

COMPLEMENTACIÓN GÉNICA Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DE *Streptomyces peucetius* var. *caesius* INSENSIBLES A REPRESIÓN CATABÓLICA.

Silvia Guzmán, Sergio Sánchez y Elizabeth Langley

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Ciudad Universitaria 04510. Fax 5622-3855, e-mail: langley@servidor.unam.mx

Palabras clave: complementación génica, Glk, represión catabólica, *Streptomyces*

Introducción. *S. peucetius* var. *caesius* es un microorganismo muy importante desde el punto de vista médico, ya que es productor de doxorubicina, un antibiótico del grupo de las antraciclinas que es ampliamente utilizado en el tratamiento de diversos tipos de cáncer (1). Sin embargo la producción de este metabolito está regulada por la presencia de la fuente de carbono, fenómeno conocido como represión catabólica (RC) (2,3). Diversos autores han sugerido la participación directa de la enzima glucosa cinasa (Glk), como un efector clave en la regulación de dicho fenómeno, dado que mutantes que carecen de la actividad de esta enzima muestran insensibilidad a RC (4).

Pretendemos estudiar el papel de la Glk y del transporte de glucosa como posibles reguladores en RC en *S. peucetius* var. *caesius*. Se complementaron mutantes de esta cepa que presentaban baja actividad de Glk, deficiencia en el transporte de glucosa e insensibilidad a RC (2-dog^S-2, 2-dog^S-11 y 2-dog^R-21). Se utilizó un plásmido unicopia (pIJ513) que contiene dos ORFs, uno de 1.1 kb (ORF2) que codifica para una proteína de 20.1 kDa con función aún indeterminada y otro de 1.2 kb (ORF3) cuyo producto es la Glk de *S. coelicolor* (4).

Metodología. Los dos ORFs se amplificaron por PCR por separado y se insertaron en un plásmido multicopia (pIJ486). Se llevo a cabo la transformación de protoplastos de las cepas 2-dog^S-2, 2-dog^S-11 y 2-dog^R-21. Las transformantes se seleccionaron por resistencia a tioestreptón. Se determino la actividad específica de Glk, la incorporación de [¹⁴C]-glucosa y la sensibilidad a RC sobre la producción de antraciclinas totales.

Resultados y discusión. Todas las cepas transformadas con los diferentes fragmentos, presentaron un aumento en la actividad de Glk y el transporte de [¹⁴C]-glucosa. Además recuperaron la sensibilidad a represión catabólica (ver la tabla 1). La mutantes 2-dog^R-21, y 2-dog^S-11 parecen estar afectadas a nivel de ORF2, ya que cuando se complementan con este fragmento, restablecen completamente la actividad de Glk, el transporte de [¹⁴C]-glucosa y la sensibilidad a RC. La cepa 2-dog^S-2 parece tener mutaciones adicionales a nivel de sistema de transporte de la glucosa, ya que no es suficiente la presencia del ORF2 para recuperar la incorporación de este carbohidrato a niveles similares de la cepa original. En estas mismas cepas el aumento del transporte hasta del 35%, es suficiente para incorporar al carbohidrato represor y para que éste ejerza RC sobre la síntesis de antraciclinas totales. Estas evidencias sugieren

que la regulación por fuente de carbono puede ser debida al flujo metabólico de la glucosa mas que a la Glk *per se*.

Tabla 1 Comparación de las características presentadas en las cepas transformadas

Cepas	Inserto	% Transporte de glucosa	% Actividad Glk	Sensibilidad RC
Original		100	100	S
2-dog ^R -21	Control	70	15	R +
	ORF2	100	115	S +
	ORF3	N. D.	N. D.	-
	ORF2+3	N. D.	N. D.	-
2-dog ^S -2	Control	15	35	R +
	ORF2	35	100	S +
	ORF3	N. D.	N. D.	-
	ORF2+3	36	115	S +
2-dog ^S -11	Control	70	85	R ±
	ORF2	120	190	S +
	ORF3	70	150	S +
	ORF2+3	120	180	S +

Resistencia (R) y Sensibilidad (S), Represión catabólica por fuente de carbono (RC), Aún no determinado (N.D.)

Conclusiones. El ORF2 es indispensable para la recuperación de la sensibilidad a RC a niveles similares de la cepa original en *S. peucetius* var. *caesius*. Probablemente este fragmento tenga un papel regulatorio, coordinando el transporte y la fosforilación de la glucosa. La represión catabólica por fuente de carbono en este microorganismo puede deberse a una regulación por flujo metabólico más que a la participación directa de la Glk.

Bibliografía:

- Hutchinson C. R. y A. L. Colombo (1999). *J. Industrial Microbiol. and Biotechnology*. 23: 647-652
- Segura, D., R. González, R. Rodríguez, T. Sandoval, L. Escalante y S. Sánchez. (1996). *Asia Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 4: 30-36
- Escalante L., I. Ramos, I. Imriskova, E. Langley y S Sánchez. (1999) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 572-78
- Angell, S., E. Schwartz y J. M. Bibb. (1992). *Mol. Microbiol.* 6: 2833-2844