

Represión Catabólica por Carbono de Bacterias Gram-Positivas: Inteligencia Alimenticia

Angela Forero, Sergio Sánchez

*Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. E-mail:
avforerof@biomedicas.unam.mx; sersan@biomedicas.unam.mx*

Palabras clave: represión catabólica, bacterias Gram-positivas, sistema PTS, *Streptomyces*

Key words: catabolite repression, Gram-positive bacteria, PTS system, *Streptomyces*

RESUMEN

La represión catabólica por carbono (RCC) ha sido definida como la inhibición de la expresión de genes requeridos para la utilización de fuentes de carbono secundarias, causada por sustratos carbonados que son degradados rápidamente. El mecanismo responsable de éste efecto involucra el transporte y metabolismo de la fuente de carbono represora. Dentro de los sistemas de transporte de carbohidratos que muestran funciones de regulación metabólica y transcripcional en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, el más estudiado y mejor entendido es el sistema fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS) de *Escherichia coli*. En otros sistemas microbianos como *Bacillus subtilis* y en algunos *Streptococcus* y *Lactococcus*, el conocimiento sobre el PTS y su participación en la RCC ha alcanzado un buen nivel de comprensión. Con relación a bacterias Gram-positivas con alto contenido de guanina-citosina (GC) como los estreptomicetos, si bien se han reportado avances en el conocimiento del sistema de transporte y metabolismo de la glucosa y otras fuentes de carbono, no existe a la fecha un modelo aceptable que explique el mecanismo de RCC en este género. En esta revisión se analizan los principales mecanismos de regulación por carbono en bacterias Gram-positivas con alto y bajo contenido de GC en su genoma como son *S. coelicolor* y *B. subtilis*, respectivamente.

ABSTRACT

The carbon catabolite repression (RCC) has been defined as the inhibition in the expression of genes required for secondary carbon sources utilization, caused by carbonated substrates that are rapidly degraded. The mechanism responsible for this effect involves the transport and metabolism of the repressor carbon source. Among the carbohydrate transport systems showing metabolic and transcriptional regulatory functions in Gram-positive and Gram-negative bacteria, the most studied and better understood is the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system (PTS) from *Escherichia coli*. In other microbial systems like *Bacillus subtilis* and some *Streptococcus* and *Lactococcus*, the knowledge on the PTS and its participation in the CCR has reached a good level of comprehension. In regard to Gram-positive bacteria with high guanine and cytosine content (GC) like the streptomycetes, although there are some advances in the knowledge of the transport and metabolism of glucose and other carbon sources, there is not an acceptable model to explain the CCR mechanism in this genus. In this review, the main carbon regulatory mechanisms in Gram-positive bacteria with high and low GC content like *S. coelicolor* and *B. subtilis*, respectively, are analyzed.

INTRODUCCIÓN

Cuando las bacterias son expuestas a diferentes

fuentes de carbono, prefieren aquellos carbohidratos que son más fáciles de degradar y que les proporcionan los mejores rendimientos para su crecimiento y desarrollo. El mecanismo de control global que gobierna y coordina la utilización de fuentes de carbono de manera sistemática y organizada se denomina represión catabólica por carbono (RCC) (Saier & Reizer, 1992).

Se sabe que este mecanismo puede operar a distintos niveles (transcripción, procesamiento de RNA, traducción y modificación de proteínas), generando respuestas que afectan directa o indirectamente la actividad de las enzimas sensibles al fenómeno (exclusión de inductores, represión transcripcional o interrupción de la traducción de proteínas) (Kwakman & Postma, 1994).

Existen diversos sistemas de control que se encuentran relacionados con la regulación por fuente de carbono. Dentro de ellos, uno de los mejor conocidos es el sistema de fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS), tanto de *Escherichia coli* como de *Bacillus subtilis*. Por otro lado, en los últimos 25 años se ha venido trabajando arduamente en la comprensión de los fenómenos de RCC en bacterias Gram-positivas con alto contenido de GC como son los *Streptomyces*. En este género se ha visto que la síntesis de pigmentos, antibióticos y demás metabolitos secundarios que producen parecen estar regulada por el mecanismo de RCC.

Todos los genes u operones que participan en el catabolismo de carbohidratos son regulados por proteínas de control específico e inductores requeridos para su expresión. El control directo de la actividad de los reguladores, o de la formación de inductores, es una medida eficiente para silenciar la expresión. Por estos mecanismos las bacterias son capaces de establecer una jerarquía en la utilización de carbohidratos (Bruckner & Titgemeyer, 2002) y las capacita para incrementar su nutrición con miras a optimizar su tasa de crecimiento en ambientes naturales donde existen

mezclas complejas de nutrientes (Stülke & Hillen, 1999).

El complejo regulatorio responsable de la RCC provee a las bacterias de dos facultades importantes: 1) utilizar una fuente de carbono de manera preferencial en una mezcla presente en el medio de cultivo y 2) incorporar el carbohidrato limitante y utilizarlo de acuerdo a sus capacidades metabólicas (Bruckner & Titgemeyer, 2002). En ambos casos, los mismos mecanismos de control son empleados, pero la fuerza de la respuesta regulatoria es diferente (Bruckner & Titgemeyer, 2002). La elección de un carbohidrato determinado es hecha a nivel de inducción azúcar-específico. La represión de los genes empleados en la utilización de carbohidratos alternos asegura que únicamente sea expresada una cantidad mínima de genes, para producir una cierta cantidad de energía y elementos carbonados a partir de una fuente de carbono. Así, la utilización jerárquica de azúcares significa usar carbono y fuentes de energía económicas (Bruckner & Titgemeyer, 2002).

Si sólo una fuente de carbono está disponible, de cualquier forma la RCC está presente, lo cual es una consecuencia del metabolismo del carbohidrato que actúa como un dispositivo de autorregulación interna que limita el consumo del carbohidrato y funciona como sistema economizador de alimento.

Los sistemas en donde el fenómeno de RCC está mejor caracterizado son por un lado, la bacteria Gram-negativa *E. coli* y por otro, las bacterias Gram-positivas con bajo contenido de GC en su genoma como *B. subtilis* y *Bacillus megaterium*. Así mismo, existen avances en la comprensión de la RCC en bacterias Gram-positivas con alto contenido de GC en su genoma como *Streptomyces* y *Mycobacterium* (Stülke & Hillen, 1999).

En esta revisión se analizan los principales mecanismos de regulación por carbono en bacterias Gram-positivas. Se revisarán en especial los avances logrados sobre dicho fenómeno en las bacterias *B. subtilis* y *S. coelicolor*.

REGULACIÓN POR CARBONO EN BACTERIAS GRAM-POSITIVAS CON BAJO CONTENIDO DE GC: *BACILLUS SUBTILIS*

Sistema PTS

Dentro de los sistemas de transporte y fosforilación de carbohidratos que han sido descritos en numerosos géneros bacterianos, hasta ahora, el mejor estudiado es el sistema de transporte de fosfotransferasa PTS (sugar phosphotransferase system) dependiente de fosfoenolpiruvato (PEP). Además del transporte y fosforilación de azúcares, el sistema PTS lleva a cabo varias funciones de regulación metabólica y transcripcional en diversas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, entre las que destacan la activación de proteínas inductoras de operones catabólicos, el metabolismo del nitrógeno, la quimiotaxis, la respuesta a estrés y patogenicidad (Stülke & Hillen, 1998; Nothaft *et al.*, 2003). Más de 20 carbohidratos diferentes son transportados por este sistema y en dicho proceso se utiliza al PEP como donador del grupo fosfato (Postma *et al.*, 1993).

El sistema PTS consta de dos enzimas generales no específicas que son la enzima EI y la proteína estable al calor HP. Además se incluyen una gran cantidad de permeasas específicas para cada carbohidrato en particular, llamadas EII. Las enzimas EII poseen tres o cuatro dominios, dos de ellos están involucrados en la transferencia de

fosfato (EIIA y EIIB) y el tercero (EIIC) actúa como permeasa de membrana (Stülke & Hillen, 1999). EIIA es citoplásmico y soluble, EIIB es un dominio periférico de membrana que aunque es hidrófilo, se liga al lado citoplásmico de la membrana a través de EIIC. EIIC es una proteína integral de membrana que se une a su azúcar específico para liberarlo en el interior de la célula.

La cascada de fosforilación inicia con la enzima EI (EI), la cual se autofosforila utilizando fosfoenolpiruvato (PEP) y transfiere el grupo fosfato de alta energía (en presencia de Mg^{++}) a la proteína HPr (proteína pequeña, termoestable y rica en histidina). Estas dos proteínas tienen localización citoplásmica y su síntesis es constitutiva. La síntesis de las enzimas EIIABC se induce por el sustrato correspondiente.

La HPr fosforilada (HPr-P) transfiere el fosfato a la enzima EIIA. En presencia de Mg^{++} , la EIIA transfiere rápidamente el fosfato a la enzima específica EIIB, con la que se asocia (p. ej., $EIIB^{Glc}$), que a su vez fosforila el azúcar (en el caso de la glucosa, ésta se convierte en glucosa-6-P). En este momento la EIIC pierde su afinidad por el azúcar modificado, que de esta forma entra al citoplasma y queda listo para actuar como sustrato de la primera reacción de su catabolismo (ver Fig. 1).

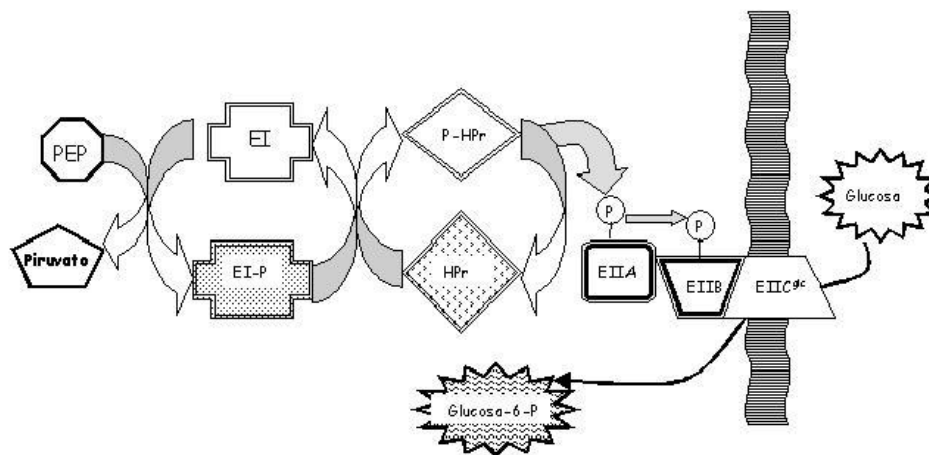


Fig. 1. Sistema de transporte de fosfotransferasa (PTS) dependiente de fosfoenolpiruvato (PEP). Las enzimas EI, HPr, EIIA y EIIB son fosfotransferasas y la EIIC es una permeasa que cataliza la translocación del carbohidrato del periplasma al citosol. La enzima EIIC es específica para cada azúcar (Adaptado de Postma *et al.*, 1993).

En las bacterias Gram-positivas con bajo contenido de G-C en su genoma, el mecanismo de RCC está íntimamente ligado a proteínas del sistema PTS. Específicamente, en *B. subtilis* y *B. megaterium*, la mayoría de las señales de la RCC son dependientes de las enzimas HPr, HPr cinasa/fosfatasa (HPr-K/P) y la enzima de control catabólico (CcpA). Ellas son las encargadas de sensar el estado fisiológico de la célula y regular el consumo de carbono (Stülke & Hillen, 1999). En estos sistemas se ha reportado la presencia de una proteína homóloga a HPr, denominada Crh. Dicha proteína muestra un 45% de homología en su secuencia con HPr y ambas son fosforiladas de manera eficiente por la HPr-K/P. Sin embargo, las contribuciones de Crh a la RCC difiere a la de HPr. Se

creo que Crh puede estar involucrada en la RCC por fuentes de carbono como malato o succinato. La justificación a esta hipótesis será explicada mas adelante.

En *B. subtilis*, la glucosa u otra fuente de carbono rápidamente metabolizable genera intermediarios metabólicos, como la fructosa 1,6-bisfosfato (FBF). Este metabolito activa la HPr-K/P que fosforila a HPr en la serina 46. La interacción de HPr-Ser-P con CcpA permite que CcpA se una a regiones del DNA denominadas sitios *cre* (elementos de respuesta de catabolito) (Kim & Chambliss, 1997). De esta manera, el complejo FBF-HPr-Ser-P-CcpA unido a *cre* en las regiones regulatorias de operones sensibles a RCC, inhiben la iniciación de la transcripción (ver Fig. 2).

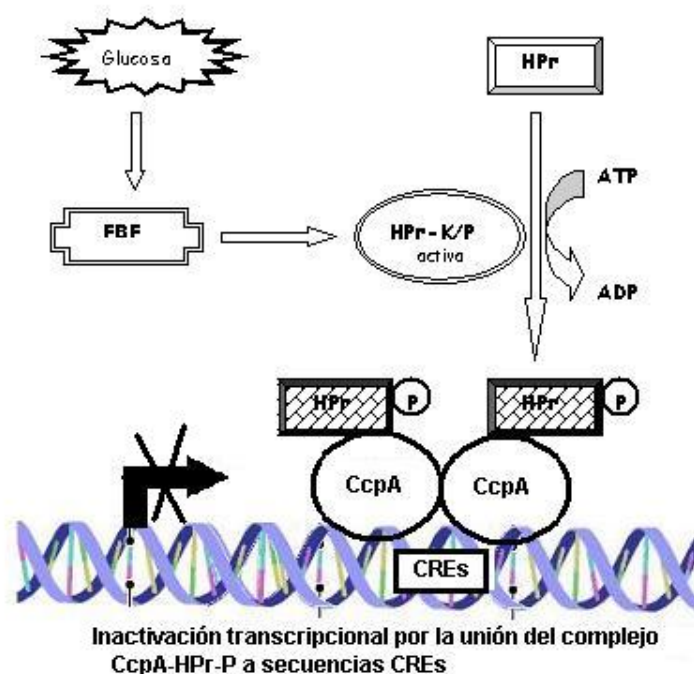


Fig. 2. Mecanismo de RCC en *B. subtilis*.

En *Bacillus* y otras bacterias Gram-positivas con bajo contenido de GC, la proteína HPr-K/P puede actuar como cinasa o como fosfatasa, dependiendo del estado nutricional de la célula (Hanson *et al.*, 2002). La actividad cinasa de HPr-K/P en *B. subtilis*

es dependiente de intermediarios de la glucólisis como la fructosa 1,6-bisfosfato y es inhibida por el fosfato inorgánico. De manera contraria, la actividad fosfatasa es estimulada por fosfato inorgánico.

Existen otras HPr-K/P que son activadas por

altas concentraciones de ATP y son independientes de fructosa 1,6-bisfosfato, como es el caso de las HPr-K/P provenientes de *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus salivarius* (Hanson *et al.*, 2002). La enzima HPr puede ser fosforilada en dos sitios: en la His-15 por la enzima EI del sistema PTS y en la Ser-46 por HPr-K/P dependiente de ATP, la cual es activada por el metabolito fructosa-1,6-bisfosfato (FBP) (Galinier *et al.*, 1998; Reizer *et al.*, 1998). La fosforilación en la serina 46 tiene exclusivamente propósitos regulatorios.

La RCC en *B. subtilis* se da de dos formas: una es reprimiendo los genes catabólicos y los operones mediante la proteína de control catabólico A, CcpA, la cual previene la transcripción de genes (actuando sobre elementos *cre*) y otra, al no inducir operones catabólicos gracias a la fosforilación de la enzima HPr, que a su vez, puede estimular la actividad de algunas enzimas, inductores, activadores transcripcionales, o antiterminadores (Henkin, 1996).

La fosforilación de HPr en la Serina-46 es importante para la RCC en *B. subtilis*. En 1996, Reizer *et al.*, reportaron que la fosforilación en la histidina-15 también es importante para RCC en *B. subtilis*. Se sabe de la interacción específica entre CcpA y HPr-Ser-P, pero no de CcpA con HPr sin fosforilar (Deutscher *et al.*, 1995). El complejo HPr-Ser-P/CcpA puede actuar como represor o activador de la transcripción (Henkin, 1996). Los datos de Reizer *et al.* (1996), sugieren que la histidina-15 también es requerida para la formación del complejo y por consiguiente, para la RCC. Mutaciones en la histidina-15, pueden generar cambios estructurales que pueden ocasionar una disminución en la afinidad de unión de HPr-Ser-P a CcpA. La sensibilidad de la interacción de HPr-Ser-P con CcpA es dependiente de PEP y la fosforilación de la His-15 catalizada por la enzima EI sugiere una relación entre la RCC y el sistema de transporte PTS (Reizer *et al.*, 1996).

Únicamente la HPr-Ser-P se puede unir a CcpA. Si HPr no está fosforilada, si está fosforilada en His-

15 o si está doblemente fosforilada (en la Ser-46 y en la His-15), entonces no puede interactuar con CcpA. Esto indica que la fosforilación de la His-15 puede ser una señal de regulación en la RCC, ya que HPr-His-P no se puede unir a CcpA y esto ocasiona la activación y represión de genes sujetos de RCC.

La concentración intracelular de HPr-Ser-P es determinada por la actividad de cuatro diferentes enzimas: la fosforilación de HPr por la HPr-K/P dependiente de ATP, la desfosforilación de HPr doblemente fosforilado por una enzima EIIA para formar HPr-Ser-P, la desfosforilación de HPr-Ser-P por la enzima HPr-K/P y la fosforilación de HPr-Ser-P por la enzima EI dependiente de PEP (Reizer *et al.*, 1996). La incorporación de azúcares por el sistema PTS conduce a la desfosforilación de proteínas PTS histidil-fosforiladas y altas concentraciones de intermediarios glucolíticos que activan la HPr-K/P. Bajo estas condiciones, se espera encontrar altas cantidades de HPr-Ser-P en la célula en correlación con una fuerte RCC en *B. subtilis*. Por el contrario, cuando se internalizan azúcares que no son incorporados por la vía PTS, las proteínas PTS se encuentran fosforiladas y se espera que el doble de proteínas HPr-histidil-fosforiladas estén presentes en la célula. Ninguna de las dos formas de HPr interactúa con CcpA *in vitro* (Deutscher *et al.*, 1995).

En el año 2002, Hanson y colaboradores mediante el empleo de mutaciones puntuales en dos regiones altamente conservadas en *B. subtilis* (Hanson *et al.*, 2002), identificaron secuencias de aminoácidos que son determinantes para las actividades de cinasa y fosfatasa de la enzima HPr-K/P de este microorganismo. Una de ellas, ubicada en la posición 153-160, es un motivo de unión a ATP/GTP (llamado caja de Walker A) (Walker *et al.*, 1982). Dicha región se encuentra también presente en proteínas de unión a nucleótidos, transportadores ABC, proteasas, chaperonas así como en algunas cinasas que fosforilan sustratos de bajo peso molecular (Poncet *et al.*, 2004). La

otra región, denominada de "firma", es una secuencia ubicada en la posición 202-211. En este estudio se demostró que mutaciones en una de las regiones funcionales de la HPr-K/P afectan de forma más drástica el crecimiento, que cuando se mutan ambas actividades. Esto demuestra una ventaja fisiológica al tener dos actividades contrarias en un mismo polipéptido, ya que aumenta la posibilidad de interrupción de ambas actividades por mutación, permaneciendo el crecimiento sin ser afectado.

Gorke *et al.*, en el 2004, compararon los niveles de expresión del gen *crh* (que codifica para la proteína homóloga a HPr, Crh) y del gen *ptsH* (que codifica para HPr) y su influencia sobre la RCC en *B. subtilis*. Ellos encontraron que la transcripción de *ptsH* comparada con la de *crh* resultó ser 3 a 9 veces más fuerte cuando es empleado un sustrato incorporado por el sistema PTS y, por consiguiente, bajo fuertes condiciones de RCC. Los genes *ptsH* y *ptsI* son co-transcritos desde un promotor localizado río arriba de *ptsH*. Este promotor está activo constitutivamente y no está sujeto a regulación por fuente de carbono. En presencia de glucosa, el gen *ptsH* es transcrito adicionalmente desde el promotor río arriba del gen *ptsG* (que codifica para la enzima EII específica de glucosa).

De la misma forma, *ptsH* es traducido de 10 a 20 veces más que *crh*, lo que sugiere que HPr es sintetizado en grandes cantidades en la célula. La utilización de sustratos incorporados por el sistema PTS estimula la transcripción de *ptsH*. Combinando la alta tasa de transcripción con la eficiente traducción de *ptsH*, se incrementa el nivel de síntesis de HPr 100 veces por encima de Crh (Gorke *et al.*, 2004). Estas diferencias tan drásticas en el nivel de síntesis de HPr y Crh pueden ser explicadas por el papel menor que juega la proteína Crh en la RCC. La proteína Crh-Ser-P puede ser sustituida de manera parcial por HPr-Ser-P en la RCC, mientras que HPr-Ser-P puede ser totalmente sustituida por Crh-Ser-P en este fenómeno. La observación de que la síntesis de Crh es 10 veces

más alta que la de HPr en bacterias que utilizan citrato o succinato, sugiere que tal vez Crh no este involucrada en la RCC por dichas fuentes de carbono (Gorke *et al.*, 2004).

Un alineamiento de la secuencia de HPr-K/P con proteínas de la base de datos del National Center of Biotechnology Information (NCBI), revela la existencia de 44 HPr-K/P reportadas, unas de ellas son de gran longitud y varían entre 304 y 342 residuos de aminoácidos, mientras que las de longitud corta corresponden a un fragmento de las mayores. Las de gran longitud constan de tres dominios, un dominio amino terminal de función desconocida, un dominio catalítico de aproximadamente 100 residuos y un dominio carboxilo terminal responsable de la asociación de la proteína en una estructura multimérica. Las de longitud menor sólo contienen el dominio catalítico. El sitio de interacción de estas proteínas con HPr esta altamente conservado, los genes que codifican para proteínas homólogas a HPr-K/P se encuentran agrupados con genes que codifican para proteínas similares a HPr (Warner & Lolkema, 2003).

Así mismo, se han reportado 105 proteínas similares a HPr y éstas se encuentran distribuidas en 87 organismos diferentes, lo que indica que en algunas bacterias es posible que exista más de una molécula HPr. Las secuencias de HPr varían entre 82 y 112 residuos. De estas secuencias, 8 carecen del sitio activo de histidina, mientras que otras tres no contienen el sitio regulador de serina (Warner & Lolkema, 2003).

Existen 17 bacterias del phylum *Firmicutes*, al cual pertenece *B. subtilis*, con su genoma secuenciado. Todos estos genomas contienen secuencias que codifican para la HPr-K/P. Secuencias homólogas para esta proteína fueron encontradas en 11 de estos 17 microorganismos, y es de esperar que en los 6 restantes también posean una secuencia homóloga (Warner & Lolkema, 2003).

En *B. subtilis*, la histidina del sitio activo Crh es reemplazada por una glutamina, mientras que el

resto de aminoácidos permanece similar a secuencias de HPr de organismos semejantes. Un alineamiento múltiple de secuencias de proteínas similares a HPr, revela los mismos motivos de secuencia en tres proteínas similares a HPr de bacilos que pueden contener Crh y HPr de manera simultánea (Warner & Lolkema, 2003). Esto sugiere que se encuentran bastante conservadas en este género.

Los genes que codifican para la proteína HPr en *Bacillus* están organizados como un operón, junto con el gen que codifica para la enzima EI de PTS y usualmente son transcritos policistricamente. En *B. subtilis*, el par de genes es precedido por el gen que codifica para enzimas del PTS específicas para cada azúcar EIIABC. En cuatro especies de *Bacillus*, el gen que codifica para Crh esta agrupado con tres genes. Estos son: *yvcJ*, *yvcK* y *yvcL*. En *B. subtilis* estos genes codifican para proteínas cuya función se desconoce, además de que este clúster no esta asociado con ninguna proteína del sistema PTS (Warner & Lolkema, 2003).

CcpA, pertenece a la familia de proteínas reguladoras LacI/GalR (Henkin, 1996). Es el principal componente en la RCC en *B. subtilis* y otras bacterias Gram-positivas con bajo contenido de GC (Henkin, 1996; Stülke & Hillen, 1999). Genes *ccpA* han sido clonados de mutantes en *Staphylococcus xylosus*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus casei* y *Streptococcus*, donde ha sido demostrada su implicación en la RCC, lo que sugiere un mecanismo común en las bacterias Gram-positivas con bajo contenido de GC. Al inactivar el gen *ccpB*, el cual codifica para un *ccpA* homólogo, se incrementa parcialmente la RCC de los genes *gnt* y *xyl*.

La unión de CcpA a los sitios *cre* es posible por la formación de un complejo entre los cofactores HPr y Crh fosforilados (Repizo *et al.*, 2006). La forma en que se afecta la unión de CcpA a las secuencias *cre*, por efecto de las fuentes de carbono represoras, fue demostrada en *B. subtilis* y

B. megaterium al introducirles una mutación en *ptsH1*. Como resultado de ello, se previene la fosforilación de HPr en la Serina 46 y se genera un fenotipo similar al que presentan las mutantes en *ccpA*. Esto indica que la interacción específica entre CcpA y HPr-Ser46-P, resulta en su unión a *cre* (Stülke & Hillen, 1999).

En el caso de algunas enzimas como β -xilosidasa, inositol deshidrogenasa y α -amilasa, la expresión es reprimida en mutantes *ccpA*, pero no lo es, o sólo parcialmente en mutantes *ptsH1*. β -Xilosidasa e inositol deshidrogenasa son desreprimidas cuando HPr y Crh están ausentes. Crh puede ser fosforilada por la HPr cinasa pero no es fosforilada por la enzima EI. La enzima Crp-Ser46-P puede ser otro corepresor de CcpA (Galinier *et al.*, 1997). Glucosa-6-fosfato y NADP han sido también identificados como correpresores de CcpA (Kim *et al.*, 1998). El NADP tiene poco efecto sobre la unión de CcpA a las secuencias *cre* del gen *amyE*, esto incrementa la habilidad de CcpA para inhibir la transcripción y sugiere que la unión a DNA y la inhibición de la transcripción por CcpA son dos propiedades distintas (Kim *et al.*, 1998). Estudios de estructura han demostrado que CcpA esta compuesta de un dominio de unión a DNA en su extremo amino terminal y un dominio que interactúa con HPr-Ser-P en su extremo carboxilo terminal. El complejo tetramérico consiste en un dímero de CcpA, dos moléculas de HPr-Ser-P y la secuencia *cre* (Jones *et al.*, 1997) (ver Fig. 2). Los residuos del dominio que se encuentra en el extremo carboxilo terminal, expuestos a la superficie de CcpA, se requieren para la interacción con HPr-Ser-P y para la RCC (Kraus *et al.*, 1998).

Los sitios *cre* para los genes *acsA*, *xyl*, *gnt* y *hut*, en *B. subtilis*, están río abajo de la región de inicio de la transcripción, mientras que los sitios *cre* de los genes *lev*, *bgIPH*, *acu*, *amyE* y *mmg*, se encuentran en la región promotora o adyacentes a ella (Zaliecckas *et al.*, 1998). Los sitios *cre* se caracterizan por ser secuencias de 14 pb con simetría de diada y la mayoría de ellos están

flanqueados por regiones ricas en secuencias A+T.

En 1999, Rosana-Ani *et al.*, relacionaron la actividad de la glucosa cinasa (Glk, enzima responsable de la fosforilación de la glucosa) de *B. subtilis* con el fenómeno de RCC en dicho microorganismo. En estudios anteriores se había propuesto que el principal papel de la HPr-K/P era el control celular de tasas de metabolismo de carbohidratos y niveles de inducción (Reizer *et al.*, 1984) y que el cambio en la concentración de glucosa-6-fosfato mediada por la Glk podría representar una señal de RCC. Confirmando lo anterior, se observó que la interacción CcpA-*cre* es también estimulada por la glucosa-6-fosfato *in vitro*. La contribución de la Glk en el fenómeno de RCC en *B. subtilis* puede ser indirecta, ya que sustrato y producto, es decir, glucosa y glucosa-6-fosfato, pueden actuar como señales alternativas. Es decir, si la actividad de Glk se elimina, la glucosa no fosforilada se acumula en el citoplasma y se exporta al medio. Esta glucosa vuelve a entrar a la célula por la permeasa de PTS y acciona la RCC por la principal cascada regulatoria, a la cual CcpA, HPr, *cre* y HPr-K/P pertenecen. Por otra parte, la glucosa-6-fosfato refleja en si una señal para la RCC al accionar la interacción HPr-Ser-P/CcpA/*cre*, actuando así como un anti-inductor, en el caso del represor de la xilosa y del represor de trealosa. Por lo anterior, se cree que la Glk esta involucrada en funciones regulatorias de RCC a nivel enzimático, que pueden representar respuestas rápidas a cambios en las fuentes de carbono, obtenidas por regulación a nivel transcripcional. Sin embargo, son necesarios mas estudios a este respecto (Rosana-Ani *et al.*, 1999).

REGULACIÓN POR CARBONO EN BACTERIAS GRAM-POSITIVAS CON ALTO CONTENIDO DE GC: LOS ESTREPTOMICETOS

El género *Streptomyces* sintetiza más del 60% de los antibióticos (Demain, 1989) que son producidos fermentativamente. Su síntesis puede ocurrir a partir de diversas fuentes de carbono (FC)

y puede ser susceptible a RCC. En *Streptomyces coelicolor*, la Glk parece jugar un papel regulatorio a nivel de transcripción y exclusión de inductores (Kwakman y Postma, 1994).

Sistema PTS en Streptomyces

La presencia del sistema PTS en *S. coelicolor* fue reportada por primera vez en el año 1995 (Titgemeyer, 1995). En 1999 dos grupos reportaron la clonación del gen *ptsH* cuyo producto es la fosfotransferasa HPr (Butler *et al.*, 1999, Parche *et al.*, 1999). En el año 2000, Parche *et al.*, reportaron la existencia de tres genes de *S. coelicolor* que codifican para proteínas homólogas no específicas del PTS y 6 genes que codifican para proteínas homólogas específicas. *S. coelicolor* tiene menos genes *pts* que la gran cantidad que posee *E. coli* y los 27 genes *pts* que contiene *B. subtilis*.

Se conoce la existencia del sistema PTS para internalizar la fructosa en *S. coelicolor* y también los genes que codifican, tanto para las enzimas EI, EIIA^{Crr} y HPr, como para dos posibles permeasas de N-acetilglucosamina y una posible permeasa de maltosa (NagE1, NagE2 y MalX1) (Parche *et al.*, 2000). No obstante, no se sabe el papel directo del sistema PTS en el fenómeno de RCC. Así mismo, la actividad cinasa de HPr-K/P parece estar ausente en *S. coelicolor* (Stülke & Hillen, 1999).

En el año 2003, Nothaft *et al.* sugirieron que la fuente de carbono N-acetilglucosamina podía ser el posible sustrato de NagE1 o NagE2 y se comprobó, por caracterización *in vitro*, que la enzima EIIA^{Crr} funcionaba como una proteína EIIA específica para N-acetilglucosamina. Por medio de análisis mutacional del gen *ccr-pstI*, se demostró que EI y EIIA^{Crr} son parte del sistema PTS para N-acetilglucosamina, y que si falta uno u otro, las células no pueden crecer en presencia de ella, mientras que la utilización de galactosa, glucosamina, glucosa, glutamato, glicerol, lactosa, maltosa, manitol, manosa, ribosa, sorbitol, sacarosa y xilosa, no parece verse afectada. La expresión de *ccr-pstI* como un operón y *ptsH* juntos, son

inducidos por la presencia de N-acetilglucosamina.

En 2004, Derouaux *et al.*, caracterizaron la proteína receptora de catabolito Crp, la cual esta involucrada en el sistema PTS de *S. coelicolor*. Esta proteína, codificada por el gen *SCO3571* o gen *crp*, es la única proteína de la superfamilia CRP-FNR presente en *S. coelicolor*. La inactivación de dicha proteína genera una deficiencia en la germinación de esporas y un fenotipo similar al de la mutante en el gen que codifica para la adenilato ciclasa (*cya*), que imposibilita la producción de AMP cíclico (AMPC). Esto sugiere que el AMPC puede ser una molécula clave para iniciar los eventos de germinación pues el sistema adenilato ciclasa-AMPC-Crp activa el proceso de desarrollo. En este trabajo se comprobó por tres métodos distintos que la proteína Crp de *S. coelicolor* es capaz de unirse a AMPC: (1) al comparar la secuencia de aminoácidos de Crp con 2 secuencias de la superfamilia CRP-FNR [Crp de *E. coli* y el factor regulador de la virulencia (Vfr) de *Pseudomonas aeruginosa*], que son capaces de unirse a AMPC, se observa que sus dominios de unión al nucleótido se encuentran altamente conservados; (2) al enfrentar *in vitro* a la proteína Crp-His6 purificada, con el AMPC unido a una matriz de agarosa, se observa una alta capacidad de unión de la proteína al nucleótido; (3) al enfrentar *in vivo* extractos celulares totales de *S. coelicolor* con AMPC, se detectó por cromatografía de afinidad una alta eficiencia de unión. No obstante, en este estudio, no pudo establecerse la capacidad de unión de la proteína Crp a secuencias de DNA.

Transporte de carbohidratos

Uno de los estudios más completos acerca de los sistemas de incorporación de carbohidratos es el reportado por Bertram *et al.*, en el 2004. A raíz de la publicación de la secuencia completa del genoma de *S. coelicolor*, se realizaron tres consideraciones importantes sobre la incorporación de carbohidratos a la célula: (1) 172 genes codifican para proteínas que son excretadas como hidrolasas, quitinasas,

celulasas, lipasas, nucleasas y proteasas (2) alrededor de 81 permeasas del sistema ABC (ATP binding cassette) están presentes en el genoma de *S. coelicolor*, éstas pueden ser utilizadas para incorporar azúcares, oligopéptidos y nucleósidos y (3) se detectaron 45 secuencias que parecen codificar para proteínas de unión a solutos y estas también parecen ser importantes para la incorporación de carbohidratos. La gran cantidad de exoenzimas y sistemas ABC detectado, diez veces mayor que en otras bacterias, nos da una idea de la amplia capacidad metabólica de los estreptomicetos (Bentley *et al.*, 2002).

En el genoma de *S. coelicolor* están presentes 53 sistemas de transporte de carbohidratos. De estos, 22 incluyen 14 permeasas de la familia de transportadores ABC, 4 permeasas específicas del sistema PTS, 2 copias de una proteína de la superfamilia mayor de facilitadores (MSF), una proteína de la familia simporte de soluto de sodio (SSS) y un facilitador de la familia mayor de proteínas intrínsecas (MIP) (ver Fig. 3). En la Tabla 1 se resumen los hallazgos de Bertram *et al.*, 2004, relacionados con los sistemas de incorporación de carbohidratos en *S. coelicolor*.

Estudios sobre los transportadores de glucosa en S. coelicolor

En el 2005 van Wezel *et al.*, realizaron un análisis bioquímico de la permeasa de glucosa GlcP de *S. coelicolor* y describieron su papel en la regulación transcripcional por medio de mutaciones en *glcP1* y *glcP2*. GlcP es una proteína con dos juegos de seis dominios transmembranales, unidos entre si por un asa citoplásmica. Esto concuerda con la clasificación de ésta como miembro de la superfamilia mayor de facilitadores (MFS), a la cual pertenecen permeasas de azúcares bacterianos y eucarióticos, simportes dependientes de H⁺ y las proteínas facilitadoras. La proteína GlcP esta codificada por dos genes en el cromosoma de *S. coelicolor*. Uno de ellos, *glcP1(sco5578)*, esta localizado en la región central del cromosoma y el

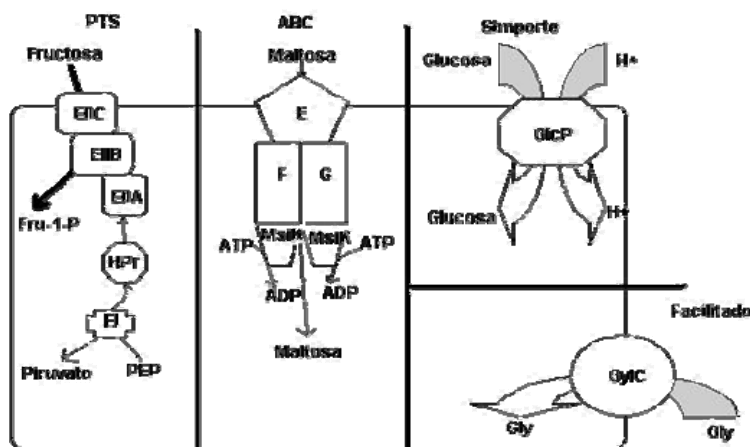


Fig. 3. Sistemas de incorporación de carbohidratos en *S. coelicolor* (Adaptado de Bertram *et al.*, 2004)

otro, *glcP2* (*sco7153*), está ubicado en el brazo derecho del mismo, con diferencia entre ellas de sólo una base, quizás producto de una mutación silenciosa, ya que codifican para el mismo producto de 472 aminoácidos. Una región duplicada de 36 pb río abajo de la región palíndrome de 16 nt, contiene el sitio de unión a factores de transcripción.

Los estudios cinéticos realizados por van Wezel *et al.* (2005), revelan que la incorporación de glucosa se induce por la presencia de éste carbohidrato en el medio. Para analizar la función de GICP se expresó en el vector pSU2718 con el cual se transformaron las mutantes de *E. coli* incapaces de transportar glucosa (LR2-175 y LM1). Las cepas transformadas demostraron una reversión de su fenotipo el cual se refleja en la incorporación de glucosa. Así, por medio de la expresión heteróloga de GICP en *E. coli* se logró determinar que codifica para una permeasa de glucosa y que este sistema de transporte (con alta afinidad por el carbohidrato), es indispensable para obtener altas tasas de crecimiento en medio con glucosa como fuente de carbono.

Para determinar el papel de GICP en el transporte de glucosa en *S. coelicolor* se generaron mutantes

en *glcP1* (BAP17), *glcP2* (BAP18), y en ambos genes (BAP19). La mutante BAP18 no parece ser afectada en su crecimiento en glucosa mientras que BAP17 y BAP19 muestran una clara reducción en su tasa de crecimiento. La cepa M145 y BAP18 utilizan glucosa de manera inmediata mientras que las cepas BAP17 y BAP19 comienzan a utilizarla más lentamente. La habilidad de las mutantes para incorporar glucosa es contundente en presencia de *glcP1*, pero en ausencia de este gen hay un descenso significativo en el crecimiento en glucosa y se pierde la alta afinidad de incorporación, esto sugiere que sólo *glcP1* es importante para obtener una alta tasa de crecimiento en glucosa. La mutante doble utiliza glucosa de manera muy ineficiente. Esto demuestra que puede existir un sistema de incorporación alternativo de muy baja afinidad. Al parecer, el transporte de glucosa en mutantes en *glcP2* es alrededor del 50% de la cepa silvestre lo que tal vez indique que *glcP1* es expresada a bajo nivel comparado con la cepa silvestre (van Wezel *et al.*, 2005).

Posteriormente se realizaron experimentos de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) con oligonucleótidos específicos para los

Tabla 1. Sistemas de incorporación de carbohidratos hallados en el genoma de *S. coelicolor*

Fuente de C	LOCUS INVOLUCRADOS Y POSIBLE FUNCION	POSIBLES PRODUCTOS DE EXPRESION	OBSERVACIONES
Celobiosa y	<i>ceb1</i> y <i>ceb2</i> Son genes que posiblemente codifican para las permeasas de celobiosa y celotriosa.	CebR: es un regulador transcripcional divergente, que pertenece a la familia de LacI CebE: es una proteína de unión a azúcares CebF y CebG: son proteínas integrales de membrana: la β -glucosidasa BglC y una probable azúcar hidrolasa (ShI).	Todos estos genes presentaron porcentajes elevados de identidad con relación al operón <i>ceb</i> de <i>Streptomyces reticuli</i> , el cual ha sido ampliamente caracterizado. En este modelo, los genes <i>cebEFG</i> son inducidos por celobiosa y la permeasa posee una alta afinidad por celobiosa y celotriosa.
β -Xilósidos	<i>bxl1</i> y <i>bxl2</i> Son operones que posiblemente contienen los genes para las permeasas de β -xilósidos.	BlxEFG: permeasas de β -xilósidos de tipo ABC BxlA: enzima metabólica β -xilosidasa. BxlR1 y BxlR2: posibles reguladores de la familia LacI.	Poseen una alta similitud con los genes <i>bxl</i> de <i>S. lividans</i> .
α -Glucósidos	<i>agl1</i> y <i>agl2</i> Podrían estar involucrados en la incorporación de α -glucósidos.	Agl1EFG: permeasa con una amplia especificidad por α -glucosidos, di y tri sacáridos.	El clúster <i>agl2REFGAX</i> , posee una alta identidad con el mismo clúster de <i>S. lividans</i> y se regula de manera muy similar.
Quitobiosa y xilósidos	<i>ngc-xil</i> Posiblemente este involucrado en el transporte de quitobiosa y xilósidos	Dicho locus comprende un clúster <i>ngcEFG</i> , y otro <i>xilEFG</i> , separados por un gen regulador de la familia ROK. Es muy posible que el clúster <i>ngcEFG</i> , codifique para el sistema de transporte de quitobiosa. El clúster <i>xilEFG</i> involucra genes que al parecer codifican para una proteína de unión a un soluto, una ATPasa y una proteína de membrana. Así, el clúster <i>xyIFGH</i> probablemente codifica para una permeasa de xilósidos en <i>S. coelicolor</i> .	Las proteínas del operón <i>ngcEFG</i> poseen entre 31 y 48% de identidad con el operon del mismo nombre en <i>Streptomyces olivaceoviridis</i> . Una probable quitinasa puede ser codificada por un gen en sentido opuesto localizado río arriba del clúster <i>xilEFG</i> .
Lactosa	<i>lac</i> Sistemas de transporte ABC para lactosa	Una probable β -galactosidasa que tiene un 43% de identidad con la β -galactosidasa BgaB de <i>Bacillus stearothermophilus</i> . LacI: Un posible regulador de la familia LacI con un 35% de identidad con el LacI de <i>E. coli</i> . Lac GEF: posibles componente de un sistema ABC específico para lactosa. Poseen entre un 24 y un 31% de identidad con los productos de los genes <i>LacEFG</i> de <i>Agrobacterium radiobacter</i> .	Entre en gen <i>lacI</i> y el gen <i>lacG</i> se encuentra una secuencia palíndrome de 16 pb espaciada por una secuencia de 29 pb. Se presume que dicha secuencia es un posible elemento regulador en <i>cis</i> .
Alcoholes de	<i>smoREFGD</i> Sistemas de transporte ABC para alcoholes de azúcar (formas reducidas de aldosas y cetosas)	SmoR: probable regulador del operón. SmoE: proteína de unión a soluto. SmoF y SmoG: translocadores de membrana. SmoD: una posible alcohol deshidrogenasa.	Dos secuencias invertidas repetidas de 8 pb y separadas por 54 pb río abajo de <i>smoE</i> pueden servir como elemento regulador en <i>cis</i> .

Ribosa	<i>rbs1</i> <i>rbs2</i> <i>rbs3</i> Sistemas de transporte ABC para ribosa	RbsH: proteína única de fusión compuesta de un fragmento de translocación de membrana y un fragmento de unión a soluto extracelular. RbsA: una ATPasa. RbsK: una ribocinasa . RbsD: una pequeña proteína de 129 aminoácidos similar a las proteínas de transporte de ribosa de alta afinidad de <i>E. coli</i> y <i>B. subtilis</i> . RbsR: un posible regulador de la familia de Lacl.	Se encontraron dos clústers más que pueden codificar para permeasas de ribosa: el clúster <i>rbs2EFA</i> codifica para una lipoproteína de unión a sustrato, una proteína integral de membrana y una ATPasa. Así mismo, el clúster <i>rbs3EFGAK</i> codifica para un tercer sistema de permeasa de ribosa.
Galactosa	<i>gal</i>	Galk: cinasa que fosforila la galactosa para incorporarla a la glucólisis. GalE1: proteína que epimeriza. GalT: producto que transfiere un grupo uridilo.	El gen que codifica para el transportador de la galactosa no ha sido bien elucidado aunque se cree que podría ser el gen <i>galP</i> que posee un 28% de similitud con el simportador de galactosa dependiente de sodio presente en <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .
Glicerol	<i>gyl</i>	GylR: involucrado en la inducción de sustrato y la represión catabólica del operón de glicerol. GylC: muestra un 49% de identidad con el producto GlpF de <i>B. subtilis</i> . GylA y GylB: tienen un 52 y un 32% de identidad con la glicerol cinasa GlpK y la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa GlpD de <i>E. coli</i> . GylX: muestra similitud con otras proteínas de función desconocida en otros actinomicetos.	
Glucosa	<i>glcP1</i> <i>glcP2</i>	Por el barrido del genoma de <i>S. coelicolor</i> en busca de permeasas no-PTS como la GlcP de <i>Synechocystis</i> sp. y la Glf de <i>Zymomonas mobilis</i> se encontró una proteína de 51 y 33% de identidad, respectivamente, la cual fue designada GlcP. El gen que codifica para esta proteína posee dos copias en el genoma de <i>S. coelicolor</i> , con 99% de identidad entre ellas. Los genes adyacentes a éstos no codifican para genes metabólicos o regulatorios cuyas funciones pudieran estar asociadas a <i>glcP1</i> y a <i>glcP2</i> .	La glucosa es la fuente de carbono preferida de <i>S. coelicolor</i> pero el transportador de glucosa no había sido identificado.

Adaptado de Bertram *et al.*, 2004

genes de *glcP1* y *glcP2*, con el fin de determinar los niveles de transcripción de dichos genes. Estos experimentos demostraron que los niveles de transcrito de *glcP1* en la mutante en *glcP2* son bastante reducidos comparados con los de la cepa silvestre. La explicación aparente es la generación de un RNA de interferencia y que la expresión de *glcP1* es fuertemente inducible por glucosa. No se detectó expresión de *glcP2* bajo las condiciones probadas lo que supone que este gen es menos importante que *glcP1*, o juega algún papel en condiciones de cultivo diferentes. La ubicación de *glcP2* en el variable e inestable brazo derecho del cromosoma de *S. coelicolor* hace pensar que es un

posible resultado de la presión evolutiva o un evento reciente de duplicación (van Wezel *et al.*, 2005).

La identificación de GlcP como el principal transportador de glucosa en *S. coelicolor* A3(2) da nuevas luces sobre las etapas tempranas de los procesos mediados por glucosa en este microorganismo (van Wezel *et al.*, 2005).

Diferenciación Morfológica y RCC

Otros mecanismos de insensibilidad a RCC están relacionados con la diferenciación celular. Un estudio de la relación entre el desarrollo de hifas aéreas y esporas y la RCC fue realizado por Pope

et al., en 1996. Ellos reportaron que en seis clases diferentes de mutantes *bld* (incapaces de producir hifas aéreas) de *S. coelicolor*, la expresión del gen *galP1* es insensible a represión catabólica. La posterior caracterización de las mutantes *bldA* y *bldB* indicó que en estas cepas la transcripción de *galP1*, gen que se cree está involucrado en la incorporación de galactosa, es independiente de galactosa e insensible a RC. La complementación de dichas mutantes con el *bldA* o *bldB* restaura tanto la sensibilidad a RC como la producción de hifas aéreas (Pope *et al.*, 1996).

Los estudios de regulación de otros genes sujetos a RC indican que en la mutante *bld* la expresión de *dagA* y *gyl* también es insensible a RC y que la complementación de estas mutantes con el gen *bldB* reestablece la sensibilidad a RC. La mutación *bldB* no afecta la expresión de promotores insensibles a RC, lo que sugiere que esta mutación no afecta la transcripción a nivel general sino que afecta específicamente a los genes sujetos a RC (Pope *et al.*, 1996). En *S. lividans* se identificó el gen regulador *reg1* que está involucrado en la represión de la α -amilasa. Dicho gen codifica para la proteína Reg1 que contiene motivos de unión a DNA en su extremo N-terminal, comparte algunas similitudes con la familia LacI/GalR. Reg1 posee un 95% de identidad con MalR y un 31% de identidad con la proteína CcpA de *B. subtilis* (Naguyen *et al.*, 1997). El represor transcripcional del gen *gyl* (GylR), esta también sujeto a RC. Contiene sitios de unión a DNA y tiene similitud con represores transcripcionales. Se ha visto que mutaciones en los genes *glkA*, *ccrA1* y *bld*, afectan la RC del gen *gyl*. Se cree que la regulación de dicho operón requiere de diversos reguladores tanto específicos como generales (Hindle & Smith, 1994)

En el año 2006, Rigali *et al.*, reportaron que concentraciones extracelulares por encima de 10 mM de N-acetilglucosamina, monómero que la quitina, previenen que *S. coelicolor* progrese más allá del estadio de micelio vegetativo. Así mismo, evidenciaron que la señal es transmitida a través

del regulador DasR (deficient in aerial mycellium and spore formation) perteneciente a la familia GntR que controla el regulón de N-acetilglucosamina y los genes *ptsH*, *ptsI*, y *ccr*, necesarios para la incorporación de N-acetilglucosamina. En un trabajo anterior Rigali *et al.*, predijeron la secuencia de unión del regulador DasR a la secuencia consenso ACTGGTCTAGACCACT, localizada río arriba de los genes *ptsH*, *ptsI*, y *ccr*, que codifican para las fosfotransferasas HPr, la enzima EI y la enzima EIIA^{Cr}, respectivamente (Rigali *et al.*, 2004). Así mismo, se examinó un posible sitio de unión de DasR río arriba de muchos de los genes relacionados con el metabolismo de la N-acetilglucosamina.

Al realizar la mutación del gene *dasR* en *S. coelicolor* M145, se observó que la mutante no es capaz de generar micelio aéreo ni esporas. Un paso importante en la formación de hifas aéreas es la producción del antibiótico SapB; una moléculas hidrofóbica derivada del producto codificado por el gen *ramS* que permite que emerjan la hifas aéreas. La producción de SapB esta regulada por los genes *bld*. Se ha visto que la "complementación" entre mutantes que crecen juntas es satisfactoria. Esta relación es unidireccional: una mutante actúa como secretor y la otra es un receptor de las moléculas excretadas restaurando la formación de hifas aéreas. Así, es propuesta una complementación jerárquica de mutantes *bld*: *bldJ*→*bldK*→*bldA/H*→*bldG*→*bldC*→*bldD* en donde las mutantes de la izquierda son donadores y las de la derecha los receptores. Experimentos de complementación demuestran que la esporulación puede ser inducida en la mutante en *dasR* por crecimiento cercano a cepa silvestre M145 y a las mutantes *bldA*, *bldB*, *bldC*, *bldF* y *whiG*, mientras que la proximidad a las mutantes *bldD*, *bldG*, *bldJ* y *bldK* no genera el mismo efecto. Esto demuestra que la mutante en *dasR* no se ajusta a la cascada de complementación anteriormente mencionada y no puede complementar ninguna de las mutantes *bld*.

(Rigali *et al.*, 2006).

La internalización de N-acetilglucosamina mediada por el sistema PTS parece ser constitutiva en mutantes *dasR*, mientras que en la cepa silvestre, la incorporación es inducida por la presencia de N-acetilglucosamina. Los niveles de proteínas HPr y EIIA^{Cr} en ausencia o presencia de N-acetilglucosamina son los mismos en la mutante *dasR*, mientras que en la cepa silvestre sólo son detectables en presencia de dicho sustrato. Para establecer la relación entre mutantes *dasR* y mutantes *pts*, fue llevada a cabo una complementación similar a la anteriormente descrita, revelando que las mutantes *dasR* no pueden actuar como secretoras y por consiguiente no pueden complementar mutantes *pts* y que las mutantes *pts* apenas si pueden restaurar el desarrollo en la mutante *dasR*. Una mutante en *nagE2* (en transporte de N-acetilglucosamina), puede restaurar el desarrollo de la mutante *dasR*, pero mutantes *ptsI*, *ptsH* y *crr* no generan el mismo efecto en la mutante *dasR*. Esto indica que el fenotipo de mutantes incapaces de generar micelio aéreo no refleja la imposibilidad de utilizar N-acetilglucosamina.

Finalmente Rigali *et al.* (2006), generaron un modelo del posible mecanismo de regulación de DasR en la utilización de N-acetilglucosamina (ver Fig. 4). Cuando hay baja concentración de N-acetilglucosamina y existe glucosa, la glucosa es el sustrato predilecto. Esta es transportada por el simporte GlcP, mientras que el sistema PTS para N-acetilglucosamina es expresado a nivel basal (Nothhaft *et al.*, 2003) y los componentes del PTS transfieren el fosfato a proteínas específicas para el desarrollo. Cuando la concentración extracelular de N-acetilglucosamina es alta, ésta es transportada y metabolizada a glucosamina-6-P, que induce el regulón de N-acetilglucosamina por inhibición de la capacidad de unión a DNA de DasR. En estas condiciones, los componentes del sistema PTS activan la transferencia del grupo fosfato del PEP a la N-acetilglucosamina. Así, la concentración

extracelular de N-acetilglucosamina determina la transferencia del fosfato al azúcar transportado o a proteínas de desarrollo dependientes del PTS (Rigali *et al.*, 2006). DasR es parte de un sistema de detección nutricional, actuando como un regulador pleiotrópico y multifuncional en actinomicetos, y controla el regulón de la N-acetilglucosamina y otras rutas relacionadas, además del transporte de otros azúcares (Rigali *et al.*, 2006).

Avances en la comprensión de la RCC por glucosa en Streptomyces

En 1982, Hodgson reportó el aislamiento de mutantes de *S. coelicolor* resistentes a la inhibición de su crecimiento por un análogo de la glucosa, la 2-desoxiglucosa (Dog). La Dog, al ser fosforilada en el primer paso de la glucólisis, se convierte en Dog-6-P, compuesto es altamente toxico para la célula que no puede ser metabolizado por los pasos siguientes de la vía glucolítica y cuya acumulación redundaba en la muerte celular.

Las mutantes aisladas fueron denominadas Dog^R. Éstas presentan un decremento en la sensibilidad a represión por varias fuentes de carbono, apreciable por la síntesis de los pigmentos coloreados actinorrodina y undecilprodigosina, y una reducción en la actividad de Glk, aunque el transporte de glucosa no estaba afectado (Hodgson, 1982). A dichas mutantes Dog^R de *S. coelicolor*, se les complementó la deficiencia con un fragmento de 2.9 kb que contiene el gen *glkA*, con el cual recuperaron la capacidad para utilizar glucosa, la actividad de GlkA y la sensibilidad a RCC (ausencia de producción de pigmentos) (Ikeda *et al.*, 1984). La expresión del gen de *glkA* en *E. coli* confirmó que su producto es una proteína que cataliza la fosforilación de la glucosa (Angell *et al.*, 1992). Sabiendo que en *B. subtilis*, Glk es importante a nivel de generación del intermediario glucosa-6-P, en *S. coelicolor* se trató de averiguar si el papel de Glk en la RCC era semejante. Para lo anterior, se realizó la complementación de

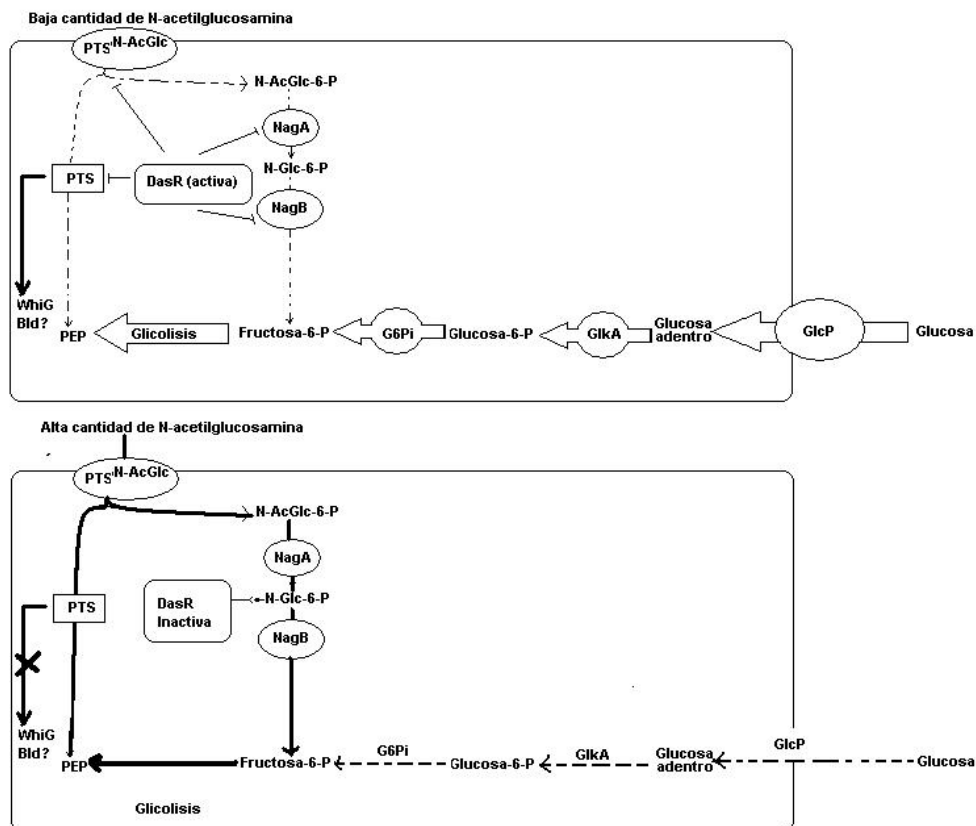


Fig. 4. Modelo del efecto de bajas y altas concentraciones de N-acetilglucosamina (N-AcGlc) en el medio. Abreviaturas: **N-AcGlc**: N-acetilglucosamina, **PTS^{N-AcGlc}**: sistema PTS para incorporación de N-acetilglucosamina, **PEP**: fosfoenolpiruvato, **N-AcGlc-6-P**: N-acetilglucosamina-6-fosfato, **N-Glc-6-P**: glucosamina-6-fosfato, **NagA**: N-acetilglucosamina-6-fosfato-desacetilasa, **NagB**: glucosamina-6-fosfato-isomerasa, **G6Pi**: glucosa-6-fosfato-isomerasa, **GlcA**: glucosa cinasa (Adaptado de Rigali *et al.*, 2006).

mutantes en *glkA* de *S. coelicolor* con un gen análogo de la glucosa cinasa de *Zymomonas mobilis*. Este gen reestablece la capacidad de utilización de la glucosa y la actividad de Glk, pero no la sensibilidad a RCC (Angell *et al.*, 1992). Esto sugiere que la Glk tiene una actividad regulatoria diferente a la catalítica y juega un papel importante en la regulación del metabolismo del carbono.

En estudios ulteriores por mapeo con la nucleasa S1, se caracterizó cada ORF del fragmento de 2.9 kb: el ORF1 (*SCO2128*) es un marco de lectura incompleto que hipotéticamente codifica para una proteína de 44.7 kDa, el ORF2 (*SCO2127*) es un marco de lectura completo que hipotéticamente codifica para una proteína de 20.1

kDa, y finalmente el ORF3 (*SCO2126*) es el gen *glkA* que codifica para la glucosa cinasa dependiente de ATP, una proteína de 33.1 kDa encargada de la fosforilación de la glucosa (ver Fig. 5). Estudios de complementación demostraron que con *glkA* se reestablece la capacidad de utilizar glucosa, la actividad de GlkA y sólo parcialmente la sensibilidad a RCC, pero para alcanzar los niveles de actividad de Glk encontrados en la cepa silvestre es necesaria la transcripción a partir de ambos promotores. Al transformar con *glkA* y *SCO2127* simultáneamente, además del fenotipo anterior, se reestablece completamente la sensibilidad a RCC a niveles similares a los de la cepa silvestre (Angell *et al.*, 1992). La función del gen *SCO2127* aún se

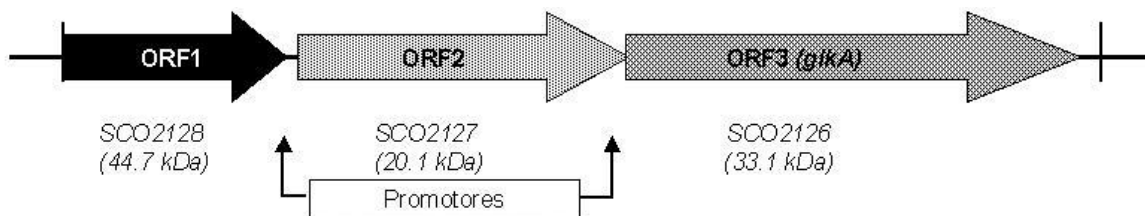


Fig. 5. Fragmento de 2.9 kb con el cual se complementaron las mutantes Dog^r de *S. coelicolor* (Ikeda *et al.*, 1984).

desconoce, aunque su cotranscripción con *glkA* sugiere que existe una conexión funcional entre los dos productos

Resultados similares se obtuvieron con las mutantes Dog^R de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* (Segura *et al.*, 1996). Estas mutantes también se caracterizan por ser insensibles a RCC y la actividad de Glk se encuentra disminuida entre el 10 y 30% de la cepa original. A diferencia de las

mutantes de *S. coelicolor*, las de *S. peucetius* var. *caesius* pueden crecer en glucosa como única fuente de carbono y tienen afectado parcialmente el transporte de glucosa (Escalante *et al.*, 1999).

A partir de una cepa Dog^R de *S. peucetius* var. *caesius* se aislaron una nueva serie de mutantes por su sensibilidad a Dog, en la Tabla 2 se muestran algunas de las características de las mutantes Dog^S obtenidas (Ramos *et al.*, 2004).

Tabla 2. Características de las mutantes Dog de *S. peucetius* var. *caesius*

Cepa	Sensibilidad a Dog ^a	Transporte de glucosa % ^b	Actividad de Glk % ^c	Sensibilidad a RCC ^d
Original	S	100	100	S
Dog ^R	R	51	15	R
Dog ^S -2	S	18	37	R
Dog ^S -11	S	71	84	R

^a Las cepas sensibles (S) no crecen en presencia de 2-desoxiglucosa mas lactosa 55 mM y las resistentes (R) si crecen.

^b Incorporación de glucosa 100% (2.21 mmol/mg de peso seco de micelio).

^c Glk: 100% (170 U/mg proteína).

^d La sensibilidad a RCC se determino por la formación de pigmento rojo (antraciclinas) producido en presencia de glucosa 500 mM. Las cepas resistentes (R) no producen pigmento y las sensibles (S) sí (Adaptado de Ramos *et al.*, 2004).

Estas cepas, al igual que la cepa parental, mostraron resistencia a la RCC por glucosa, con deficiencias en la incorporación de glucosa y en la actividad de Glk, esto refleja que no hay correlación directa entre la actividad de Glk, la sensibilidad a Dog y la RCC como si se observa en mutantes de *S. coelicolor* (Hodgson, 1982).

Revisando el efecto del gen *glkA* y *SCO2127* de *S. coelicolor*, sobre la actividad de Glk, el transporte de glucosa y la sensibilidad a RCC de mutantes Dog^R de *S. peucetius* var. *caesius*, Guzmán *et al.*, en el 2005, evidenciaron el papel estimulador de *SCO2127* sobre estos parámetros y como consecuencia sobre el catabolismo de la glucosa.

En *S. peucetius* var. *caesius* se detectó por Southern blot la presencia de genes homólogos a *glkA* y *SCO2127* de *S. coelicolor* que se cree están adyacentes en el genoma. Se sabe que existen genes homólogos a *glkA* y *SCO2127* en *Streptomyces avermitilis* con identidad de 86 y 95% respectivamente con los de *S. coelicolor*, lo que sugiere que están altamente conservados (Guzmán *et al.*, 2005).

Los estudios de complementación con el gen de *glkA* en mutantes *Dog^R* de *S. peucetius* var. *caesius*

permitieron la recuperación de actividad de Glk, pero no el transporte de glucosa, mientras que la complementación de las mutantes *Dog^R* de *S. peucetius* var. *caesius* con el gen *SCO2127* aumentó la actividad de Glk, el transporte de glucosa y la sensibilidad a la RCC, lo que se vio reflejado en la imposibilidad de sintetizar β -galactosidasa (enzima requerida para utilización de lactosa) y antraciclinas (metabolitos secundarios) en presencia de glucosa (Tabla 3) (Guzmán *et al.*, 2005).

Tabla 3. Efecto de la complementación de los genes *SCO2127* y *glkA* sobre transporte, actividad de Glk y sensibilidad a RCC en *S. peucetius* var. *caesius*

Cepa	Inserto	Transporte de glucosa % ^a	Actividad de Glk % ^b	Sensibilidad a RCC ^c
Original	-----	100	100	S
<i>Dog^R</i>	-----	51	15	R
SDR-1	<i>glkA</i>	49	95	S
SDR-2	<i>SCO2127</i>	108	115	S
SDR-3	<i>SCO2127+glkA</i>	113	331	S

^a Incorporación de glucosa: 100% (2.21 μ mol/mg de micelio seco).

^b Glk: 100% (170 U/mg de proteína).

^c La sensibilidad a RCC se determinó por la formación de pigmento rojo (antraciclinas) en presencia de glucosa 500 mM. Las cepas resistentes (R) no producen pigmento y las sensibles (S) sí

Modificado de Guzmán *et al.*, 2005

La Glk: una enzima misteriosa

En el año 2000, Mahr *et al.*, realizaron un estudio con miras a la purificación y caracterización bioquímica de la Glk de *S. coelicolor* y demostraron que la cantidad presente en la célula es similar en condiciones de represión y no represión, es decir, su expresión es constitutiva independientemente de la fuente de carbono empleada en el medio. La Glk es una enzima perteneciente a la familia ROK (represor, orf, kinase) que comprende cinasas bacterianas y reguladores como NagC de *E. coli* y XylR de *B. subtilis* (Titgemeyer *et al.*, 1994). La técnica de difracción circular y la predicción de la estructura secundaria *in silico* permitió saber, que la proteína tiene alrededor de 32% de α -hélices, 26% de hojas β extendidas, 13% hojas β plegadas y 29% de distribución al azar. La secuencia de

aminoácidos de la glucosa cinasa de *S. lividans* y *S. coelicolor* resultó ser idéntica y por consiguiente se cree que tienen el mismo papel en ambos organismos (Mahr *et al.*, 2000).

La Glk, aparentemente no contiene los dominios de unión a DNA en el extremo N-terminal que se encuentran en proteínas represoras de la familia ROK, y por ello no puede regular directamente la transcripción, por ello se ha propuesto que podría interactuar con factores de transcripción y desencadenar una cascada de señalización para la RCC (Angell *et al.*, 1992).

Algunas de las proteínas con las que podría interactuar Glk son los productos codificados por los genes *malR* y *gylR* (MalR y GylR), represores de los operones de maltosa y glicerol respectivamente. El gen *malR* de *S. coelicolor* A3(2), codifica para una proteína represora homóloga a la familia de proteínas represoras

Lacl/GalR. La interrupción o delección de dicho gen ocasiona la expresión constitutiva del gen *malE*, requerido para la utilización de maltosa y cuya expresión es inducida por la presencia de dicho sustrato y reprimida por glucosa (van Wezel *et al.*, 1997). Se cree que la proteína MalR es un regulador de la inducción por sustrato y la represión por glucosa en el metabolismo de la maltosa (van Wezel *et al.*, 1997).

En otros organismos como *B. subtilis*, *B. megatherium* y *E. coli*, la actividad de Glk ha sido estudiada y se ha visto que ésta es independiente de la fuente de carbono en los dos primeros, mientras que en *E. coli* ocurre algo similar, solo que la actividad se reduce a la mitad cuando las células se crecen en presencia de glucosa, debido a que ésta se fosforila primordialmente por el sistema PTS (Mahr *et al.*, 2000).

La Glk de *S. coelicolor* y *S. peucetius* var. *caesius* fueron caracterizadas bioquímicamente por Imriskova *et al.*, en el 2005. Ambas son enzimas citosólicas, homotetraméricas, con un peso molecular aproximado de cada monómero de 32 y 31 kDa, respectivamente. La Glk de *S. coelicolor* parece ser más estable que la Glk de *S. peucetius* var. *caesius*, ya que después de algunas horas de almacenamiento a 4°C ésta última se disocia en un 85% a su forma dimérica. Sin embargo, la presencia de 100 mM de glucosa evita su disociación. Este comportamiento no se observa en la Glk de *S. coelicolor* (Imriskova *et al.*, 2005). Recientemente reportamos la secuencia del gen que codifica para Glk en *S. peucetius* var. *caesius* (gi:50263005 de Gene bank). Dicha secuencia posee un 98% de identidad con la de *S. avermitilis* y un 87% con la de *S. lividans* y *S. coelicolor* (Langley *et al.*, 2004).

En el 2007, van Wezel *et al.*, propusieron que la cantidad de proteína Glk es más o menos independiente de la fase de crecimiento pero su actividad catalítica depende de la presencia de glucosa en el medio (van Wezel *et al.*, 2007). Así mismo, reportan que el transporte de glucosa y la

actividad de Glk presentan perfiles similares, lo que indica una posible relación funcional entre ellos. Prueba de ello es que la incorporación de glucosa en una cepa mutada en Glk decae drásticamente (van Wezel *et al.*, 2007). Análisis de RT-PCR muestran que tanto el nivel de expresión basal como el nivel de expresión inducida por glucosa del gen *glcP1*, son similares en la cepa mutante en *glk* y en la cepa silvestre, lo que demuestra que la expresión de *glcP1* no depende de la presencia de *glk*. Es decir, la diferencia en las actividades de transporte entre la cepa silvestre y la mutante en *glk* no generan diferencias en la expresión de *glcP1*. Una probable explicación es que la incorporación de la glucosa en la mutante es inhibida por la acumulación de glucosa intracelular. Una reducción en la incorporación de glucosa fue observada en una mutante en *glk* de *S. peucetius* (Ramos *et al.*, 2004). Estos datos hicieron pensar que *glk* y *glcP* operan en conjunto y quizás interactúan entre sí (van Wezel *et al.*, 2007).

Para examinar si *glk* se une a *glcP*, se realizaron pruebas de Western blot con anticuerpos anti-Glk, mostrando que cuando las células son crecidas en glicerol como única fuente de carbono, la Glk es encontrada únicamente en la fracción citoplásmica, pero cuando las células se crecen en glucosa, una cantidad significativa de *glk* es encontrada en la fracción membranal. Esta observación ha generado un modelo en el que se propone que el tetrámero de la Glk forma un complejo con la proteína de transporte de glucosa *glcP* en la membrana celular, mientras que la forma citoplásmica de la Glk actúa en respuesta a la presencia de glucosa, ATP u otros metabolitos aún desconocidos (van Wezel *et al.*, 2007).

Sus datos sugieren, que la actividad de Glk es modulada a través de la activación o modificación post-traduccionales dependiente de intermediarios metabólicos, lo que ocurre en bacterias Gram-positivas con bajo contenido de GC donde la HPr-K/P, activada por un metabolito, activa el complejo represor global CcpA/HPr-Ser-P a través de la

fosforilación de la serina. Las modificaciones que sufre la Glk para pasar de inactiva a activa son desconocidas. Glk pertenece a una familia de cinasas cuyas cisteínas son vitales para su

actividad y es posible que jueguen un papel clave en el control de su función (van Wezel *et al.*, 2007) (ver Fig. 6).

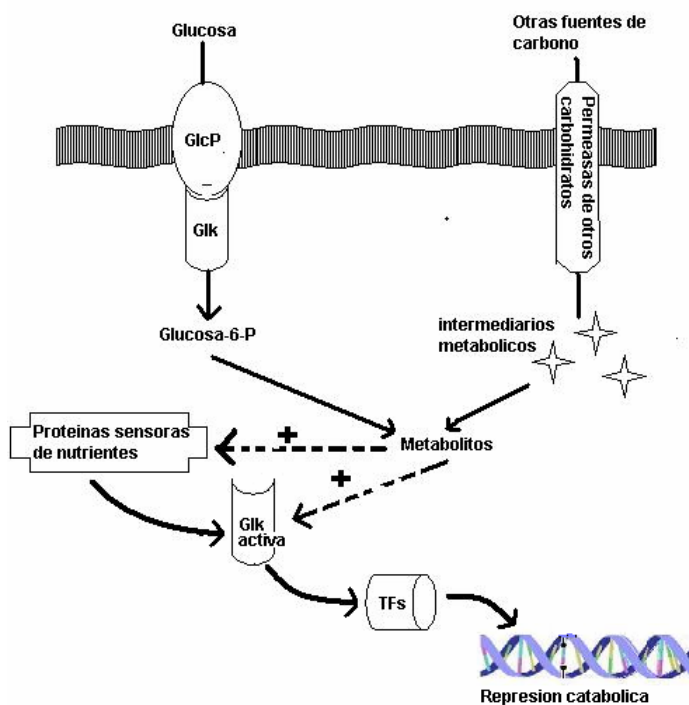


Fig. 6. Modelo del posible papel regulatorio de la glucosa cinasa en *Streptomyces coelicolor* (Adaptado de van Wessel *et al.*, 2007).

Genes no reprimidos por Glk

Uno de los genes regulados por represión catabólica en *S. coelicolor*, es el gen que codifica para la glicerol cinasa (Seno & Chater, 1983). En 1994, Kwakman y Postma observaron que la glicerol cinasa es reprimida de dos a diez veces por 5 fuentes de carbono diferentes, entre las que se encontraban glucosa, arabinosa, galactosa, citrato y glutamato. En el mismo estudio, se vio la represión de la actividad agarasa por varias fuentes de carbono. La agarasa es una enzima extracelular que rompe la red de agar generando disacáridos, cuando esto sucede se puede ver claramente un halo alrededor de la colonia. Muchos carbohidratos causan la represión de la actividad agarasa como glucosa, galactosa, manitol, arabinosa y algunos

intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos como malato, citrato y succinato. Los resultados de este estudio y otros experimentos, demostraron que en *S. coelicolor* las actividades de glicerol cinasa y agarasa son reprimidas por una amplia variedad de fuentes de carbono.

También se vio que las actividades de glicerol cinasa y agarasa podían ser inducidas totalmente en mutantes *glkA* en presencia de las fuentes de carbono que generan represión en la cepa silvestre. Esto demostró que no solamente hay liberación de la represión por glucosa, sino también de otras fuentes que no son metabolizadas vía glucosa cinasa. La sobreexpresión de la glucosa cinasa por medio de un plásmido multicopia introducido en la célula de *S. coelicolor*, que contiene el gen de *glkA*, mostró una inducción normal de la actividad de

agarasa en presencia de los carbohidratos probados, un fenotipo muy similar al de la mutante en *glkA*. Únicamente en los carbohidratos derivados del ciclo de Krebs se nota un ligero aumento de represión. Esta observación aumenta la posibilidad de que la Glk en la mutante *glkA*⁻ puede estar catalíticamente inactiva, pero aún poseer su función regulatoria. Los resultados de este estudio fueron concluyentes para suponer que la Glk juega un papel realmente importante en el fenómeno de RCC ejercida por glucosa, pero también por otros carbohidratos que no requieren de la forma catalíticamente activa de la Glk para su metabolismo (Kwakman & Postma., 1994).

Es de notarse que, cuando el gen de la quitinasa *chi63* de *Streptomyces plicatus* fué introducido en *S. coelicolor* A3(2), se observó que su expresión es inducida por quitina y reprimida por glucosa, de manera independiente del gen *glkA* (Ingram & Westpheling, 1995; Hodgson, 2000), mientras que la represión por glucosa de este mismo gen en *S. lividans* es dependiente de gen de *glkA* (Saito, 1998). Otros casos de represión por glucosa independiente de GlkA fueron reportados para la α -amilasa de *Streptomyces reticuli* (Hodgson, 2000) y para la α -amilasa de *Streptomyces kanamyceticus* (Flores *et al.*, 1993). También se observó que el gen de la α -amilasa de *Streptomyces limosus*, que se encuentra bajo RC por manitol, cuando se transfiere a *S. coelicolor* A3(2), está sujeto a RC por glucosa dependiente de *glkA* (Hodgson, 2000).

Un trabajo encaminado a la construcción de cepas de *Streptomyces* productoras de α -amilasa no sujetas a RCC fue desarrollado por Mellouli *et al.* en el 2002. Como se comentó anteriormente, muchos estreptomicetos secretan diferentes tipos de hidrolasas que degradan diversos tipos de polisacáridos. Ejemplo de esto son las α -amilasas, que son las responsables de la ruptura de almidón por cortes en los enlaces α -1,4 glucosídicos. En la industria del almidón, son necesarias altas temperaturas de hidrólisis y los gránulos de almidón no pueden ser atacados por la α -amilasa a menos

que se rompan por la misma temperatura (Mellouli *et al.*, 2002).

Las amilasas de *Streptomyces* reportadas, no son estables por encima de los 50-60°C de temperatura, excepto la α -amilasa de *Streptomyces* sp. TO1 que trabaja a una temperatura óptima de 70°C, por lo que ésta podría ser de gran atractivo a nivel industrial. Se cree que en presencia de glucosa en el medio, la síntesis de reguladores transcripcionales negativos (NTR) y su unión a secuencias específicas, como el elemento simétrico DSE en el promotor del gen de α -amilasa de *Streptomyces* sp. TO1, pueden reprimir dicho gen.

En este estudio, Mellouli *et al.* (2002) observaron la expresión de la α -amilasa de *Streptomyces* sp. TO1 (su hospedero original), en *S. lividans* TK24 y en una mutante de *S. lividans* interrumpida en el gen *reg1*, el regulador pleiotrópico de los genes que codifican para α -amilasa y quitinasa. Para ello, se utilizaron los plásmidos pLM2 (un plásmido de alto número de copias en el cual está clonado el gen de la α -amilasa TO1), pIJ702 (plásmido replicativo en *Streptomyces*, de alto número de copias), pLM10 (plásmido que contiene una secuencia reguladora presente en el promotor del gen *amyTO1* denominada DSE) y pLM11 (plásmido que contiene clonado el gen de la α -amilasa TO1 con la secuencia reguladora DSE, mutada en 3 pb).

En medio sólido, en las cepas de *S. lividans* TK24/pLM2 y TO1/pIJ702, la actividad de α -amilasa fue detectada únicamente en presencia de almidón en el medio de cultivo. En la cepa TO1/pLM10 y en la de *S. lividans* TK24/pLM11, la expresión de la α -amilasa TO1 es reprimida por la presencia de glucosa y glicerol en el medio (Mellouli *et al.*, 2002). Cuando se crecieron las cepas en medio mínimo líquido con 1% de almidón, las cepas TO1/pIJ702 y TO1/pLM10 presentaron una actividad de α -amilasa TO1 muy baja, comparada con la de las cepas de *S. lividans* TK24/pLM2 y *S. lividans* TK24/pLM11. Cuando se crecieron las cepas en medio mínimo líquido con 1% de almidón

más 1% de glucosa o 1% de glicerol, no se detectó actividad en las cepas TO1/pIJ702 y TK24/pLM2. En las cepas TO1/pLM10 y TK24/pLM11, se detectó actividad en presencia de glucosa y glicerol, similar a la detectada en presencia de almidón, es decir, no se observa efecto negativo de la glucosa o el glicerol en la expresión de la α -amilasa TO1. La resistencia a la represión catabólica en la cepa de *S. lividans* TK24/pLM11 puede ser explicada por el hecho de que el NTR reconoce el elemento DSE presente en el promotor de la α -amilasa TO1, y cuando la simetría de esta secuencia es alterada, la afinidad de NTR por ésta disminuye y en un plásmido de alto número de copias el efecto de NTR puede ser eliminado por completo. De la misma forma se cree que el efecto del factor NTR presente en *Streptomyces* sp. TO1 es superado por las múltiples copias de la secuencia DSE lo que libera a la cepa de la represión.

CONCLUSIONES

Los mecanismos de RCC difieren substancialmente entre bacterias (Stülke & Hillen, 1999). La preferencia de una fuente de carbono sobre otra en un microorganismo particular, genera la activación de señales en su interior. Estos mecanismos no podrán ser comprendidos bajo un esquema lineal sino interrelacionado, como si fuera una red. Una red en la cual se pueden entrelazar millones de señales remotas que redundan en efectos aparentemente alejados o no relacionados entre sí.

Es mucho lo que se ha podido elucidar acerca del mecanismo de RCC en bacterias Gram-positivas, pero así mismo, es mucho lo que queda por saber. Son muchos los elementos que aún desconocemos de este rompecabezas de regulación por fuentes de carbono y tal vez en ellos estén la respuestas a muchas de nuestras preguntas.

Los avances en las técnicas de biología molecular, herramientas bioquímicas e informáticas, aunado a la secuenciación de genomas de

microorganismos de este grupo, entre muchas otras estrategias, brindaran a los futuros investigadores mayores herramientas para la búsqueda de estos elementos y para la comprensión de muchos de los fenómenos regulatorios ejercidos por fuentes de carbono preferenciales.

Lo único que es claro hasta ahora, es que los microorganismos poseen estrategias más inteligentes que los seres humanos a la hora de regular su alimentación. Sin necesidad de acudir a nutriólogos o dietistas, ellos saben qué comer y cuales son los beneficios de comerlo. Esto les ayuda a tener mejores condiciones de vida y a garantizar, a sus futuras generaciones, salud y bienestar.

REFERENCIAS

- 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.
- Barrière C, Veiga-da-Cunha M, Pons N, Guédon E, van Hijum S, Kok J, Kuipers O, Ehrlich D & Renault JP (2005) Fructose utilization in *Lactococcus lactis* as a model for low GC Gram-positive bacteria: its regulator, signal, and DNA-binding site. *J. Bacteriol.* 187: 3752-3761.
- Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, Collins M, Cronin A, Fraser A, Goble A, Hidalgo J, Hornsby T, Howarth S, Huang CH, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabinowitsch E, Rajandream MA, Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek A, Woodward J, Barrell BG, Parkhill J & Hopwood DA (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417: 141-147.
- Bertram R, Schlicht M, Mahr K, Nothhaft H, Saier M

- & Titgemeyer F (2004) *In silico* and transcriptional analysis of carbohydrate uptake systems of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* 186: 1362-1373.
- Brückner R & Titgemeyer F (2002) Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiol. Lett.* 209: 141-148.
- Butler MJ, Deutscher J, Postma PW, Wilson TJ, Galinier A & Bibb MJ (1999) Analysis of a *ptsH* homologue from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *FEMS Microbiol. Lett.* 177: 279-288.
- Darbon E, Servant P, Poncet S & Deutscher J (2002) Antitermination by GlpP, catabolite repression via CcpA and inducer exclusion triggered by P~GlpK dephosphorylation control *Bacillus subtilis glpFK* expression. *Molec. Microbiol.* 43: 1039-1052.
- Deutscher J, Küster E, Bergstedt U, Charrier V & Hillen W (1995) Protein kinase-dependent HPr-CcpA interaction links glycolytic activity to catabolite repression in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 15: 1049-1053.
- Demain AL (1989) Carbon source regulation of idiolite biosynthesis in actinomycetes. *In: Regulation of secondary metabolism in actinomycetes*, Shapiro S (ed). CRC Press, Boca Raton, FL., pp. 127-131.
- Derouaux A, Dehareng D, Lecocq E, Halici S, Nothaft H, Giannotta F, Moutzourelis G, Dusart J, Devreese B, Titgemeyer F, Beeumen JV & Rigali S (2004) Crp of *Streptomyces coelicolor* is the third transcription factor of the large CRP-FNR superfamily able to bind AMPc. *Bioch. and Bioph. Res. Commun.* 325: 983-990.
- Escalante L, Ramos I, Imriskova I, Langley E & Sanchez S (1999) Glucose repression of anthracycline formation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 572-578.
- Flores ME, Ponce E, Rubio M & Huitron C (1993) Glucose and glycerol repression de α -amilase in *Streptomyces kanamyceticus* and isolation of deregulated mutants. *Biotechnol. Lett.* 15: 595-600.
- Galinier A, Haiech J, Kilhoffer M, Jaquinod M, Stülke J, Deutscher J & Martin-Verstraete I (1997) The *Bacillus subtilis crh* gene encodes a HPr-like protein involved in carbon catabolite repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 8439-8444.
- Galinier A, Kravanja M, Engelmann R, Hengstenberg W, Kilhoffer MC, Deutscher J & Haiech J (1998) New protein kinase and protein phosphatase families mediate signal transduction in bacterial catabolite repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 1823-1828.
- Görke B, Fraysse L & Galinier A (2004) Drastic differences in Crh y HPr syntesis levels reflect their different impacts on catabolite repression in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 186:2992-2995.
- 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*. *Microbiology*, 151: 1717-1723.
- Hanson KG, Steinhauer K, Reizer J, Hillen W, Stülke J (2002) HPr kinase/phosphatase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene and effects of mutations on enzyme activity, growth and carbon catabolite repression. *Microbiology*, 148: 1805-1811.
- Henkin TM (1996) The role of the CcpA transcripcional regulator in carbon metabolism in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 135: 9-15.
- Hindle Z & Smith P (1994) Subtrate induction and catabolite repression on the *Streptomyces coelicolor* glycerol operón are mediated through the GylR protein. *Mol. Microbiol.* 12:737-745.
- 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.
- Hodgson DA (2000) Primary Metabolism and its control in *Streptomyces*: a most unusual group of bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 42: 47-238
- Ikeda H, Seno ET, Bruton CJ & Chater KF (1984) Genetic mapping, cloning and physiological aspects of the glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Gen. Genet.* 196: 501-507.
- 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.
- Inácio JM, Costa C & Sá Nogueira I (2003) Distinct molecular mechanisms involved in carbon catabolite repression of the arabinose regulon in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 149: 2345-2355.
- Inaoka T, Ochi K (2007) Glucose uptake pathway-specific regulation of syntesis of neotrehalosadiamine, a novel autoinducer produced in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 189: 65-75.
- Ingram C, Delic I & Westpheling J (1995) *ccrA1*: mutation in *Streptomyces coelicolor* that affects the control of catabolite repression. *J. Bacteriol.* 177: 3579-3586.
- Jones BE, Dossonnet V, Küster E, Hillen W, Deutscher J & Klevit RE (1997) Binding of the catabolite repressor protein CcpA to its DNA target is regulated by phosphorylation of its corepressor HPr. *J. Biol. Chem.* 272: 26530-26535.
- Kim JH & Chamblis GH (1997) Contacts between *Bacillus subtilis* catabolite regulatory protein CcpA and *amyO* target site. *Nucleic. Acid. Res.* 25: 3490-3496.
- Kim JH, Voskuil MI, Chambliss GH (1998) NADP, corepressor for the *Bacillus subtilis* catabolite control protein CcpA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 9590-9595.
- Kwakman JH & Postma PW (1994) Glucose kinase has a regulatory role in carbon catabolite repression in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 176: 2694-2698.
- Kraus A, Küster E, Wagner A, Hoffmann K & Hillen W (1998) Identification of a co-repressor binding site in a catabolite control protein CcpA. *Mol. Microbiol.* 30: 955-963.
- Langley E, Mascareñas N, Ruíz B & Sánchez S (2004) *Streptomyces peucetius* var. *caesius* glucose kinase. NCBI Gen bank nucleotide. gi: 50263005.
- 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.
- Mellouli L, Karray-Rebai I & Bejar S (2002) Construction of α -amylase-producing strains not subject to carbon catabolite repression. *FEMS Microbiol Lett* 206: 157-162.
- Naguyen J, Francois F, Virolle M & Guérineau M (1997) Amylase and chitinase genes in *Streptomyces lividans* are regulated by *reg1*, a pleiotropic regulatory gene. *J. Bacteriol.* 179: 6383-6390.
- Nothaft H, Dresel D, Willimek A, Mahr K, Niederweis M & Titgemeyer F (2003) The phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is biased for N-acetylglucosamine metabolism. *J. Bacteriol.* 185: 7019-7023.
- O'Loughlin S, Graham R, McMullan G & Ternan N (2006) A role for carbon catabolite repression in the metabolism of phosphonoacetate by *Agromyces fucosus* Vs2. *FEMS Microbiol Lett* 261: 133-140.
- Parche S, Schmid R & Titgemeyer F (1999) The phosphotransferase system (PTS) of *Streptomyces coelicolor*: identification and biochemical analysis of a histidine phosphocarrier protein HPr encoded by the gene *ptsH*. *Eur J. Biochem* 265: 308-317.
- Parche S, Nothaft H, Kamionka A & Titgemeyer F (2000) Sugar uptake and utilisation in

- Streptomyces coelicolor*: a PTS view to the genome. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78: 243-251.
- Poncet S, Mijakovic I, Nessler S, Gueguen-Chaignon V, Chaptal V, Galinier A, Boël G, Alain M & Deutscher J (2004) HPr kinase/phosphorylase, a Walker motif A-containing bifunctional sensor enzyme controlling catabolite repression in Gram-positive bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1697: 123-135.
- Pope M, Green B & Westpheling J (1996) The *blt* mutants of *Streptomyces coelicolor* are defective in the regulation of carbon utilization, morphogenesis and cell-cell signaling. *Mol. Microb.* 19: 747-756.
- Postma W, Lengeler JW & Jacobson GR (1993) Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system in bacteria. *Microbiol. Rev.* 57: 543-594.
- 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.
- Reizer J, Bergstedt U, Galinier A, Küster E, Saier M, Hillen W, Steinmetz M, Deutscher J (1996) Catabolite repression resistance of *gnt* operon expression in *Bacillus subtilis* conferred by mutation of His-15, the site of phosphoenolpyruvate-dependent phosphorylation of the phosphocarrier protein HPr. *J. Bacteriol.* 178: 5480-5486.
- Reizer J, Hoischen C, Titgemeyer F, Rivolta C, Rabus R, Stülke J, Karamata D, Saier M & Hillen W (1998) A novel protein kinase that controls carbon catabolite repression in bacteria. *Molec. Microbiol.* 27: 1157-1169.
- Reizer J, Novotny J, Hengstenberg W & Saier MH (1984) Properties of ATP-dependent protein kinase from *Streptococcus pyogenes* that phosphorylates a serine residue in HPr, a phosphocarrier protein of the phosphotransferase system. *J. Bacteriol.* 160: 333-340.
- Repizo G, Blancato V, Sender P, Lolkema J & Magni C (2006) Catabolite repression of the cisST two-component system in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 260: 224-231.
- Rigali S, Nothhaft H, Noens E, Schlicht M, Colson S, Müller M, Joris B, Koerten H, Hopwood D, Titgemeyer F & van Wezel G (2006) The sugar phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is regulated by the GntR-family regulator DasR and links N-acetylglucosamine metabolism to the control of development. *Molec. Microb.* 61: 1237-1251.
- Romano AH & Saier MH (1992) Evolution of the bacterial phosphoenolpyruvate system. Section I. Physiological and organism considerations. *In: Evolution of metabolic function*. Mortlock RP (ed). CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla., pp. 143-170.
- Rosana-Ani L, Skarlatos P & Dahl M (1999) Putative contribution of glucose kinase from *Bacillus subtilis* to carbon catabolite repression (CCR): a link between enzymatic regulation and CCR?. *FEMS Microbiol. Lett.* 171: 89-96.
- Saier MH (1996) Regulatory interactions controlling carbon metabolism: an overview. *Res. Microbiol.* 147: 439-587.
- Saier MH & Reizer J (1992) Proposed uniform nomenclature of the proteins and protein domains of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system based on structural, evolutionary and functional considerations. *J. Bacteriol.* 174: 1433-1438.
- Saito A, Fujii T, Yoneyama T, Miyashita K. (1998) *glkA* is involved in glucose repression of chitinase production in *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* 180: 2911-2914.
- 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.
- Seno ET & Chater KF (1983) Glycerol catabolic enzymes and their regulation in wild-type and

- mutants strain of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Gen. Microbiol.* 129: 1403-1413.
- Simpson C & Russell R (1998) Identification of a homolog of CcpA catabolite repressor protein in *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* 66: 2085-2092.
- Stülke J & Hillen W (1998) Coupling physiology and gene regulation in bacteria: the phosphotransferase sugar uptake system delivers the signals. *Naturwissenschaften* 85: 583-592.
- Stülke J & Hillen W (1999) Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr. Op. Microbiol.* 2: 195-201.
- Titgemeyer F, Reizer J, Reizer A, Saier MH Jr. (1994) Evolutionary relationships between sugar kinases and transcriptional repressors in bacteria. *Microbiology*, 140: 2349-2354.
- Titgemeyer F, Walkenhorst J, Reizer J, Stuiver MH, Cui X, Saier MH Jr. (1995) Identification y characterization of phosphoenolpyruvate: fructose phosphotransferase systems in three *Streptomyces* species. *Microbiology*, 141:51-58.
- Titgemeyer F & Hillen W (2002) Global control of sugar metabolism: a Gram-positive solution. *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 59-71.
- van Wezel G, White J, Young P, Postma P & Bibb M (1997) Substrate induction and glucose repression of maltose utilization by *Streptomyces coelicolor* A3(2) in controlled by *malR*, a member of the *lacI-galR* family of regulatory genes. *Mol. Microbiol.* 23: 537-549.
- van Wezel G, Mahr K, König M, Traag B, Pimentel-Shmitt E, Willimek A & Titgemeyer F (2005) GlcP constitutes the major glucose uptake system of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* 55: 624-636.
- van Wezel G, König M, Mahr K, Nothhaft H, Thomane A, Bibb M & Titgemeyer F (2007) A new piece of an old Jigsaw: glucose kinase is activated posttranslationally in a glucose transport-dependent manner in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 12: 67-74.
- Walket JE, Saraste M, Runswick MJ & Gay NJ (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP syntase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a comoon nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1: 945-951.
- Warner J & Lolkema J (2003) CcpA-dependent carbon catabolite repression in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 475-490.
- Zalieckas J, Wray L & Fisher S (1999) Trans-acting factors affecting carbon catabolite repression of the *hut* operón in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 181: 2883-2888.
- Zalieckas JM, Wray LV & Fisher SH (1998) Expression of the *Bacillus subtilis* *acsA* gene: position and sequence context affect cre-mediated carbon catabolite repression. *J. Bacteriol.* 180: 6649-6654.