podría dificultar la purificación de la enzima de interés. En la figura 6 se muestra que las actividades más altas de ATP-Glk y PP-Glk estuvieron en las fracciones 40-60 y 80-100% de saturación con sulfato de amonio, respectivamente. Cabe destacar que en la fracción de 80-100% de sulfato de amonio, la actividad de ATP-Glk es poco significativa en comparación con la actividad de la PP-Glk, por lo que, con este fraccionamiento fue posible separar casi totalmente a ambas enzimas.

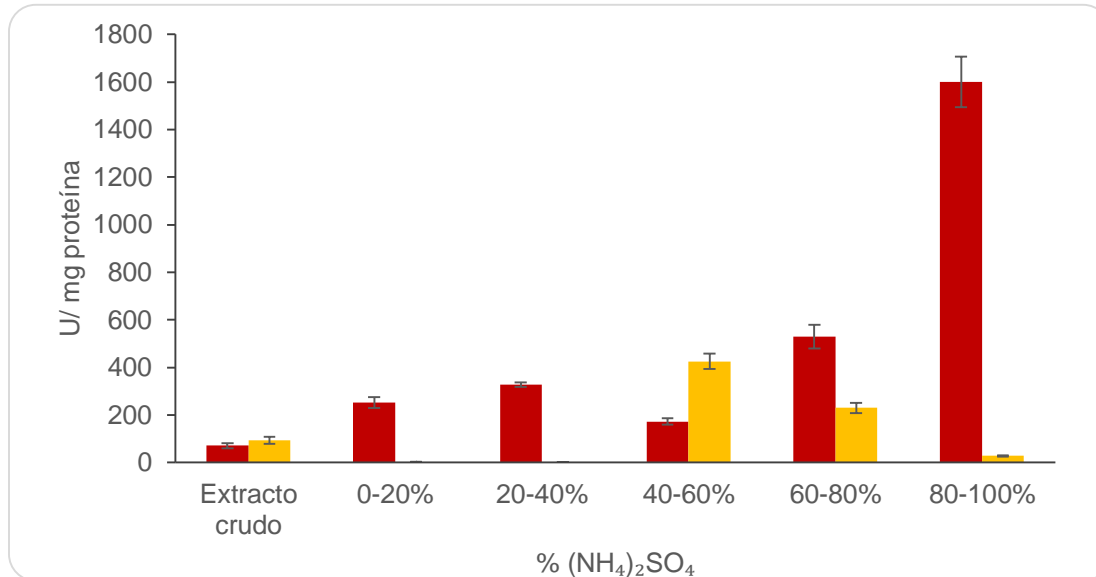


Figura 6. Actividad de ATP-Glk y PP-Glk en cada fracción de precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ■ PP-Glk ■ ATP-Glk

En cuanto a la actividad específica de la PP-Glk, se observó un aumento con respecto al extracto inicial de 22 veces.

Ya que a partir de la fracción 80-100% de sulfato de amonio se obtuvo la mayor actividad de la PP-Glk, a partir de ésta se realizaron los subsecuentes pasos de purificación.

- Columna de intercambio iónico

Se continuó el proceso de purificación usando una columna de intercambio iónico, sabiendo que el punto isoeléctrico teórico de la PP-Glk que es de 5.01. Por tanto, se utilizó un amortiguador de unión con un pH de 7 para asegurarnos de que la proteína estuviera completamente cargada negativamente, y así pudiera unirse a la columna de DEAE. Una vez unida la proteína a la resina se hizo pasar un gradiente de NaCl para eluir a las proteínas y se colectaron fracciones de 1 mL.

Una vez colectadas, se midió actividad en todas las fracciones, pero ninguna presentó actividad. También se corrió un gel de acrilamida desnaturizante para visualizar la presencia de una banda de 27 KDa que representaría a la proteína, sin ningún éxito.

Debido a lo anterior, se decidió seguir la metodología de electroelución reportada por Imriskova *et al.* (2001), dado que con esa técnica se logró purificar la ATP-Glk nativa de *S. peucetius* var. *caesius*.

- Electroelución

Esta metodología se inició con la detección de la enzima por su actividad, usando un gel para zimograma incubado sobre un gel de electroforesis nativa (Imriskova *et al.*, 2001). De esta manera se logró detectar la banda con actividad en un peso aproximado de 100 KDa. El peso de la enzima se determinó por un análisis hecho en ExPASy Bioinformatics Resource Portal (<https://www.expasy.org/>), en el cual se introdujo la secuencia de aminoácidos de la proteína, y el programa arrojó que cada monómero de la enzima pesa aproximadamente 27 KDa, la proteína PP-Glk es un tetrámero, por tanto, el peso aproximado completo es de 108 kDa. Una vez localizada la enzima en el gel nativo sin teñir, se cortó la banda para electroeluir y medir la actividad, sin embargo, en ninguna de las repeticiones del experimento se recuperó actividad de la PP-Glk.

Imriskova *et al.*, (2005), mencionan que la caracterización bioquímica de las ATP-Glks de *S. coelicolor* y *S. peucetius* var. *caesius* ha demostrado que ambas enzimas son activas como homotetrámeros y que la ATP-Glk purificada de *S. peucetius* var. *caesius* mantiene su estructura tetramérica solo en presencia de glucosa 100 mM. Además, mencionan que, aunque no se pudieron detectar monómeros, la ATP-Glk se disocia fácilmente en su forma dimérica en ausencia de glucosa. Es por esto, que en este trabajo se utilizó glucosa adicional en los amortiguadores ocupados durante el proceso de purificación por columna de intercambio iónico. Es posible que debido a que se utilizó una concentración menor de glucosa (20 mM) para no interferir con la purificación, la PP-Glk perdiera la actividad durante su elución de la columna.

Debido a lo anterior, se decidió realizar otro experimento para probar si la PP-Glk conservaba su actividad después de dializarla contra una solución de glucosa 100 mM o glicerol 10% más glucosa 100 mM (Imriskova *et al.*, 2001; Koide *et al.*, 2013 y Mahr *et al.*, 2000). La PP-Glk presentó baja actividad en ambas condiciones de

diálisis, sin embargo, la actividad fue el doble cuando se le dializó con glucosa y glicerol. De esta manera, se repitió el procedimiento de electroelución, adicionando 100 mM de glucosa y 10% de glicerol al amortiguador de corrida y a la bolsa de diálisis con la enzima para la electroelución. Sin embargo, tampoco se pudo recuperar actividad enzimática.

Debido a que la PP-Glk no mostró estabilidad con 100 mM de glucosa, como se reporta para la ATP-Glk en *S. peucetius* var *caesius*, se probaron otros agentes estabilizantes de la actividad de PP-Glk.

Los agentes estabilizantes que se probaron fueron sacarosa, glicerol, glucosa, glutamato de sodio, lisina, arginina, NaCl, MgCl<sub>2</sub> y PEG1000. Los azúcares estabilizan las proteínas aumentando la tensión superficial y uniéndose débilmente a la proteína; este mismo mecanismo lo usa el glutamato de sodio, el cloruro de sodio y el cloruro de magnesio. Por otro lado, el glicerol estabiliza las proteínas por su afinidad a las regiones polares. En cuanto a la lisina y arginina actúan uniéndose a los enlaces peptídicos cargados negativamente. Por último, el polietilenglicol (PEG) 1000 se une a las regiones hidrofóbicas de las proteínas (Creighton, 1997).

Pese a todos los agentes estabilizantes probados, como se observa en la figura 7, solo la glucosa a 1 M logró conservar 27.76% de actividad respecto al 100% que se encontraba al inicio en la fracción 80-100%. En sacarosa, arginina y PEG1000 no se conservó la actividad de PP-Glk después de la diálisis. En cuanto al glicerol, glutamato de sodio, lisina, NaCl y MgCl<sub>2</sub> la actividad residual estuvo en un rango de 0.4 y 1.71 %, así que, ninguno de estos agentes fue capaz de estabilizar a la enzima PP-Glk. Estas observaciones indicaron que la PP-Glk resultó ser más inestable que su contraparte ATP-Glk, la cual sí se estabilizó con glucosa en el amortiguador de purificación y elución.



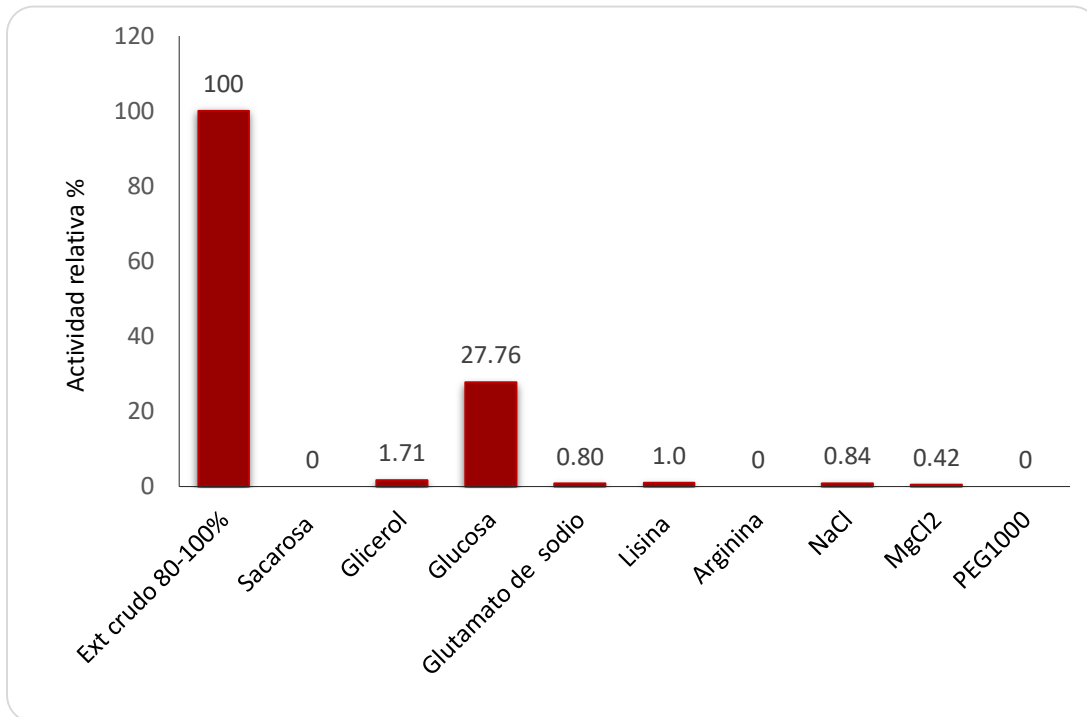


Figura 7. Actividad residual de la PP-Glk después de dializarla contra diferentes agentes estabilizantes. Se muestra la actividad relativa en % respecto al control (fracción de 80-100%)

Como se observó que la enzima era estable hasta por 2 meses a 4°C en de la fracción de 80-100% con sulfato de amonio, se continuó usando esta preparación semipura para la determinación de las características bioquímicas y las constantes cinéticas de la PP-Glk.

### 10.3 Temperatura y pH óptimo.

La temperatura óptima se determinó midiendo actividad utilizando un equipo Peltier (Thermo Scientific) que controla la temperatura, en un rango que va desde 35 a 60°C, estas temperaturas se eligieron de acuerdo con lo reportado para otras PP-Glks de actinobacterias (tabla 8).

Cepa	Temperatura °C	Fuente	Referencia
<i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i>	50	Nativa	Presente trabajo
<i>S. coelicolor</i>	28	Recombinante en <i>E. coli</i>	Koide <i>et al.</i> , 2013
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	50	Recombinante en <i>E. coli</i>	Hsieh <i>et al.</i> , 1996
<i>Thermobifida fusca</i>	50	Recombinante en <i>E. coli</i>	Liao H <i>et al.</i> , 2012
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	40	Recombinante en <i>E. coli</i>	Lindner <i>et al.</i> , 2010

Tabla 8. Comparación de temperaturas óptimas de otras PP-Glks en actinobacterias.

En la figura 8 A, se observan dos máximos de temperatura óptima, el primero está en 40 °C y el otro en 50°C. El primer máximo a 40°C, pertenece a la temperatura óptima de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Roche) que es la enzima acoplada para medir actividad; así que, el segundo máximo pertenece a la PP-Glk de *S. peucetius* var. *caesius*. Este valor de temperatura óptima es igual al de las enzimas de *M. tuberculosis* y *Thermobifida fusca* (tabla 8). Cabe señalar, que la temperatura óptima de la PP-Glk de *S. coelicolor* es de 28°C, la más baja reportada para actinobacterias y muy diferente al de la PP-Glk de *S. peucetius* var. *caesius*. La energía de activación para la PP-Glk fue de  $E_a = 4.85 \times 10^{-4}$  kJ/mol, según el gráfico de la figura 8 B. Este valor es importante porque indica cuál es la rapidez y la energía mínima requerida para que se lleve a cabo la reacción. Imriskova *et al.*, (2001), reportaron para la ATP-Glk de *S. peucetius* var. *caesius* una  $E_a$  de 428 kJ/mol, así que, teniendo los datos de ambas enzimas en dicha bacteria, podemos deducir que la ATP-Glk tiene una velocidad de reacción más alta que la PP-Glk, pero esta última enzima necesita menos energía para que lleve a cabo la reacción, en comparación con la ATP-Glk. Esto concuerda con la literatura donde reportan

que el polifosfato necesita un menor gasto energético de lo que necesita el ATP para llevar a cabo la fosforilación (Koide *et al.*, 2013).

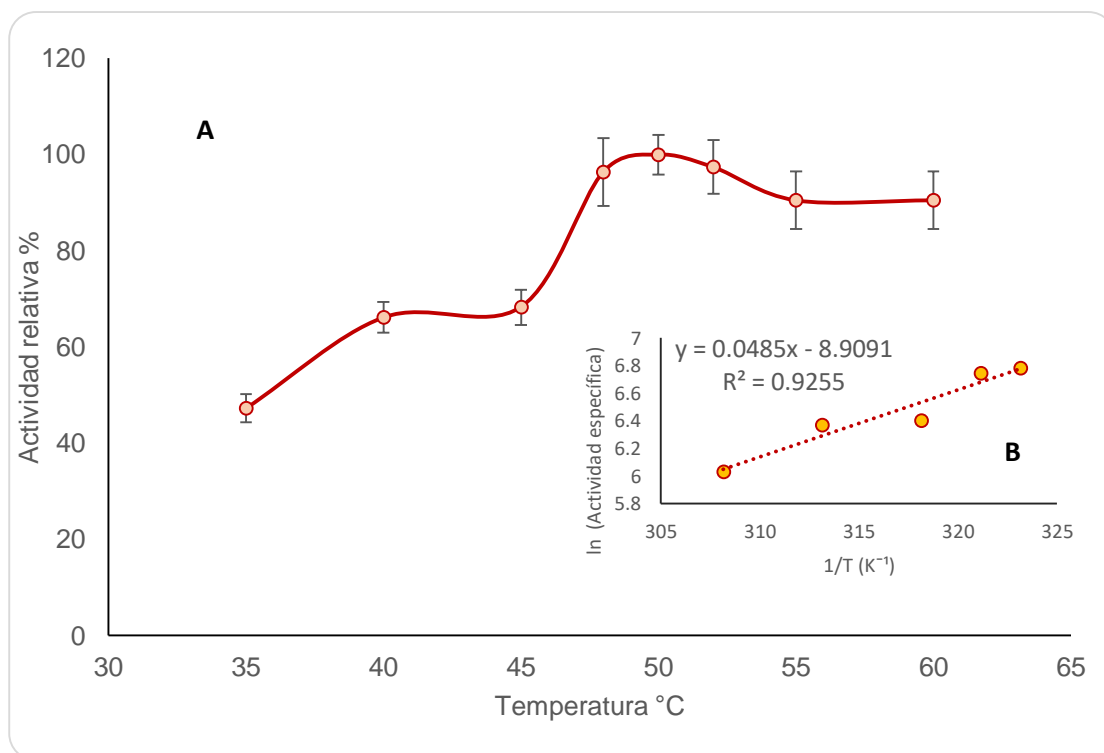


Figura 8. Determinación de temperatura óptima de la PP-Glk de *S. peucetius* var. *caesius*. A) Gráfica de actividad relativa en % de la PP-Glk para determinar la temperatura óptima. B) Gráfica de Arrhenius en un rango de temperaturas de 35 a 50°C.

Para determinar el pH óptimo se tomó como punto de partida el valor óptimo de la PP-Glk de *S. coelicolor* que es de 9.5 (Tabla 9), y se tomaron valores por arriba y por debajo de este pH. Los amortiguadores seleccionados fueron: ácido cítrico-citrato de sodio pH 6, Tris-ácido maleico-NaOH pH 7, Tris-HCl pH 8 y 8.9 y carbonato de sodio-bicarbonato de sodio pH 9.2, 9.5 y 10.1. Como se muestra en la figura 9 el pH óptimo de la PP-Glk fue de 8.9 en el amortiguador Tris-HCl lo cual concuerda con los valores de pH reportados para otras PP-Glks de actinobacterias. Como ejemplo, podemos observar en la tabla 9 que *M. tuberculosis*, *T. fusca* y *S. coelicolor* tienen un pH óptimo muy cercano al de nuestra enzima, mientras que *C. glutamicum* tiene el pH óptimo más bajo en comparación con las otras PP-Glks de actinobacterias.

Como en el caso de la gráfica de temperatura óptima, en figura 9 se muestran dos máximos, el primero a un pH de 8 y el segundo a un pH de 8.9. Y como en el caso anterior, de acuerdo con la literatura, el primer máximo pertenece a la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Roche) y el segundo máximo a la PP-Glk.

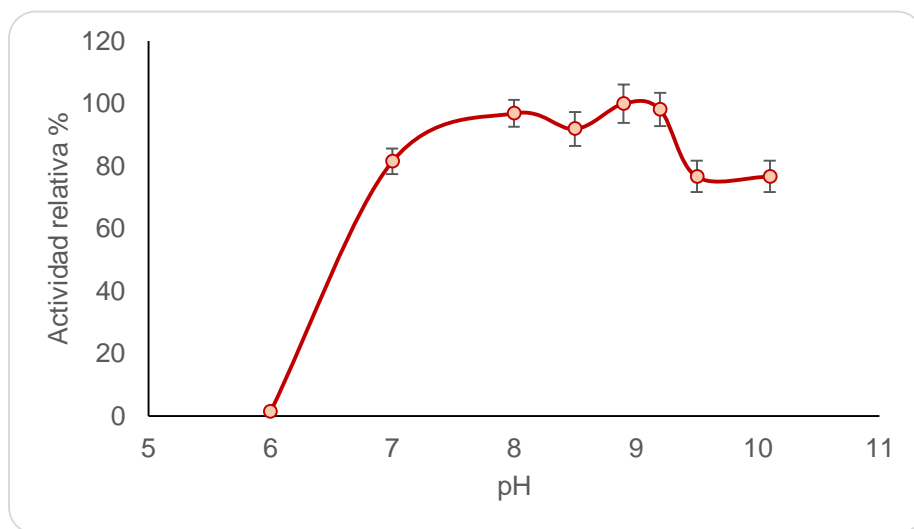


Figura 9. Gráfica de actividad relativa en % de la PP-Glk para determinar el pH óptimo.

Cepa	pH	Fuente	Referencia
<i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i>	8.9	Nativa	Presente trabajo
<i>S. coelicolor</i>	9.5-10	Recombinante en <i>E. coli</i>	Koide <i>et al.</i> , 2013
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	8.6 -9.5	Recombinante en <i>E. coli</i>	Hsieh <i>et al.</i> , 1992
<i>Thermobifida fusca</i>	9	Recombinante en <i>E. coli</i>	Liao <i>et al.</i> , 2012
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	7.4	Recombinante en <i>E. coli</i>	Lindner <i>et al.</i> , 2010

Tabla 9. Comparación de valores de pH óptimo de otras PP-Glks en actinobacterias.

## 10.4 Determinación de constantes cinéticas

Para el cálculo de la  $K_m$  y  $V_{max}$  para polifosfato, se inició con un barrido de concentraciones de hexametafosfato de 1, 10 y 100 mM. Se observó que con estas concentraciones la enzima se saturaba, por lo que se probaron concentraciones menores a 1 mM, con lo que se observó el comportamiento típico de Michaelis-Menten (figura 11). Una vez hecha la gráfica de dobles recíprocos (figura 10), se encontró una  $K_m$  de  $0.11 \pm 0.012$  mM y  $V_{max}$  de  $166.03 \pm 8.54$  nmol/min mg para hexametafosfato.

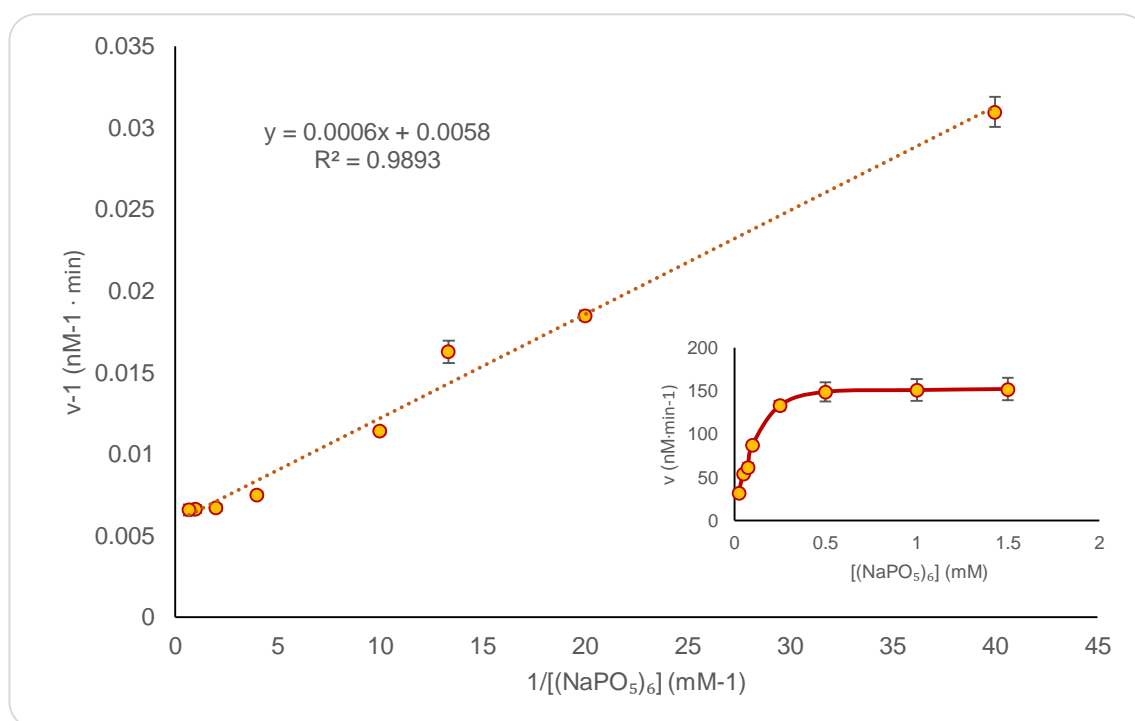


Figura 10. Gráfica de dobles recíprocos y curva de Michaelis-Menten de la PP-Glk para polifosfato.

La  $K_m$  obtenida de la PP-Glk de *S. peucetius* var. *caesius* es mayor que la reportada para las enzimas de *M. tuberculosis* y *S. coelicolor*, pero menor que la  $K_m$  de la PP-Glk de *C. glutamicum* (tabla 10).

Cepa	K <sub>m</sub> (mM) hexametáfosfato	Fuente	Referencia
<i>S. peuceetius</i> var. <i>caesius</i>	0.11 ± 0.012	Nativa	Presente trabajo
<i>S. coelicolor</i>	3.87 × 10 <sup>-3</sup>	Recombinante en <i>E. coli</i>	Koide <i>et al.</i> , 2013
<i>M. tuberculosis</i>	0.0139 ± 0.014 pH 7.5	Recombinante en <i>E. coli</i>	Hsieh <i>et al.</i> , 1996
<i>C. glutamicum</i>	1	Recombinante en <i>E. coli</i>	Lindner <i>et al.</i> , 2010

Tabla 10. Comparación de valores de K<sub>m</sub> para polifosfato de otras PP-Glks en actinobacterias.

Al analizar las diferencias entre los valores de K<sub>m</sub> de las PP-Glks para polifosfato, se encontró que el tamaño de cadena de polifosfato puede afectar la unión de la enzima y por lo tanto el cálculo de la K<sub>m</sub>. Cuando se tiene una cadena de polifosfato grande (724 o 138 unidades de fosfato), la K<sub>m</sub> es menor comparada con el valor de K<sub>m</sub> cuando se tiene una cadena de polifosfato pequeña (30 unidades de fosfato). La fosforilación procesiva implica transfosforilaciones repetidas de una sola cadena de polifosfato antes de que se libere de la enzima, resultando en una K<sub>m</sub> pequeña. Por otra parte, la fosforilación no procesiva, implica la disociación de la enzima del polifosfato después de cada evento catalítico, por tanto resulta en un valor mayor de K<sub>m</sub> (Pepin y Harland *et al.*, 1986). En la tabla 10 se observa que los valores de K<sub>m</sub> para las PP-Glks son pequeños (muestran alta afinidad) ya que para su determinación utilizaron polifosfatos de cadena mediana (25, 32 y 75 unidades de fosfato). En el presente trabajo se utilizó un polifosfato de 6 unidades, dado que fue el único del que se reportaba su peso molecular, debido a su menor tamaño de cadena, la K<sub>m</sub> determinada para nuestra enzima fue más alta.

Para determinar la K<sub>m</sub> para glucosa, se probaron concentraciones preliminares de glucosa de 1, 10 y 100 mM. Como se observó el comportamiento tipo Michaelis-Menten, se hicieron pruebas con otras concentraciones intermedias entre 1 y 100 mM de glucosa. Como se muestra en la figura 11, al realizar la gráfica de dobles

recíprocos (Lineweaver-Burk) la  $K_m$  para glucosa fue de  $4.5 \pm 0.39$  mM y presentó una  $V_{max}$  de  $577.34 \pm 18.86$  nmol/min mg.

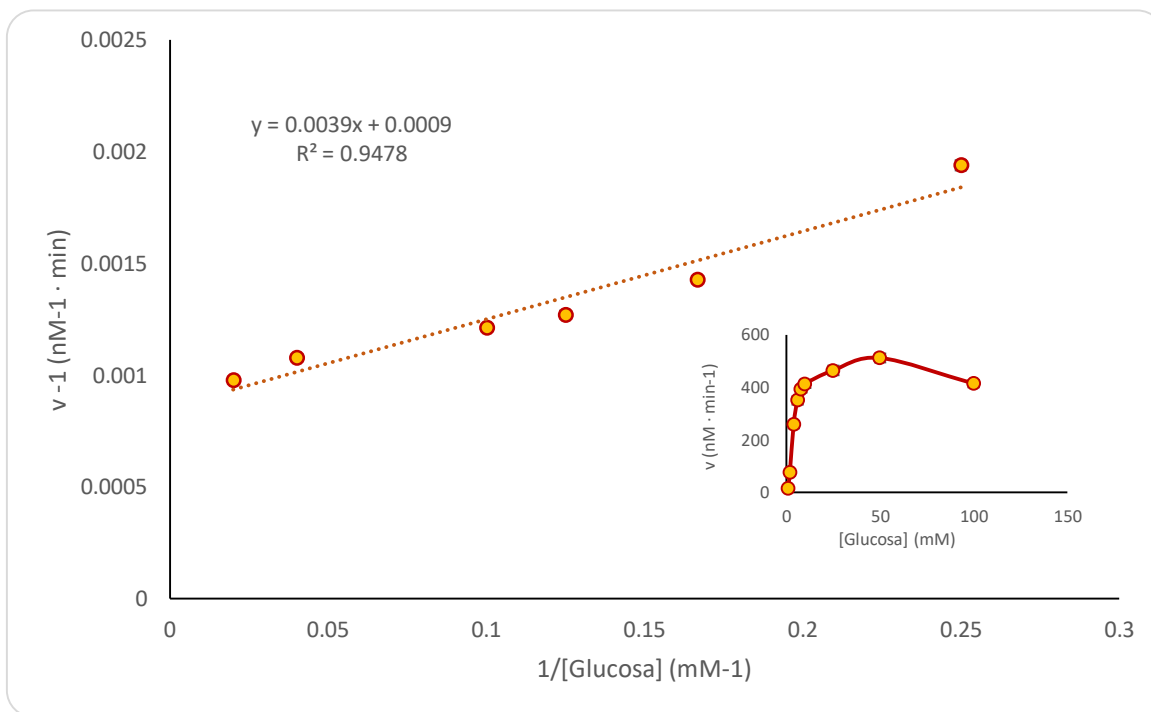


Figura 11. Gráfica de dobles recíprocos y curva de Michaelis-Menten de la PP-Glk para glucosa.

Al comparar esta  $K_m$  con otros valores para PP-Glks de diferentes actinobacterias, no se encontró similitud. La  $K_m$  de la PP-Glk de *S. peucetius* var. *caesius* resultó ser menos afín a glucosa que la enzima de *S. coelicolor*, *S. griseus*, *M. tuberculosis* y *T. fusca*. La única  $K_m$  que resultó ser menos afín por glucosa que la PP-Glk de *S. peucetius* var. *caesius*, fue la de *C. glutamicum*. Esta diferencia se puede deber a que la PP-Glk de *S. peucetius* var. *caesius* es la única nativa, aunque está semipura; mientras que las otras enzimas son recombinantes y puras (Tabla 11). Ambas condiciones afectan las constantes cinéticas de las enzimas. Este comportamiento se ha observado en la caracterización de la ATP-Glk de *S. coelicolor*, pues Ikeda *et al.* (1984) caracterizaron parcialmente la ATP-Glk recombinante obteniendo un  $K_m$  para glucosa de 0.27 mM y para ATP una  $K_m$  de 0.20 mM. Por otro lado, Imriskova *et al.* (2001), al caracterizar la ATP-Glk nativa de *S. coelicolor* obtuvo una  $K_m$  para

glucosa de 1.4 mM y para ATP una  $K_m$  de 0.5 mM. Estos resultados muestran que la caracterización bioquímica puede cambiar tan solo si una proteína es nativa o recombinante.

<b>Cepa</b>	<b><math>K_m</math> (mM) Glucosa</b>	<b>Fuente</b>	<b>Referencia</b>
<i>S. peucetius var. caesius</i>	$4.5 \pm 0.39$	Nativa	Presente trabajo
<i>S. coelicolor</i>	$1.24 \times 10^{-2}$	Recombinante en <i>E. coli</i>	Koide <i>et al.</i> , 2013
<i>S. griseus</i>	$0.207 \pm 0.011$	Recombinante en <i>E. coli</i>	Miyazono <i>et al.</i> , 2012
<i>M. tuberculosis</i>	0.28	Recombinante en <i>E. coli</i>	Hsieh <i>et al.</i> , 1996
<i>Thermobifida fusca</i>	0.450	Recombinante en <i>E. coli</i>	Liao H <i>et al.</i> , 2012
<i>C. glutamicum</i>	21.1	Recombinante en <i>E. coli</i>	Lindner <i>et al.</i> , 2010

Tabla 11. Comparación de los valores de  $K_m$  para glucosa de otras PP-Glks en actinobacterias.

En *S. peucetius var. caesius* se determinaron las constantes cinéticas de las proteínas nativas de ATP-Glk (Imriskova *et al.*, 2001) y PP-Glk (presente trabajo). Estos datos cinéticos nos indican que existe una diferencia de casi 3 veces entre ambas Glks con respecto a su afinidad por glucosa (PP-Glk  $4.5 \pm 0.39$  y ATP-Glk  $1.6 \pm 0.2$  mM). Es posible que la presencia de dos Glks activas en *S. peucetius var. caesius*, explique el consumo de altas concentraciones de glucosa (100-300 mM), con respecto a otras cepas del mismo género que se apenas utilizan 50 mM (Rocha *et al.*, 2018).



En cuanto a la  $K_m$  por el donador de fosfato de la PP-Glk en *S. peucetius* var. *caesius*, se observó aproximadamente 7 veces más afín que la ATP-Glk por ATP ( $0.11 \pm 0.012$  y  $0.8 \pm 0.1$  mM respectivamente). Esto resulta interesante dado que se cree que la PP-Glk es una mejor enzima que la ATP-Glk, en términos del donador de fosfato, ya que el polifosfato abunda en la naturaleza y su costo energético es más bajo en comparación con el ATP (Koide *et al.*, 2013).

### 10.5 Efecto de la manosa y ATP sobre la actividad de la PP-Glk

Se realizaron cinéticas para determinar si la PP-Glk era capaz de reconocer el ATP, puesto que existen PP-Glks de otras actinobacterias, como *M. tuberculosis* y *C. glutamicum*, capaces de utilizar ambos sustratos (tabla 12).

Cepa	$K_m$ (mM)	Fuente	Referencia
<i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i>	Ninguna	Nativa	Presente trabajo
<i>S. coelicolor</i>	NC	Recombinante en <i>E. coli</i>	Koide <i>et al.</i> , 2013
<i>M. tuberculosis</i>	$1.4 \pm 0.8$ pH 8.6	Recombinante en <i>E. coli</i>	Hsieh <i>et al.</i> , 1996
<i>T. fusca</i>	NR	Recombinante en <i>E. coli</i>	Liao H <i>et al.</i> , 2012
<i>C. glutamicum</i>	6	Recombinante en <i>E. coli</i>	Lindner <i>et al.</i> , 2010

Tabla 12. Comparación de valores de  $K_m$  para ATP de otras PP-Glks en actinobacterias. NC: no calculada. NR: no reportada

Se probaron concentraciones de ATP desde 0.025 hasta 200 mM para la PP-Glk de *S. peucetius* var. *caesius*, este barrido de concentraciones se escogió según lo reportado por Koide *et al.*, 2013, sin embargo, no hubo diferencia significativa entre las actividades obtenidas en todas las concentraciones, por lo que esta actividad parece inespecífica y/o basal. Estos resultados mostraron que la PP-Glk no reconoce el ATP y no pudo ser utilizado como modelo para la determinación de inhibición competitiva con respecto al polifosfato. A diferencia de *S. peucetius* var. *caesius*, en *S. coelicolor*, Koide *et al.* (2013), mencionan que su PP-Glk tiene actividad con ATP en un rango de 1 a 4 mM pero no determinaron la constante de inhibición.

Por otra parte, también se realizaron cinéticas para determinar si la PP-Glk era capaz de reconocer manosa y así determinar la constante de inhibición. Se eligió manosa porque es un epímero de la glucosa, ambos son aldosas y se ha reportado que algunas Glks además de reconocer glucosa, son capaces de reconocer manosa con menor afinidad (Mukai *et al.*, 2003, Dörr *et al.*, 2003). Sorprendentemente los resultados muestran un efecto contrario a lo reportado, pues como se muestra en la figura 12, la manosa en presencia de glucosa, parece “potenciar” la actividad de la PP-Glk. Sin embargo, no se detecta ninguna actividad con manosa en ausencia de glucosa, por lo que no sirvió de modelo para la determinación de inhibición competitiva con respecto a glucosa.

Es posible que la PP-Glk fosforile ambos carbohidratos, produciendo glucosa-6-fosfato y manosa-6-fosfato y como se explicó en la metodología, para medir actividad se utiliza un sistema acoplado en donde participan dos enzimas la PP-Glk y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y lo que se mide es la reducción de NADP a NADPH por acción de esta última enzima. Dicho lo anterior, al generarse glucosa-6-fosfato y manosa-6-fosfato por la PP-Glk, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa pudiera estar reconociendo ambos sustratos fosforilados, aumentando la reducción de NADP a NADPH y por ende se traduce como un aumento de actividad. Por otro lado, también puede deberse a que se utiliza un extracto donde la enzima PP-Glk

esta semipura y pudiera contener otras enzimas que estuvieran reduciendo el NADP e interpretarse como un aumento de actividad.

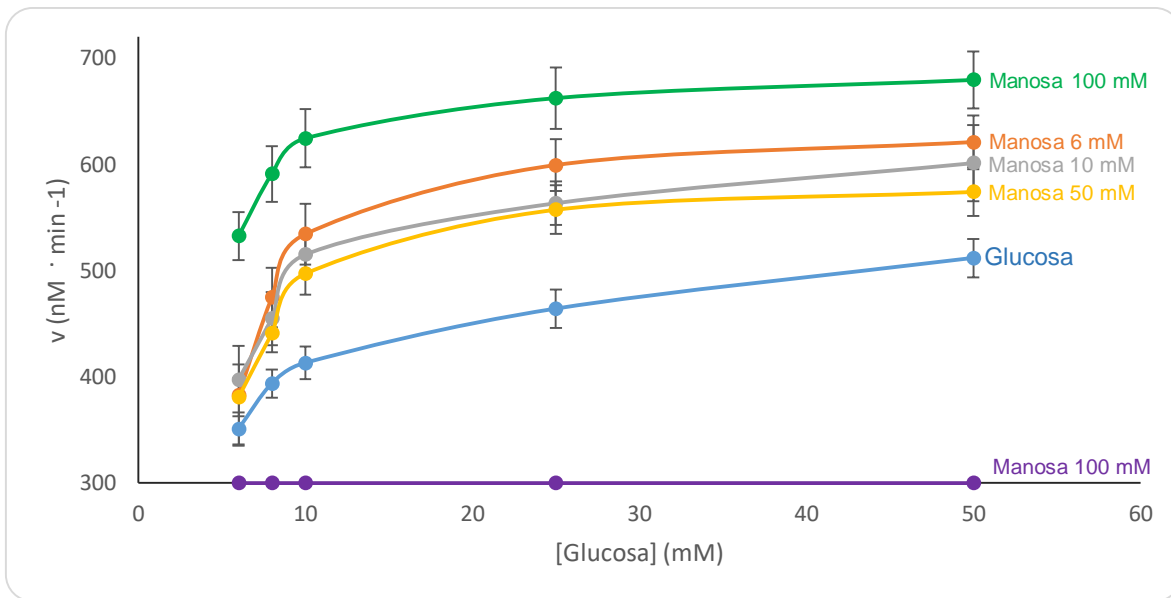


Figura 12. Gráfica de actividad específica de la PP-Glk a diferentes concentraciones de manosa y glucosa constante.

## 11. Conclusiones

- La PP-Glk fue purificada parcialmente por precipitación con sulfato de amonio, lo que incrementó su actividad específica en 22 veces con respecto al extracto crudo.
- La PP-Glk presentó una temperatura óptima de 50°C y un pH óptimo de 8.9, en concordancia con lo reportado para otras actinobacterias.
- La PP-Glk presentó una  $K_m$   $0.11 \pm 0.012$  mM para hexametáfosfato con una  $V_{max}$   $166.03 \pm 8.54$  nmol/min mg. Para glucosa tuvo una  $K_m$  de  $4.5 \pm 0.39$  mM con una  $V_{max}$  de  $577.34 \pm 18.86$  nmol/min mg.
- La caracterización bioquímica de la PP-Glk de *S. peucetius* var. *caesius* mostró que posee una menor afinidad para glucosa que la ATP-Glk, aunque la afinidad de la PP-Glk por el polifosfato fue mayor en comparación a la afinidad que tiene la ATP-Glk por ATP.
- La presencia de dos Glks activas en esta bacteria podría explicar por qué *S. peucetius* var. *caesius* puede degradar una mayor concentración de glucosa en comparación con otras cepas del mismo género.

## 12. Perspectivas

Probar la purificación de la enzima usando cromatografía de interacción hidrofóbica, ya que ha mostrado ser estable bajo condiciones de hidrofobicidad (sulfato de amonio).

## 13. Bibliografía

Angell S, Schwartz E & Bibb JM (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

Arcamone F, Cassinelli G, Grein A, Orezzi P, Pol C & Spalla C (1969) Adriamycin, 1,4- hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peuceitius* var. *caeusius*. *Biotechol Bioeng* XI: 1101-1110

Chater KF, Biró S, Lee KJ, Palmer T., & Schrempf H. (2010) The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Rev* 34(2): 171-98.

Creighton T. E. (1997). *The Practical Approach Series*. United States: Oxford University Press Inc. Pp 349-365

Dawson R M C, Elliott D C, Elliott W H, & Jones, K M (1969) *Data for biochemical research*. Inglaterra: Oxford University Press Inc. p 616

Dörr C, Zaparty M, Tjaden B, Brinkmann H & Siebers B (2003). The hexokinase of the hyperthermophile *Thermoproteus tenax*. *J Biol Chem*, 278(21): 18744-18753.

Engbrecht J, Brent R & Kaderbhai M A. (2000) Current protocols in molecular biology minipreps of plasmid DNA (Published Online: 1 MAY 2001). Disponible en: [http://www.aun.edu.eg/molecular\\_biology/Proceeding\\_Dec2011/Current%20Protocols%20in%20Mol.%20Biol..pdf](http://www.aun.edu.eg/molecular_biology/Proceeding_Dec2011/Current%20Protocols%20in%20Mol.%20Biol..pdf) (Último acceso 23 de septiembre de 2018).

Especificaciones de la enzima glucosa-6- fosfato deshidrogenasa, Roche. [http://custombiotech.roche.com/home/Product\\_Details/3\\_1\\_1\\_3\\_16\\_5.html](http://custombiotech.roche.com/home/Product_Details/3_1_1_3_16_5.html), última visita 8 de enero de 2019.

Gubbens J, Janus M, Florea BI, Overkleeft HS & van Wezel GP (2012) Identification of glucose kinase-dependent and -independent pathways for carbon control of

primary metabolism development and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* by quantitative proteomics. *Mol. Microbiol* 86:1490–1507.

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

Hodgson DA (1982). Glucose repression of carbon uptake and metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) and its perturbation in mutants resistant to 2-deoxyglucose. *J. Gen Microbiol*, 128: 2417-2430.

Hostalek Z, Tobek I, Bobyk MA, Kulayev IS (1976) Role of ATP glucokinase and polyphosphate glucokinase in *Streptomyces aureofaciens*. *Folia Microbiol*, 21:131–138.

Hsieh P, Shenoy B, Samols D & Phillips N (1996) Cloning, expression, and characterization of polyphosphate glucokinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem*, 271(9): 4909 –4915.

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

Imriskova I, Langley E, Arreguín-Espinosa R, Aguilar G, Pardo JP & Sanchez S (2001) Rapid purification and biochemical characterization of glucose kinase from *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Arch Biochem Biophys*, 394:137–144.

Imriskova I, Arreguín-Espinosa R, Guzmán S, Rodríguez-Sanoja R, Langley E & Sanchez S (2005) Biochemical characterization of the glucose kinase from *Streptomyces coelicolor* compared to *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Res. Microbiol*, 156: 361–366.

Kamata K, Mitsuya M, Nishimura T, Eiki J & Nagata Y (2004) Structural basis for allosteric regulation of the monomeric allosteric enzyme human glucokinase. Elsevier Science Ltd., 12, 429–438.

Kawai S, Mukai T, Mori S, Mikami B & Murata K (2005) Hypothesis: structures, evolution, and ancestor of glucose kinases in the hexokinase family. *J Biosci Bioeng* 99:320–330.

Kieser T, Bibb M J, Buttner M J, Chater K F & Hopwood D A (2000) Practical *Streptomyces* genetics. Norwich: John Innes Foundation.

Koide M, Miyanag A, Kudo F & Eguchi T (2013) Characterization of polyphosphate glucokinase SCO5059 from *Streptomyces coelicolor*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 77:2322–2324.

Kwakman JHJM & Postma PW (1994) Glucose kinase has a regulatory role in carbon catabolite repression in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol*, 176:2694–2698.

Liao H, Myung S & Zhang Y-H P (2012) One-step purification and immobilization of thermophilic polyphosphate glucokinase from *Thermobifida fusca* YX: glucose-6-phosphate generation without ATP. *Appl Microbiol Biotechnol*, 93:1109–1117

Lindner SN, Knebel S, Pallerla SR, Schoberth SM & Wendisch VF (2010) Cg2091 encodes a polyphosphate/ATP-dependent glucokinase of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 87:703–713

Lunin V, Li Y, Schrag J, Iannuzzi P, Cygler M & Matte A (2004) Crystal structures of *Escherichia coli* ATP-dependent glucokinase and its complex with glucose. *J Bacteriol*, 186(20): 6915–6927.

Mahr K, Wezel G, Svensson C, Kregel U, Bibb M & Titgemeyer F (2000) Glucose kinase of *Streptomyces coelicolor* A3(2): large purification and biochemical analysis. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78: 253-261.

Miyazono K-I, Tabei N, Morita S, Ohnishi Y, Horinouchi S & Takonura M (2012) Substrate recognition mechanism and substrate-dependent conformational changes of an ROK family glucokinase from *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol*, 194:607–616.

Mukai T, Kawai S, Matsukawa H, Matuo Y, & Murata K (2003) Characterization and molecular cloning of a novel enzyme, inorganic polyphosphate/ATP-glucomannokinase, of *Arthrobacter* sp. strain KM. *Appl Environ Microbiol*, 69(7): 3849-3857.

Otten S, Stutzman-Engwall K & Hutchinson C (1990) Cloning and expression of daunorubicin biosynthesis genes from *Streptomyces peucetius* and *S. peucetius* subsp. *caesius*. *J Bacteriol*, 172(6): 3427-3434.

Pepin C & Wood H (1985) Polyphosphate glucokinase from *Propionibacterium chermanii*. *J Biol Chem*, 216(10): 4476-4480.

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

Rocha, D. (2018) Optimización de la conjugación para la obtención y evaluación de dos mutantes en genes Glk y su efecto en la fisiología de *Streptomyces peucetius* var *caesius*. Tesis doctorado. UNAM. Facultad de Química.

Ruiz-Villafán B, Rodríguez-Sanoja R, Aguilar-Osorio G, Gosset G & Sanchez S (2015) Glucose kinases from *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98(13): 6061-71.

Scopes Robert (1987). *Protein purification*. USA: Springer-Verlag. Pp 50-54

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

Song Y, Liu G, Li J, Huang H, Zhang X, Zhang H & Ju J (2015) Cytotoxic and antibacterial angucycline- and prodigiosin-analogues from the deep-sea derived *Streptomyces* sp. SCSIO 11594. *Mar Drugs*, 13(3): 1304-16.



## 14. Anexo

- Medios de cultivo

Para cultivo de *Escherichia coli*:

---

<b>LB (Luria-Bertani)</b>	
Difco Bacto triptona	10 g
Difco Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agua destilada	1000 mL
pH	7

---

Para cultivo de las cepas de *Streptomyces*:

---

<b>YM (Yeast Extract-Malt Extract)</b>	
Difco Extracto de levadura	4.0 g
Difco Extracto de malta	10 g
Agua destilada	1000 mL
pH	7.2

---

\*YMG: se le adiciona glucosa 100mM

---

<b>NDM (Nitrate defined medium)</b>	
Baker NaNO <sub>3</sub>	0.85 g/L
Sigma K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.13 g/L
Sigma MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	10 mL Stock 50 mM
Elementos traza 10x	20 mL/L
Difco Extracto de levadura	200 g/L
Baker Glucosa	100 mL Stock 1M
pH	7.3

---

---

<b>Elementos traza para medio NDM</b>	
Sigma ZnCl <sub>2</sub>	40 mg/100 mL
Baker FeCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	200 mg /100 mL
Baker CuCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	2 mg /100 mL
Baker MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	2 mg /100 mL
Baker Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> · 10H <sub>2</sub> O	2 mg /100 mL
Baker (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MO <sub>7</sub> · 4H <sub>2</sub> O	10 mg /100 mL
Baker NiCl	5 mg /100mL
Agua destilada	1000 mL

---

---

**YEME (Yeast Extract-Malt Extract medium)**

---

Difco Extracto de levadura	3 g/L
Difco Peptona	5 g/L
Difco extracto de malta	3 g/L
Baker Glucosa	10 g/L
Bio-Rad Sacarosa	340 g (34% final)
Agua destilada	1000 mL

---

Después de esterilizar adicionar  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (2.5 M) ... 2 mL/L (5 mM final)  
Glicina (20%) ... 25 mL /L (0.5% final).