

# GLUCOSA CINASA DE *STREPTOMYCES PEUCETIUS* VAR. *CAESIUS*

Iveta Imriskova y Sergio Sánchez

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Ciudad Universitaria, México D.F., Apt. 70228, C.P. 04510, Fax 56223855, e-mail: [sersan@servidor.unam.mx](mailto:sersan@servidor.unam.mx)

Palabras clave: *glucosa cinasa*, *represión catabólica*, *Streptomyces*

**Introducción:** *Streptomyces peucetius* var. *caesius* es el único organismo reportado capaz de producir doxorubicina, un compuesto con actividad antitumoral. La doxorubicina es una de las drogas antitumorales más usadas a nivel mundial gracias a su amplio espectro de actividad contra diferentes tipos de cáncer (1). La producción de este compuesto, y la de otros metabolitos secundarios, se encuentra negativamente afectada por altas concentraciones de glucosa (2). Los estudios realizados sobre este fenómeno, conocido como represión catabólica por glucosa (RC), proponen que en el género *Streptomyces* el mecanismo de RC está mediado a través de la participación de la enzima glucosa cinasa (Glk) (2, 3). A pesar de la importancia que tiene la Glk en este género, hasta la fecha no ha sido purificada la Glk de ningún miembro de *Streptomyces*.

Con estos antecedentes el objetivo de este trabajo fue purificar y caracterizar bioquímicamente la Glk de *S. peucetius* var. *caesius*.

**Metodología.** La actividad de Glk fue determinada espectrofotométricamente en un sistema acoplado con la enzima glucosa-6-P-deshidrogenasa, por medio de la cuantificación de la reducción de NADP. La Glk fue purificada directamente de un gel de poliacrilamida nativo. El peso molecular fue determinado por espectrometría de masas. Los parámetros cinéticos fueron determinados a 25°C variando la concentración de glucosa o ATP en presencia de ATP o glucosa en las concentraciones de saturación (1 y 10 mM, respectivamente). Para confirmar el mecanismo de acción determinado se utilizaron fructosa y ADP como sustratos alternativos.

**Resultados.** La Glk de *S. peucetius* var. *caesius*, localizada en citosol y estable al oxígeno, fue purificada 292 veces a homogeneidad. No hemos detectado isoformas (Fig.1 B). La enzima nativa esta compuesta de 4 subunidades idénticas de 32 kDa cada una. La enzima pura después de 2 horas de almacenamiento a 4°C se disocia a su forma dimerica. En presencia de glucosa 100 mM la enzima mantiene su forma tetramérica (Fig. 1 A). Otras fuentes de carbono como: fructosa, arabinosa, galactosa o 2-desoxiglucosa no lograron la tetramerización de la enzima. La máxima actividad se obtuvo a 42°C y pH de 7.5. Su pI es 8.4. Se determinó que su mecanismo de acción es Bi Bi ordenado en el equilibrio rápido, donde la glucosa entra como primer sustrato, causando así cambios conformacionales y formación del

sitio activo para segundo sustrato. El mecanismo de acción fue confirmado utilizando sustratos alternativos fructosa y ADPMg<sup>+</sup>. Los valores de  $K_m$  para D-glucosa y MgATP<sup>2-</sup> fueron 1.61 y 0.80 mM, respectivamente.

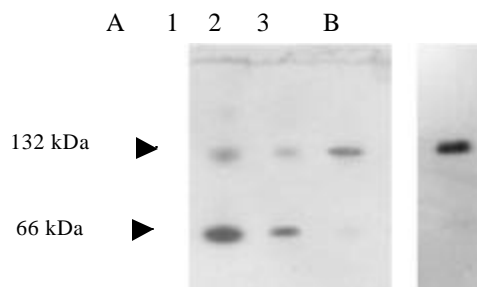


Fig. 1. A Electroforesis en el gel de poliacrilamida de glucosa cinasa de *S. peucetius* var. *caesius*. Carril 1: marcador de peso molecular; carril 2: dimerización de glucosa cinasa purificada; carril 3: renaturalización de la enzima en presencia de glucosa 100 mM. B. Gel de actividad de glucosa cinasa del extracto libre de células.

Los primeros ocho amino ácidos del N-terminal (MGLTIGVD) fueron idénticos a los primeros 8 aminoácidos del N-terminal de *S. coelicolor*, pero no presentaron homología con otras secuencias reportadas. Sin embargo tres de los 11 últimos aminoácidos del C-terminal (VYFAREPDPIIM) fueron diferentes de la secuencia C-terminal de *S. coelicolor*, organismo modelo del género *Streptomyces*.

**Conclusiones.** El conocimiento sobre las características bioquímicas de la Glk de *S. peucetius* var. *caesius*, nos permitirá continuar nuestro estudio del papel de esta enzima en el fenómeno de RC en el género *Streptomyces*.

**Agradecimientos.** Esta investigación fue apoyada por los proyectos: PAEP UNAM 202 320, DGEP UNAM 103 328 y DGAPA UNAM IN 208 000. I. Imriskova agradece la beca de DGEP UNAM.

## Bibliografía.

- Huthinson, C.R. y Colombo, A.L.(1999). *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23: 647-652.
- Segura, D., González, R., Rodríguez, R., Sandoval, T., Escalante, L. y Sánchez, S. (1996). *As. Pac. J. Mol. Biol. Biotech.* 4 (1):30-36.

3. Angell, S., Schwartz, E. y Bobb, J.M. (1992) *Mol. Microbiol.* 6: 2833-2844.