

LA PRODUCCIÓN DE UN ANTICANCERÍGENO: MODELO PARA EL ESTUDIO DE LAS BASES BIOQUÍMICAS Y MOLECULARES DE LA REPRESIÓN CATABÓLICA EN *STREPTOMYCES*

Silvia Guzmán, Itzel Ramos, Iveta Imriskova, Nadine Mascareñas, Alonso Carmona, Rosa del Carmen Mateos, Laura Escalante, Beatriz Ruiz, Elizabeth Langley, Romina Rodríguez y Sergio Sánchez. Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Ciudad Universitaria D.F. 04510.

Fax 55-5622-3855 sersan@servidor.unam.mx

Palabras clave: Streptomyces, represión catabólica, fermentación, regulación.

Introducción. Fuentes de carbono tales como el almidón de maíz, la glucosa y las melazas, pueden ser utilizadas por los sistemas microbianos como sustratos para la producción de enzimas (1), antibióticos y otros metabolitos de interés industrial (2). Sin embargo, la producción de dichos metabolitos puede verse muy limitada cuando los microorganismos productores son crecidos en fuentes de carbono fácilmente asimilables como la glucosa por ejemplo. Este mecanismo regulador de la síntesis se ha denominado represión catabólica por carbono (CCR) y se encuentra ampliamente distribuido entre los sistemas microbianos, lo cual asegura una utilización organizada y secuencial de la fuente de carbono, cuando más de un carbohidrato se encuentra de manera simultánea en el medio de cultivo. Los mecanismos responsables de la represión catabólica son diversos y complejos y posiblemente existan diferentes sistemas en un solo microbio (3).

En el género *Streptomyces*, tanto la utilización de diferentes fuentes de carbono como la síntesis de varios metabolitos secundarios es susceptible a represión catabólica por glucosa (4, 5). El conocer y sortear éste mecanismo regulador en los estreptomicetos puede tener implicaciones comerciales, si consideramos que casi el 70% de los antibióticos de interés clínico son producidos por este género (5).

Para que se lleve a cabo la CCR en esta bacteria, varios grupos de investigación han coincidido en señalar una posible acción reguladora de la enzima glucosa cinasa (Glc) (4, 6, 7, 8, 9, 10). Esta enzima cataliza la fosforilación de glucosa a glucosa 6-fosfato. Las principales evidencias que soportan la acción de la Glc han sido obtenidas en *Streptomyces coelicolor*. Mutantes de éste microorganismo, aisladas por su insensibilidad a CCR, revierten su fenotipo al recibir un fragmento de DNA de 2.9 kb (6). Parte de dicho fragmento (1.2 kb) codifica para la Glc. Adicionalmente, estas mutantes muestran insensibilidad cruzada al efecto represor de otras fuentes de carbono que no se metabolizan por la Glc (8). No obstante, el análisis de la secuencia de aminoácidos de Glc no revela motivos de unión al DNA (7).

Un mecanismo clave para la CCR en enterobacterias y bacterias Gram-positivas con bajo contenido de G-C, es el sistema fosfoenolpiruvato:fosfotransferasa (PTS). Dicho mecanismo ha sido identificado y caracterizado en tres especies de *Streptomyces* (11). En estas especies se ha establecido su participación para la utilización de fructosa,

así como en la regulación que éste carbohidrato ejerce sobre la utilización de otras fuentes de carbono (12). Sin embargo, no puede explicar la acción que ejercen otras fuentes de carbono represoras como la glucosa, la xilosa, la galactosa y la arabinosa, las cuales aparentemente no son utilizadas por el sistema PTS de esta bacteria. Por otra parte, en la esencia de este proceso en *Streptomyces* (y en otras bacterias Gram-positivas), se ha descartado la participación de los niveles de AMP cíclico intracelular, así como de la proteína receptora de este nucleótido (3, 7).

Streptomyces peucetius var. *caesius* produce el antitumoral doxorubicina (DXR), el cual se forma como parte de una familia de antibióticos denominados antraciclinas. A pesar de poseer efectos tóxicos colaterales, éste compuesto es muy importante en la clínica como agente terapéutico para el tratamiento de diversas neoplasias. Su uso en oncología data de los años 70's y los tumores que con mayor frecuencia responden a su empleo incluyen: carcinoma esofágico y de mama; cáncer gástrico, de próstata y de ovario; leucemia; osteosarcoma, sarcoma de Kaposi y linfomas (13). La DXR fue aislada en 1969 de células de una mutante sobreproductora del anticancerígeno (*S. peucetius* var. *caesius* ATCC 27952). Dicha mutante fue derivada de la cepa silvestre de *S. peucetius* ATCC 29050, productora de daunorrubicina (DNR), otro compuesto antitumoral. En la actualidad la DXR es formada por hidroxilación de DNR en proporciones que alcanzan los 225 kg anuales. Dicho volumen, además de ser empleado en clínica, sirve de materia prima para la búsqueda de derivados químicos con mejores propiedades y menores efectos tóxicos colaterales para el tratamiento del cáncer. La producción fermentativa de este compuesto es muy ineficiente, consecuentemente, el entendimiento de los mecanismos regulatorios que controlan su producción se visualiza como una herramienta para el desarrollo de cepas sobreproductoras y para mejorar el proceso fermentativo, dado lo costoso del producto.

En los últimos años nuestro grupo de trabajo se ha abocado al estudio de dichos mecanismos en una cepa de *S. peucetius* var. *caesius*, productora de DXR. En ella hemos observado que tanto la utilización de diversas fuentes de carbono como la síntesis de metabolitos secundarios, son reprimidas por glucosa (9, 14). Otras fuentes de carbono como la arabinosa y la galactosa, también ejercen este efecto negativo sobre el metabolismo primario y secundario (9). Por un proceso de

selección en placa se logró el aislamiento de mutantes de *S. peucetius* var. *caesius*, capaces de utilizar lactosa en presencia del análogo de glucosa 2-desoxiglucosa (DOXG). Las mutantes resistentes a DOXG (doxg^R), también son insensibles a la CCR ejercida por glucosa y presentan bajos niveles de Glk (9). Adicionalmente a la baja actividad de Glk, las mutantes presentan disminuida su capacidad para incorporar glucosa (14). De este modo, con bajos niveles de Glk y deficiencias en la incorporación de glucosa, las mutantes doxg^R logran sortear el efecto negativo de DOXG, al producir una mínima concentración de DOXG 6-fosfato. Estos resultados más que proponer a la Glk como responsable de la CCR, apoyan al catabolismo de glucosa y la formación de intermediarios metabólicos, como los posibles involucrados en este fenómeno de regulación. El objetivo del presente trabajo es obtener evidencia adicional que apoye alguno de los dos mecanismos propuestos: participación de la Glk como reguladora versus la formación de intermediarios de la glucólisis que disparen el fenómeno, o bien que genere alternativas adicionales.

Metodología. *Microorganismos, condiciones de crecimiento y producción de metabolitos.* *S. peucetius* var. *caesius* NRRL B-5337 fue proporcionado por el ARS Culture Collection, U.S. Department of Agriculture, Peoria, IL. USA. La cepa doxg^R-21, previamente aislada en nuestro laboratorio como resistente a DOXG, presenta una Glk disminuida e insensibilidad a CCR (9). *S. coelicolor* (A3(2) M145 (SCP-1, SCP-2, protótrofo) fue amablemente donado por Luis Servin-González (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México DF). Esporas de estos microorganismos fueron obtenidas y mantenidas como se reportó previamente (9). Por comodidad, para medir la producción del antitumoral empleamos un método colorimétrico que determina las antraciclinas totales (9). Para la determinación de β-galactosidasa, Glk y producción de antraciclinas usamos muestras de 2.5 ml de un cultivo crecido en medio YM (50 ml), en matraces Erlenmeyer de 250-ml. La β-galactosidasa y el transporte de glucosa se midieron a las 36 h y la antraciclinas y Glk a las 48 h de incubación tal y como se reportó anteriormente (14). La determinación del efecto de productos del catabolismo de glucosa [glucosa-6-fosfato, fructosa 1,6 bis -fosfato, fosfoenolpiruvato, piruvato, acetato, citrato, β-cetoglutarato, o succinato (20 mM)], se llevó a cabo según Ramos y col., (15). Los cultivos se crecieron a 29 °C en una agitadora giratoria a 180 rpm.

Aislamiento de mutantes sensibles a DOXG. Para este objetivo se partió de una suspensión de esporas de la cepa doxg^R-21, al cual se aplicó un método de enriquecimiento con ampicilina para matar a todas las células doxg^R. El micelio remanente fue centrifugado, lavado con salina, resuspendido en 50 ml de medio CD con lactosa/NH₄Cl y el procedimiento de enriquecimiento se repitió creciendo las células viables por 48 h. Para evitar el aislamiento de cepas incapaces de crecer en glucosa, el cultivo final fue inoculado en medio YM sólido suplementado de glucosa 100 mM. Colonias individuales fueron aisladas de estas cajas y

probadas por su sensibilidad a DOXG en presencia de lactosa (mutantes doxg^S). Bajo estas condiciones, 8 de 223 colonias probadas fueron inhibidas por DOXG (15).

Ensayos enzimáticos. La actividad de Glk se determinó en extractos libres de células de acuerdo a Imriskova y col., (16). β-Galactosidasa se ensayó a 37 °C y pH 7.5, de acuerdo a Eckhardt y col., (17), GIK y β-galactosidasa son expresadas como unidades por mg de proteína celular total. Una unidad (U) es definida como la cantidad de enzima que produce 1 nmola de NADPH por minuto o 1 μmola de D-galactosa por minuto, respectivamente, bajo las condiciones empleadas.

Análisis de Southern blot y clonación. El gen *glkA* de *S. coelicolor* fue empleado como sonda para detectar su homónimo en DNA de *S. peucetius* var. *caesius*, así como en las mutantes derivadas de este último microorganismo. El DNA cromosomal fue extraído por el método descrito por Hopwood y col., (18). El Southern blot y la hibridación se llevaron a cabo por métodos tradicionales (19). La glucosa cinasa de *S. peucetius* var. *caesius* fue amplificada usando PCR a partir de DNA total DNA de la cepa original. Los oligonucleótidos fueron diseñados con base en estudios de secuenciación reportados (16), cubriendo los primeros y los últimos cinco aminoácidos. Sitios de restricción fueron adicionados a los oligonucleótidos usados: forward (5' AATCTAGATGGGACTCACCATC 3') con *Xba*I, y reverse (5' GTAAGCTTCACATGATCGGGTC 3') con *Hind*III (15). Los productos de PCR fueron purificados y clonados usando el kit TOPO TA de Invitrogen (Carlsbad, CA).

Resultados y discusión. La aplicación de un procedimiento de enriquecimiento con ampicilina a una cepa de *S. peucetius* var. *caesius* resistente a DOXG (doxg^R), permitió la selección de ocho mutantes que recuperaron la sensibilidad a dicho análogo (doxg^S). La caracterización de tres de las cepas doxg^S, mostró niveles de Glk por encima de la cepa padre (doxg^R-21), pero menores que la cepa original (Cuadro 1). Una de las mutantes (doxg^S-53), recuperó de manera parcial su sensibilidad a la represión catabólica (medida por la capacidad de producción de antraciclinas en 495 mM de D-glucosa con relación a 100

Cuadro 1. Fenotipo de diferentes cepas de *S. peucetius* var. *caesius*

Cepas	Sensib doxg [*]	Transporte de glucosa (%)†	Glk (%)‡	Represión de antraciclinas (%)‡	Relación Transp/Glk
Original	S	100	100	92.5	1.0
doxg ^R -21	R	54	14	0.0	3.8
doxg ^S -2	S	18	35	5.6	0.5
doxg ^S -11	S	72	84	15.0	0.8
doxg ^S -53	S	150	19	50.8	7.8

* doxg: 2-desoxiglucosa fue usada a una concentración de 10 mM. S: sensible, R: resistente.

† Transporte de glucosa: 100% significa 2.21 μ molas mg de peso seco⁻¹, Glk 100% de actividad significa 170 U mg de proteína⁻¹.

‡ Diferencia en por ciento entre antraciclinas producidas a 100 y 495 mM D-glucosa.

mM del azúcar), mientras que las otras permanecieron insensibles (15). En una de las cepas resistentes a CCR (doxg^S-2), el nivel de Glk fue del (35%), pero en la segunda (doxg^S-11) fue del 84% (20). Los resultados obtenidos, no permiten observar una clara relación entre la actividad de Glk y la sensibilidad a la represión catabólica, ya que la resistencia a represión se observó por igual en mutantes con baja (14% en la doxg^R-21) y elevada concentración de Glk (84% en la doxg^S-11), mostrando que la fosforilación de glucosa por sí sola, no es suficiente para explicar la represión que ejerce esta fuente de carbono (20). En otros estreptomicetos se han publicado resultados que concuerdan con los nuestros. Por un lado se ha visto que la regulación por glucosa del promotor *chi63*, puede llevarse a cabo en mutantes de *S. coelicolor* que carecen de Glk (21). Además, en *Streptomyces rubiginosus*, Wong y col., (22) observaron que la represión de *xyl* tampoco se media por la Glk. Finalmente, Angell y col. (23) aislaron mutantes Glc⁺ de *S. coelicolor* a partir de una cepa doxg^R, las cuales recuperaron su sensibilidad a DOXG y los niveles de Glk de la cepa original, pero no la sensibilidad a represión por glucosa del gen de agarasa (*dagA*). En este último reporte nos llamó la atención que la Glk de las mutantes Glc⁺ muestra cambios en su movilidad electroforética con respecto a la cepa original. Es decir, aparece una nueva actividad capaz de llevar a cabo la fosforilación de glucosa. En la Glk de nuestras mutantes (doxg^S y doxg^R), no se observaron diferencias de movilidad electroforética con relación a la cepa original. Es decir, se evidenció la existencia de una sola Glk con un peso molecular aproximado de 135,000 Da. La enzima parece estar agregada en forma de tetrámero, ya que en condiciones desnaturizantes genera subunidades de 32,000 (16). Con el fin de evaluar la presencia de mutaciones para explicar la baja actividad de Glk en las mutantes doxg, se realizaron experimentos de Southern blot, utilizando DNA digerido de las diferentes cepas de *S. peucetius* var. *caesius* y una sonda de *glkA* de *S. coelicolor*. Los resultados muestran bandas sencillas y homólogas de hibridación. Así mismo, de la clonación y análisis de secuencias del gen *glk* de la cepa original y de sus mutantes doxg, no se aprecian diferencias entre ellas. Adicionalmente, al comparar estas secuencias con las reportadas para *S. coelicolor* y *S. lividans*, se observa un 87% de identidad. Estos resultados apoyan que en la cepa original y en las mutantes derivadas de ella, existe una sola Glk y que las mutantes no presentan ninguna alteración en la enzima que explique su baja actividad. Por otro lado, sugieren la presencia de una alteración en otro (s) sitio del genoma. Por otra parte, con relación a la cepa padre (doxg^R-21), las mutantes doxg^S aisladas presentaron también diferencias en la incorporación de glucosa (Cuadro 1), la cual se encuentra disminuida en las cepas resistentes a represión por glucosa (18 y 72%), pero incrementada (150%) en aquella que es sensible al efecto represivo (15). De este modo, si bien nuestros resultados no parecen involucrar a la Glk en el fenómeno de represión por glucosa,

no descartan que sea la relación entre la Glk y el transporte de glucosa la responsable de este efecto. En apoyo a este punto de vista, encontramos que dos de las mutantes doxg^S (2 y 11), resistentes a su vez a regulación catabólica por carbono, mostraron una relación parecida de Glk/transporte de glucosa (compare en el Cuadro 1, los valores de tal relación entre las mutantes doxg^S que son resistentes a CCR y su cepa padre). Un cambio en esta relación, con un incremento sustancial en los niveles de transporte de glucosa (150%), fue necesario para que una de las cepas (doxg^S-53), recuperara su sensibilidad a la represión catabólica por glucosa (20), sugiriendo así un papel para el flujo de la glicólisis, o la formación de un producto de degradación de glucosa que dispare el fenómeno de la CCR. En este sentido, es predecible que el binomio transporte de glucosa:Glk, impacte no solo los niveles de glucosa 6-fosfato producidos, sino los de otros intermediarios de la glicólisis. De este modo, es factible suponer que alguno de esos intermediarios participe como una señal metabólica en el proceso de regulación por carbono. En apoyo a esta posibilidad, demostramos que la glucosa 6-fosfato y el fosfoenolpiruvato, afectaron de manera negativa (mas de 50%) la producción de antraciclinas (15). En contraste, la adición de fructosa 1, 6-bisfosfato, revirtió la CCR en la cepa original (de mas de 50% a solo 7% con respecto al control). Una posible explicación de estos resultados esta relacionada con el efecto activador de fructosa 1, 6-bisfosfato sobre la enzima piruvato cinasa, cuya acción ha sido reportada en varios microorganismos y en mamíferos (24). Este efecto podría evitar la acumulación de fosfoenolpiruvato (y con ello su efecto represivo), al facilitar su conversión a piruvato y acetil CoA, precursores a su vez de las antraciclinas (25). En soporte a este punto, piruvato y acetato también causaron una desrepresión de la formación de antraciclinas. Así las cosas, para que se ejerza la CCR en este organismo, es necesario el transporte de glucosa y su fosforilación por la Glk para permitir la formación de los catabolitos señal. No obstante, una vez formados, desconocemos como puedan llevar a cabo su acción los catabolitos mencionados. En este sentido, es poco probable que el metabolito señal pueda combinarse de manera directa con el DNA. Lo más probable es que para ejercer su acción, esta señal se combine con alguna macromolécula o aporrepresor, antes de unirse a los operadores sensibles a su acción, tal y como ocurre en otros géneros microbianos (3). En apoyo a esta posibilidad, la aplicación de técnicas de complementación y análisis de cambio de movilidad electroforética del DNA en *Streptomyces plicatus*, han sugerido el concurso de una proteína en éste proceso regulatorio (26). Dicha proteína, aun no identificada, se une de manera específica al promotor de quitinaza (*chi63*) en condiciones de represión por glucosa (26). En nuestro laboratorio logramos transformar protoplastos de la cepa doxg^R-21 de *S. peucetius* var. *caesius* (la cual es resistente a represión por glucosa y tiene afectada su transporte de glucosa y su actividad de Glk), con un fragmento de DNA de 2.9 Kb de *Streptomyces coelicolor* que codifica para la Glk (6). Como resultado de la transformación, la cepa doxg^R-21 recuperó tanto su sensibilidad a la represión por glucosa como

los niveles de Glk y de transporte de glucosa de la cepa original. Dicho fragmento de 2.9 Kb contiene tres marcos de lectura abiertos, uno de ellos incompleto (*SC6E10.22c*) y dos completos, *SC6E10.21c* (*21c*) y *SC6E10.20c* (*20c*). Sabemos que *20c* codifica para la Glk y en el resto del documento nos referiremos al mismo como *glk* (7), pero no sabemos nada sobre el *21c*. Con el fin de evaluar la influencia de cada una de esas regiones sobre el transporte de glucosa y la actividad de Glk, los fragmentos *21c* y *glk* fueron empleados por separado para transformar a la cepa *doxg^R-21*. Como puede verse en el Cuadro 2, la cepa transformada con *21c* recuperó su sensibilidad a represión por glucosa, su habilidad para transportar éste azúcar y aun y cuando esta región no codifica para la Glk, también se recobró la actividad de la enzima. Por lo que toca a la cepa transformada con el gen *glk* se observó en ella recuperación de la actividad de Glk y de la

Cuadro 2. Fenotipo de la mutante *doxg^R-21* transformada con las regiones *SC6E10.21c* y *glk*.

Cepas	Inserto	Transporte de glucosa (%)	Glk (%)	Sensibilidad a glucosa Antraciclinas (? g/mg proteína) 100 mM 495 mM	
Original	ninguno	100	100	149.1	14.4
<i>dox^R-21</i>	ninguno	68	15	362.6	119.7
21a	<i>SC6E10.21c</i>	100	115	2.5	1.7
21b	<i>glk</i>	68	95	37.1	1.9

sensibilidad a CCR, pero no se restituyó el transporte de glucosa. Hay que hacer notar que la transformante con la región *21c* resultó mas sensible al efecto de glucosa que aquella cepa formada con *glk*. Resultados similares a los obtenidos con *doxg^R-21*, fueron obtenidos al transformar las mutantes *doxg^S*, es decir, el fragmento *21c* permitió recuperar tanto el transporte de glucosa como la actividad de Glk y la sensibilidad a CCR, mientras que con el gen *glk* se recuperó la actividad de la enzima y la sensibilidad a CCR.

Estos resultados muestran que la Glk *per se* permite recuperar la sensibilidad a CCR. No obstante, dicha acción se facilita con un transporte de glucosa del 68%. También indican que la región *21c* posee un papel estimulador tanto de la Glk como de la permeasa de glucosa, generando una recombinante con mayor sensibilidad al efecto negativo de dicho carbohidrato (Cuadro 2). En este punto nos preguntamos si el efecto estimulador sería el resultado de un efecto promotor de la región *21c*, o bien si respondía a un producto de su expresión. Experimentos de análisis por Northern blot, nos han mostrado la formación de RNA mensajero a partir de *21c*, tanto en *S. coelicolor*, como en *S. peucetius* var. *caesius*. Este hallazgo indica la expresión de dicho fragmento en ambos *Streptomyces* y apoya la acción estimuladora de *21c* sobre la Glk, posiblemente por un producto codificado por dicho gen. En respaldo a esta posibilidad, Mahr y col. (27), utilizando metodología de

“surface plasmon resonance”, han detectado en *S. coelicolor*, una proteína aun no caracterizada que se une a la Glk.

Por lo que toca al transporte de glucosa, si bien demostramos que éste es también activado por *21c*, es poco probable que su efecto este relacionado con la síntesis de la permeasa, ya que la cepa *doxg^S-2* (con bajo transporte) no se complementó con éste fragmento de DNA. De este modo, al igual que se propuso para la Glk, *21c* podría jugar un papel regulador de la permeasa.

Conclusiones. En síntesis, las evidencias anteriores apoyan que en el fenómeno de represión por glucosa en el género *Streptomyces*, la actividad de Glk y el transporte de glucosa, determinan variaciones en los niveles de glucosa 6-fosfato y fosfoenolpiruvato, intermediarios de la degradación de este azúcar (15). Que éstos intermediarios pudieran corresponder a señales metabólicas, que informen a la célula de la situación nutricional que se guarda con relación al medio extracelular. Que como resultado de su acumulación, estos metabolitos repriman catabólicamente la síntesis de antraciclinas. Que para disipar dicho proceso, parece ser necesario sincronizar y estimular los eventos catalíticos que participan en su formación. Que una región de DNA denominada *21c*, ubicada río arriba de *glk*, parece ser necesaria para estimular de manera sincronizada los niveles de la permeasa de glucosa y la Glk. Que dicha acción posiblemente se deba al producto de expresión de la región *21c*, la cual fue transcrita formando RNA mensajero. Actualmente se desarrollan estudios para conocer las características del posible producto y en su caso, su concentración, afinidad y forma de participación, en el proceso de represión por glucosa en el género *Streptomyces*. Nos es clara la relevancia que puede tener la identificación y caracterización de dicho producto así como su mecanismo de acción, en la definición del mecanismo de represión catabólica, en un género de gran importancia industrial como son los estreptomicetos.

Agradecimientos. Este trabajo fue financiado en parte con los donativos IN20800 del programa PAPPIT, de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM y 33830-B del CONACYT, México.

Bibliografía

- 1.- Frost, GM y Moss, DA. (1987). Production of enzymes by fermentation. En: *Biotechnology*. Rehmand, HJ, Reed G y Kennedy JF. Vol. 7a. VCH Verlagsgesellschaft Weinheim. pp. 65-211.
- 2.- Rose, AH. (1979). Production and industrial importance of secondary products of metabolism. En: *Economic Microbiology Vol. 3, Secondary products of metabolism*. Rose AH (Ed). Academic Press, New York. pp. 1-33.
- 3.- Saier, MH Jr, Chauvaux, S, Deutcher, J, Reizer, J y Ye, JJ. (1995). Protein phosphorylation and regulation of carbon metabolism in Gram-negative versus Gram-positive bacteria. *TIBS* 20: 267-271.
- 4.- Hodgson, DA. (1982). Glucose repression of carbon source uptake and metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its perturbation in mutants resistant to 2-deoxyglucose. *J. Gen. Microbiol.* 128: 2417-2430.
- 5.- Demain, AL. (1989). Carbon source regulation of idiolite biosynthesis. En: *Regulation of secondary metabolism in*

- Actinomycetes*. Shapiro S (ed). CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 127-134.
- 6.- Ikeda, H., Seno, ET, Bruton, CJ y Chater, KF. (1984). Genetic mapping, cloning and physiological aspects of the glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Gen. Genet.* 196: 501-507.
 - 7.- Angell, S, Schwartz, E y 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.
 - 8.- Kwakman, JHJM y Postma, PW. (1994). Glucose kinase has a regulatory role in carbon catabolite repression in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 176: 2694-2698.
 - 9.- Segura, D, Gonzalez, R, Rodriguez, R, Sandoval, T, Escalante, L y Sanchez, S. (1996). *Streptomyces* mutants insensitive to glucose repression showed deregulation of primary and secondary metabolism. *Asia Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 4: 30-36.
 - 10.- Saito, A, Fugii, T, Yoneyama, T y Miyashita, K. (1998). *glkA* is involved in glucose repression of chitinase production in *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* 180: 2911-2914.
 - 11.- Titgemeyer, F, Walkenhorst, J, Reizer, J, Stiver, MH, Cui, X y Saier MH Jr. (1995). Identification and characterization of phosphoenolpyruvate:fructose phosphotransferase systems in three *Streptomyces* species. *Microbiol.* 141: 51-58.
 - 12.- Nothaft, H, Parche, S, Kamionka A y Titgemeyer, F. (2003). In vivo analysis of HPr reveals a fructose-specific phosphotransferase system that confers high-affinity uptake in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 185: 929-937.
 - 13.- Myers, CE, Mimnaugh, EG, Yeh GC y Sinha, BK. (1988). Biochemical mechanisms of tumor cell kill by anthracyclines. En: *Anthracyclines and anthracenedione-based anti-cancer agents*. Lown J.W. (ed.). Elsevier, Amsterdam. pp. 527-569.
 - 14.- Escalante, L, Ramos, I, Imriskova, I, Langley, E y Sanchez, S. (1999). Glucose repression of anthracycline formation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52:572-578.
 - 15.- Ramos I, Guzmán, S, Escalante, L, Imriskova, I, Rodríguez-Sanoja, R, Sánchez, S y Langley, E. (2003). The glucose kinase alone cannot be responsible for carbon source regulation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *J. Bacteriol.* Sometido
 - 16.- Imriskova, I, Langley, E, Arreguín-Espinoza, R, Aguilar, G, Pardo, JP y Sanchez, S. (2001). Purification and characterization of glucose kinase from *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Arch. Biochem. Biophys.* 394: 137-144.
 - 17.- Eckhard, T, Strickler, J, Gorniak, L, Burnett, WB y Fare, LR. (1987). Characterization of the promoter, signal sequence, and amino terminus of a secreted β -galactosidase from "*Streptomyces lividans*". *J. Bacteriol.* 169: 4249-4256.
 - 18.- Hopwood, DA, Bibb, JM, Chater, KF, Kieser, T, Bruton, CJ, Kiese, HM, Lydiate, DJ, Smith, CP, Ward, JM y Schrempf, H. (1985). *Genetic manipulation of Streptomyces. A laboratory manual*. The John Innes Foundation, Norwich, England
 - 19.- Ausubel, FA, Brent, R, Kingston, RE, Moore, DD, Seidmann, JG, Smith, JA y Struhl, K. (1990). *Current protocols in molecular biology*. Greene Publishing and Wiley Interscience, New York, NY
 - 20.- Ramos, I. (1999). Aislamiento y caracterización de cepas de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* sensibles a 2-DOG obtenidas a partir de una mutante 2-dog^R insensible a represión catabólica por carbono. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM.
 - 21.- Ingram, C, y Westpheling, J. 1995. The glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor* is not required for glucose repression of the *chi63* promoter. *J. Bacteriol.* 177: 3587-3588.
 - 22.- Wong, H, Ting, Y, Lin, HC, Reichert, F, Myambo, K, Watt, KWK, Toy, PL y Drummond, RJ. (1991). Genetic organization and regulation of the xylose degradation genes in *Streptomyces rubiginosus*. *J. Bacteriol.* 173: 6849-6858.
 - 23.- Angell, S, Lewis, CG, Buttner, MJ y Bibb, JM. (1994). Glucose repression in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a likely regulatory role for glucose kinase. *Mol. Gen. Genet.* 244: 135-143.
 - 24.- Jurica, MS, Mesecar, A, Heath, PJ, Shi, W, Nowak, T y Stoddard, BL. (1998). The allosteric regulation of pyruvate kinase by fructose-1,6-bisphosphate. *Structure* 6: 195-210.
 - 25.- Arcamone, F. (1981). *Doxorubicin: Anticancer Antibiotics*. Academic Press. New York, NY.
 - 26.- Delic, I, Robbins, P y Westpheling, J. (1992). Direct repeat sequences are implicated in the regulation of two *Streptomyces* chitinase promoters that are subject to carbon catabolite control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 1885-1889.
 - 27.- Mahr, K, van Wezel, GP, Svensson, C, Kregel, U, Bibb, MJ y Titgemeyer, F. (2000). Glucose kinase of *Streptomyces coelicolor* A3(2): large scale purification and biochemical analysis. *Antonie van Leeuwenhoek.* 78: 253-261.