



00557
10

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

**AISLAMIENTO Y EXPRESION DEL GENE QUE
CODIFICA PARA LA DEXTRANSACARASA
DE *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ**

TESIS

que para obtener el título de:

Maestro en Ciencias

- Presenta

Biol. José Luis Fernández Vázquez

Tutor:

Dra. Clarita Olvera Carranza

CUERNAVACA, MOR.

2003

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Ingeniería y Tecnología de Enzimas adscrito al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Clarita Ólvera Carranza y del Dr. Agustín López-Munguía Canales. Durante su realización se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto No. 135535-B y de la beca 158999.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

D

A mis Padres con toda gratitud y esfuerzo...

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

e

Agradecimientos

Al Dr. Agustín López-Munguía Canales por haberme permitido ingresar a su gran equipo de investigación y a la Dra. Clarita Olvera Carranza que además de haberme llevado a lo largo de este aprendizaje siempre conté con su amistad incondicional, a los dos por igual, gracias.

A los miembros del jurado evaluador por sus valiosos comentarios:

Dra. Clarita Olvera Carranza
Dr. Rafael Vázquez Duhalt
Dr. Jesús Silva Sánchez
Dr. Baltazar Becerril Lujan
Dra. Claudia Sánchez San Martín

A todos y cada uno de los compañeros y amigos del laboratorio de biocatálisis que en este caso son ellas mayoría: Vanesa, Gina, Sandra Morales, Chelo, Mary, Sandra del Moral, Alina, Xoehitl, Martha Marcela, Edmundo, Male, Vero, Rebeca, Alejandro, Doña Aure y Fer. A todos ustedes muchas gracias por su apoyo y amistad a lo largo de toda esta travesía.

A los que se fueron antes que yo, Fabio, Martha y Lolita, por igual donde se encuentren gracias.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A los Dres. Guillermo Dávila y Víctor González por haberme brindado la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo aún siendo estudiante.

A los compañeros y amigos del laboratorio de Evolución molecular del CIFN: Rosa Elena, Pili, Ismael, Paty, Vero, Carmen, Rosa Isela, Toño (donde andes), Pepe, Irina, Miguel, Tania, Grisel, y Pablo.

A Angeles, Yolo, José Chimal, Fernando y Vero Chávez quienes en determinados instantes me alentaron a ustedes les agradezco su amistad.

A toda mi familia que lejos o cerca me ha brindado su apoyo. A mi maestro y amigo E.S.N.A. quien siempre se encuentra cerca de mí. A ti Elvia.

A todos y cada uno de ustedes que con su ayuda y aliento positivo estuvo conmigo en este corto tiempo pero muy grande en mi vida.

Gracias...

TESIS CON
FALLA DE CUBIERTA

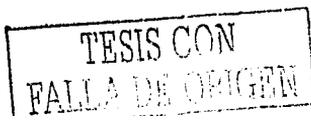
INDICE

Índice de Figuras	i
Índice de Tablas	ii
RESUMEN	1
I.- INTRODUCCIÓN.....	2
II.-GENERALIDADES	3
II.1.- Dextrana y dextransacarasa	3
II.2.- Mecanismo de reacción	6
II.3.- Elongación hacia el extremo no-reductor	7
II.4.- Elongación hacia el extremo reductor	8
II.5.- Estructura de las dextransacarasa	11
II.5.1.- Péptido señal	11
II.5.2.- Región variable	12
II.5.3.- Región catalítica	12
II.5.4.- Región de unión a polímero	13
II.6.- DsrT, una dextransacarasa truncada	14
II.7.- Predicción de la estructura terciaria de la DXS a partir del N-terminal	14
II.8.- Regulación de las dextransacarasa	15
II.9.- <i>Leuconostoc mesenteroides</i> 1BT-PQ	16
III.- OBJETIVOS	17
IV.- MATERIALES Y MÉTODOS	18
IV.1.- Cepas bacterianas	18
IV.2.- Medios de Cultivo	18

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4

IV.3.- Manipulación del ADN	19
IV.3.1.- Purificación del ADN cromosomal de <i>L. mesenteroides</i>	19
IV.3.2.- Purificación de Plásmidos	19
IV.3.3.- Oligonucleótidos	20
IV.3.4.- Amplificaciones por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	21
IV.3.5.- Secuenciación de los productos amplificados	22
IV.4.- Ensayos southern blott	23
IV.4.1.- Digestión del ADN cromosomal	23
IV.4.2.- Hibridizaciones	23
IV.5.- PCR-Inverso	23
IV.6.- Clonación de los productos de amplificación	24
IV.7.- Expresión de la proteína	25
IV.7.1.- Perfil de expresión	25
IV.7.2.- Expresión de la DsrP	25
IV.7.3.- Incubación del gel de actividad con dextranasa	27
IV.7.4.- Medición de actividad de la proteína recombinante	27
IV.7.5.- Cuantificación de la proteína	28
IV.8.- Análisis de las secuencias	28
V.- RESULTADOS	29
V.1.- Aislamiento del gene <i>dsrP</i> de <i>L. mesenteroides</i> IBT-PQ	29
V.1.1.- Aislamiento de la región central del gene <i>dsrP</i>	29
V.1.2.- Aislamiento de la región final del gene <i>dsrP</i>	30
V.1.3.- Aislamiento de la región inicial del gene <i>dsrP</i>	32
V.2.- Caracterización del gene	34
V.2.1.- Análisis de la secuencia peptídica	45
V.2.2.- Péptido señal	47



V.2.3.- Región Variable	48
V.2.4.- Región Catalítica	48
V.2.5.- Región de unión a glucano	52
V.2.6.- Identificación de un posible gene regulador de la DsrP	53
V.3.- Expresión de la proteína	55
V.3.1- Expresión de la DsrP en <i>E. coli</i>	57
VI.- DISCUSION	59
VII.- CONCLUSIONES	63
VIII.- PERSPECTIVAS	64
IX.- BIBLIOGRAFIA	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Reacción de síntesis de dextrana	4
Figura 2.- Estructuras de los glucanos sintetizados por glucosiltransferasas de <i>Streptococcus spp.</i> y <i>L. mesenteroides</i>	5
Figura 3.- Diagrama del mecanismo de reacción de la dextransacarasa	8
Figura 4.- Modelo de la síntesis de dextrana	9
Figura 5.- Modelo estructural del sitio activo de la dextransacarasa	10
Figura 6.- Modelo que explica las reacciones de aceptor	10
Figura 7.- Esquema estructural de las dextransacarasas	11
Figura 8.- Representación esquemática del PCR-Inverso	24
Figura 9.- Fragmento amplificado por PCR con los oligonucleótidos PQ+1 y PQ-1	29
Figura 10.- Mapa de restricción del fragmento amplificado con los oligos PQ+1 y PQ-1	30
Figura 11.- Southern blot utilizando el fragmento de 1505 pb como sonda	31
Figura 12.- Fragmento de 3.2 Kb amplificado por PCR-Inverso	31
Figura 13.- Southern blot utilizando el fragmento de 1505 pb como sonda	32
Figura 14.- Fragmento de 2.8 Kb amplificado por PCR-Inverso	33
Figura 15.- Amplificación de un fragmento de 5909 pb que contiene el <i>dsrP</i>	33
Figura 16.- Secuencia aislada del genoma de <i>L. mesenteroides</i> IBT-PQ.....	35
Figura 17.- Representación esquemática de la organización estructural de la <i>DsrP</i>	45
Figura 18.- Dendograma de las glucosiltransferasas reportadas.....	46
Figura 19.-Alineamiento de los péptidos señal de las <i>DsrS</i> , <i>DsrC</i> , <i>DsrP</i> y <i>DsrT</i>	47

TESIS CON
FALLA DE CUBIERTA

Figura 20.- Alineamiento de las secuencias repetidas directas de la región variable de la DsrP.....	48
Figura 21.- Alineamiento de la DsrP y demás glucosiltransferasas reportadas	49
Figura 22.- Alineamiento de las secuencias repetidas de unión a pared celular putativas.....	53
Figura 23.- Alineamiento de la Rgg, RggD y la región previa a la DsrP	54
Figura 24.- <i>dsrP</i> amplificado por PCR con los oligonucleótidos PQ+15 y PQ-15	55
Figura 25.- Perfil de expresión de la DsrP en <i>E. coli</i> utilizando arabinosa como inductor	56
Figura 26.- Gel de actividad incubado con el reactivo de shift	56
Figura 27.- Geles de actividad.....	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Tabla comparativa de las glucosiltransferasas de <i>Streptococcus spp.</i> y de las dextranacarasas de <i>L. mesenteroides</i>	6
Tabla 2.- Tabla de oligonucleótidos utilizados	20
Tabla 3.- Tabla de construcciones y clonas obtenidas	25
Tabla 4.- Tabla de identidad entre la DsrP de <i>L. mesenteroides</i> IBT-PQ y las diferentes glucosiltransferasa reportadas	47
Tabla 5.- Residuos diferentes de la región catalítica entre la DsrP y DsrT5	51

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo aislar, caracterizar y expresar el gene (*dsrP*) que codifica para la dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ. El *dsrP* codifica para una proteína de 1454 residuos con una masa molecular de 160.5 kDa. Su estructura primaria es similar a las glucosiltransferasas reportadas en la literatura, presenta un péptido señal seguido de una región variable y de la región catalítica. Finalmente, el dominio de unión a polímero completa la proteína.

El análisis estructural de la DsrP mostró que dentro de la secuencia nucleotídica que codifica para el péptido señal presentó una región repetida inversa de 12 nucleótidos, los cuales pueden formar una horquilla. Dentro de la región variable se localizó una región integrada por siete secuencias repetidas seguidas. El dominio catalítico presentó los residuos considerados importantes en la catálisis Asp 473, Glu511 y Asp 589 (triada catalítica DED). Dentro del dominio de unión a polímero se localizaron diez secuencias repetidas directas, propias de este dominio; una más fue identificada al inicio de la región catalítica diferente a las del dominio de unión a polímero. Corriente arriba del *dsrP* se encontró una secuencia de 439 pb con una identidad del 21 % con el gene que codifica para el regulador *rgg* de la glucosiltransferasa GlTG de *Streptococcus gordonii*. Hasta el momento en el género *Leuconostoc* no se había reportado una región de este tipo.

La DsrP fue expresada en *E. coli* DH5 α donde se observó la producción de dextrana, la medición de actividad utilizando sacarosa como sustrato mostró bajos niveles de actividad, lo cual, puede ser debido a que la enzima no se encontró de manera soluble en el sistema heterólogo.

TESIS COM
FALLA DE CALIFICACION

PAGINACIÓN DISCONTINUA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AISLAMIENTO Y EXPRESION DEL GENE QUE CODIFICA PARA LA DEXTRANSACARASA DE *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ

I. INTRODUCCION

En la actualidad el uso de las glicosiltransferasas, enzimas capaces de transferir residuos de azúcar de una molécula donadora hacia una molécula aceptora rindiendo la formación de polímeros u oligosacáridos, es de gran interés ya que los procesos pueden ser específicos, escalables, menos costosos y los productos obtenidos son de gran interés en el área médica, farmacéutica y alimentaria. Entre las glicosiltransferasas más utilizadas se encuentran las glucosiltransferasa y fructosiltransferasas, enzimas que transfieren residuos de glucosa y fructosa respectivamente de una molécula donadora hacia una molécula aceptora. Dentro de las glucosiltransferasas se encuentra la dextrantransferasa, enzima capaz de transferir el residuo glucosilo de la sacarosa hacia una molécula aceptora formando un homopolímero de glucosas con enlaces (α 1 \rightarrow 6) llamada dextrana, el cual por sus propiedades reológicas se ha utilizado como sustituto de plasma sanguíneo así como en la elaboración de compuestos finos como el "sephadex". Debido a la importancia de esta familia de enzimas se tiene el interés de aislar y caracterizar enzimas nuevas a partir de fuentes tradicionales como lo son el pulque (una bebida tradicional mexicana fermentada del jugo de varios tipos de agave), que tengan mayor estabilidad y puedan rendir una mayor producción de polímero u oligosacáridos. Sin embargo, para poder entender y mejorar estos procesos es necesario abordar la parte estructural de las enzimas, campo donde las técnicas de biología molecular son imprescindibles ya que permiten aislar los genes que las codifican y en algunos casos se puede llegar a modificarlos con el objetivo de generar una mejor enzima o un modelo de estudio. Por lo anterior el presente trabajo tuvo como objetivo aislar y analizar el gene que codifica para la dextrantransferasa de *L. mesenteroides* IBT-PQ aislada del pulque, así como expresar la proteína en un sistema heterólogo como *Escherichia coli*.

II. GENERALIDADES

II.1. Dextrana y dextransacarasa

Las glucosiltransferasas son enzimas que catalizan la transferencia de un residuo de azúcar de una molécula donadora hacia una molécula aceptora, esta familia se divide en dos grupos: las Glucosiltransferasas, formado por la dextransacarasa, alternansacarasa, amilosacarasa y mutansacarasa y las Fructosiltransferasas formadas por la levansacarasa e inulosacarasa. Las glucosiltransferasas catalizan la transferencia del residuo glucosilo de la sacarosa hacia moléculas aceptoras sintetizando un polímero llamado glucano (figura 1), mientras que, las fructosiltransferasas transfieren el residuo fructosilo de la sacarosa hacia una molécula en crecimiento llamada fructana (Monsan y col. 1995., Quirasco y col. 2000).

Los glucanos producidos por las glucosiltransferasas están constituidos por residuos D-glucopiranosil, los cuales, difieren en tamaño, tipo de enlace y longitud de las ramificaciones (figura 2). El polímero sintetizado por la enzima dextransacarasa (DXS) conocido como dextrana, está constituido principalmente por enlaces α 1→6 en la cadena principal y puede llegar a presentar ramificaciones α 1→2, α 1→3 y α 1→4 (figura 2), las cuales dependen de la enzima y de la cepa productora. El polímero mutana sintetizado por la enzima mutansacarasa esta formado por unidades de glucosa con enlaces α 1→3 en la cadena principal, en tanto que, la enzima alternansacarasa sintetiza el polímero alternana, el cual, en su estructura principal presenta enlaces α 1→3 y α 1→6 de forma alternada (figura 2)(López-Munguía y col. 1993., Remaud-Simeon y col. 1994., Monchois y col. 1999., Sánchez-González y col. 1999).

La dextransacarasa (sacarosa: 1,6 α -D-glucan 6- α -D-glucosiltransferasa, EC 2.4.1.5) es producida por especies de los géneros *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Lactobacillus* (Alsop y col. 1983., Arcot y col. 2002). En el género *Leuconostoc* se requiere de sacarosa para inducir la expresión de la enzima, mientras que, en *Streptococcus spp.* se expresa de forma constitutiva (Neely y col. 1962., Hamada y col. 1986., Monsan y col. 2001). En el género *Streptococcus* las DXS han sido llamadas Glucosiltransferasas, estas enzimas han sido clasificadas en tres grupos, Glucosiltransferasas-Solubles, que

sintetizan un polímero de glucosas con mayor número de enlaces (α 1 \rightarrow 6). Glucosiltransferasas-Insolubles, que sintetizan un polímero con alto número de enlaces (α 1 \rightarrow 3) y Glucosiltransferasas Solubles-Insolubles que sintetizan una combinación de ambos polímeros soluble-insoluble (tabla 1) (Hanada y col. 1993., Funane y col. 2000).

La dextrana producida por *L. mesenteroides* NRRL B-512F fue uno de los primeros biopolímeros en ser producidos a nivel industrial desde 1948. Sus aplicaciones son importantes en el área alimentaria y farmacéutica. Por sus propiedades reológicas y osmóticas ha sido utilizada como sustituto de plasma sanguíneo (Arcot y col. 2002).

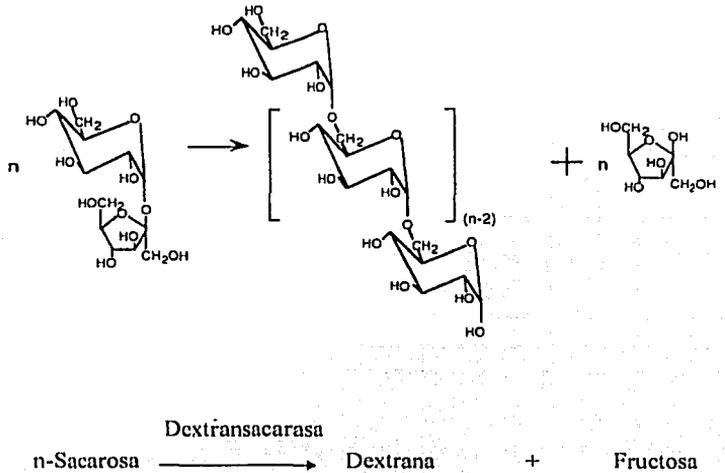


Figura 1.- Reacción de síntesis de dextrana.

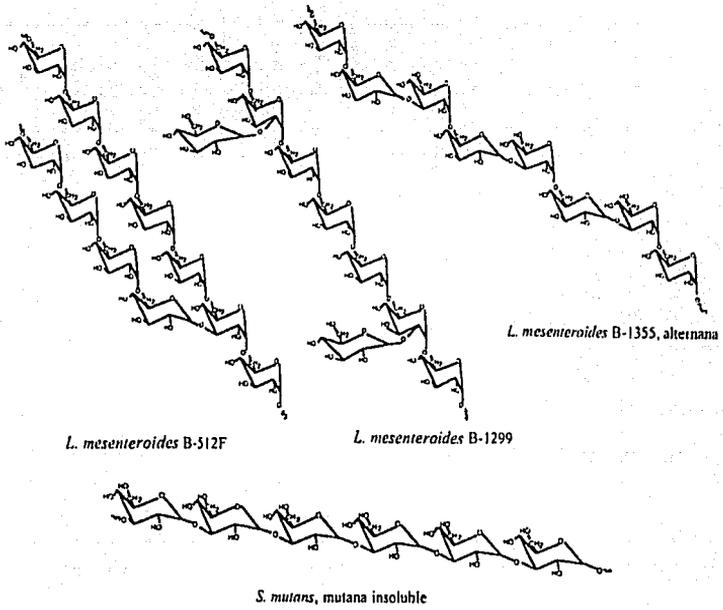


Figura 2.- Representación de las estructuras de los glucanos sintetizados por diferentes glucosiltransferasas de *Streptococcus* spp. y *L. mesenteroides*.

Tabla 1.- Tabla modificada de Monchois 1999., Arguello-Morales 2000 y Quirasco 2000 donde se comparan las glucosiltransferasas de *Streptococcus spp.* y las dextranasacarasas de *L. mesenteroides*.

Enzima	Peso molecular kDA	Tipo de polimero	Referencia
GfB	150	87% α (1-3) 13% α (1-6)	(Shioza, 1987)
GfC	150	85% α (1-3) 15% α (1-6)	(Ueda, 1988)
GfD	155	30% α (1-3) 70% α (1-6)	(Honda, 1990)
GfG	170	40% α (1-3) 60% α (1-6)	(Vickerman, 1997)
GfH	160	88% α (1-3) 22% α (1-6)	(Ferret, 1987)
GfJ	168	90% α (1-3) 10% α (1-6)	(Giffard, 1991)
GfK	176	100% α (1-3)	(Giffard, 1993)
GfL	157	50% α (1-3) 50% α (1-6)	(Simpson, 1995)
GfM	171	5% α (1-3) 95% α (1-6)	(Simpson, 1995)
GfS	147	10% α (1-3) 90% α (1-6)	(Gilmore, 1990)
GfT	163	27% α (1-3) 73% α (1-6)	(Hamada, 1993)
DsrA	146	15% α (1-3) 85% α (1-6)	(Monchois, 1996)
DsrB	167	5% α (1-3) 95% α (1-6)	(Monchois, 1998)
DsrE	313	10 α (1-3) 81 α (1-6)	(Bozonnet, 2002)
DsrS	170	5% α (1-3) 95% α (1-6)	(Wilke, 1989)
DsrD	165	Bajo % α (1-3) Alto % α (1-6)	(Neubauer, 2003)
DsrC	164	4% α (1-3) 96% α (1-6)	(Arguello, 2000)
DsrTS	164	α (1-3) α (1-6)	(Funari, 2000)
Asr	229	50% α (1-3) 50% α (1-6)	(Arguello, 2000)

11.2. Mecanismo de reacción

Pese a la gran cantidad de trabajos reportados sobre glucosiltransferasas el mecanismo de reacción aún no ha sido dilucidado en su totalidad. Las glucosiltransferasas catalizan la transferencia del residuo glucosilo proveniente del rompimiento de la sacarosa. El paso clave de la transferencia de los residuos glucosilo es la formación de un complejo covalente enzima-glucosa. Este paso involucra como en el caso de la familia 13 de las

glicosilhidrolasas, particularmente las α -amilasas, una tríada catalítica que consta de dos ácidos aspárticos y un residuo de ácido glutámico (MacGregor y col.1996., Devulapalle y col. 1997). De este complejo covalente enzima-glucosa el residuo glucosilo proveniente de la sacarosa es transferido a una serie de aceptores (Monsan 2001) como los siguientes:

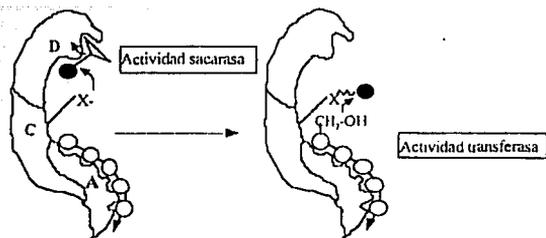
- Hacia la cadena de dextrana, transfiriendo una a una las unidades de glucosa.
- Hacia un carbohidrato o hacia un aceptor no azúcar produciendo un oligosacárido o un glucoconjugado respectivamente.
- Hacia una molécula de H_2O , dando lugar a la hidrólisis de la sacarosa.
- Hacia una molécula de fructosa, dependiendo del sitio de transferencia para sintetizar nuevamente sacarosa (proceso llamado intercambio isotópico), o bien, para producir leucrosa: α -D-glucopiranosil-1-5-D-fructopiranososa.

Para la síntesis de la cadena de dextrana se han propuesto dos mecanismos: un mecanismo de polimerización en el extremo no reductor y un segundo mecanismo de polimerización hacia el extremo reductor.

11.3. Elongación hacia el extremo no-reductor

La elongación hacia el extremo no reductor es similar al de las glicosidasas. Kobayashi y Matsuda en 1978 observaron que la glucoamilasa inhibía competitivamente la síntesis de glucano como consecuencia de la competencia entre la glucoamilasa y la DXS por el grupo glucosilo del extremo no reductor de la dextrana. de esta manera se comprobó que el crecimiento de las cadenas se realiza por el extremo no reductor (figura 3). Este mecanismo involucra la presencia de un ácido aspártico o un ácido glutámico que actúa como un grupo nucleofílico y otro residuo que actúa como un donador de protones. El grupo carboxilo puede hacer un ataque nucleofílico al C_1 de la glucosa de la sacarosa formando un complejo covalente enzima glucosa. El otro grupo ácido puede facilitar la liberación de fructosa por la donación de un protón al átomo de oxígeno involucrado en el enlace glucosídico. Este proceso permite también activar a otra molécula de glucosa por la retención del hidrógeno del grupo hidroxilo unido al C_6 . Si la biosíntesis del glucano sigue este mecanismo, la elongación ocurriría en el extremo no reductor de la cadena de glucano y sólo un complejo covalente enzima-glucosa sería necesario.

TESIS CON
FALLA DE COPIA



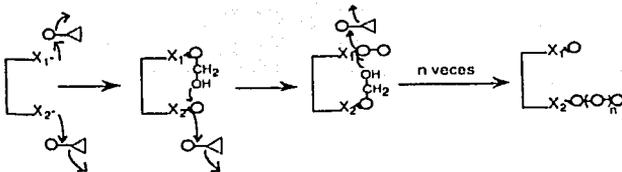
A: sitio de unión al aceptor; C: sitio catalítico; D: sitio de unión al donador; X: residuo catalítico (nucleófilo); ●: sacarosa; ○-○-○-○-○: dextrana (aceptor).

Figura 3.- Diagrama propuesto por Kobayashi y Matsuda (1978) para explicar el mecanismo de reacción de la dextrantransferasa.

II.4. Elongación hacia el extremo reductor

Un segundo mecanismo propuesto es la elongación de la cadena de glucano hacia el extremo reductor. Robyt y col. en 1974 propusieron un mecanismo que hasta la fecha es el más difundido ya que explica diversos fenómenos que ocurren en la reacción (figura 4). Este mecanismo propone la existencia de dos grupos nucleófilos en el sitio activo (X_1 y X_2). Estos grupos atacan a la sacarosa para producir un complejo con dos grupos glucosilo covalentemente unidos a los nucleófilos a través del C_1 . En pasos subsiguientes, el oxígeno del C_6-OH de una de las moléculas de glucosa del complejo realiza un ataque nucleofílico al C_1 de la glucosa vecina para formar enlaces α (1-6). Esto ocasionaría la liberación de uno de los dos nucleófilos, lo que le permitiría atacar a una nueva molécula de sacarosa para restaurar así el complejo entre la enzima y la molécula de glucosa. El grupo C_6-OH de la nueva glucosa incorporada atacaría al C_1 del grupo isomaltosil, formando un enlace α (1→6) adicional y dando lugar a un trisacárido. Durante la síntesis, los dos grupos catalíticos formarían alternadamente complejos covalentes con la glucosa y con la dextrana. La cadena de dextrana crecería por la inserción de glucosa entre el grupo catalítico y el extremo reductor del polisacárido. Con este modelo se eliminaría la necesidad de un iniciador. El proceso de crecimiento continúa hasta que la concentración de fructosa alcanza niveles tales que le permiten actuar como aceptor de la transferencia de cadenas de dextrana sola ó de la

unidad glucosilo unida al sitio activo, deteniendo el crecimiento del polisacárido o formando leucrosa respectivamente.



X_1 y X_2 , representan nucleófilos del sitio activo; \triangle representa sacarosa; \circ es un grupo glucosilo; \triangle es un grupo fructosilo y $-$ representa un enlace $\alpha(1-6)$

Figura 4.- Modelo propuesto por Robyt (1974) para explicar la síntesis de dextrana.

Robyt y Walseth en 1978 propusieron también un mecanismo para explicar las reacciones de aceptor. Se postula que un grupo hidroxilo del aceptor actúa como nucleófilo y desplaza tanto al grupo glucosilo como al grupo dextranosilo del sitio activo formando con ellos un enlace $\alpha(1-6)$. También proponen un mecanismo para las reacciones diferentes a la síntesis de dextrana, donde el modelo contempla la presencia de dos sitios de unión a sacarosa y otro de unión para aceptores (figura 5) (Tannriseven y Robyt, 1992). Esta conclusión fue derivada de observar que aceptores eficientes no inhibieron competitivamente la unión de la sacarosa. De esta manera se postuló la existencia de un sitio de unión para los aceptores, separado del sitio de unión a sacarosa. Se desconoce el número de sitios de unión a aceptores pero podría haber más de uno.

De acuerdo con Tannriseven y Robyt (1992) el sitio de unión a aceptores se encuentra entre los dos nucleófilos del sitio activo, de tal manera que la unión de un aceptor bloquea la inserción de una molécula de glucosa en la dextrana inhibiendo la síntesis del polisacárido y desviando las unidades de glucosa hacia la síntesis de productos de aceptor (figura 6). Los aceptores pueden también reaccionar con los grupos dextranosilo unidos al sitio activo deteniendo así la síntesis del polisacárido. Para explicar por qué la maltosa es el mejor aceptor se propone que en el sitio de unión a aceptores hay por lo menos dos subsitios. En el caso de las reacciones de ramificación, Tannriseven y Robyt (1992) proponen que la dextrana actúa como aceptor desplazando unidades de glucosa del sitio activo de la enzima para formar una ramificación, o bien, que pueda desplazar a

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

un grupo dextranosilo para formar una ramificación más grande, por lo que no se requiere de un sitio adicional para la formación de ramificaciones.

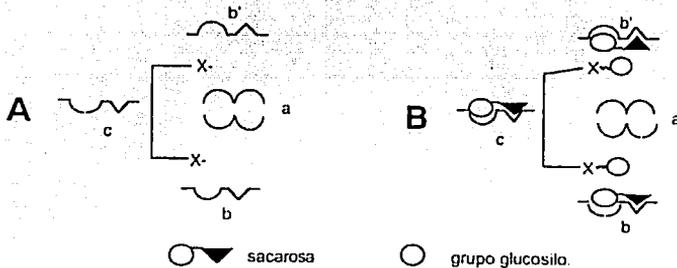


Figura 5.- Modelo estructural del sitio activo de la dextranosacarasa propuesto por Tanriseven y Robyt (1992). A.- La dextranosacarasa activa muestra un sitio de unión a aceptores (a), dos sitios de alta afinidad para sacarosa (b y b') y un sitio alostérico de unión a sacarosa de baja afinidad (c). B.- Enzima inhibida alostéricamente por una alta concentración de sacarosa, la conformación de la enzima cambia por lo tanto disminuye la síntesis de dextrana.

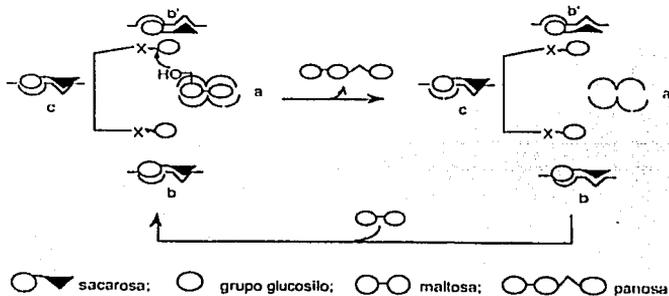


Figura 6.- Modelo propuesto por Tanriseven y Robyt (1993) para explicar las reacciones de aceptor. La enzima se encuentra alostéricamente inhibida y en presencia de maltosa produce el primer componente de la serie homóloga de oligosacáridos: panosa.

Se ha propuesto igualmente la existencia de un tercer sitio de unión a sacarosa de baja afinidad para explicar la inhibición por exceso de sustrato (Tanriseven y Robyt 1993), de tal manera que al haber un excedente de sacarosa este sitio es ocupado, ocasionando un cambio en la conformación de la enzima (figuras 5 y 6). De acuerdo con la propuesta

este cambio no afectaría la unión de moléculas de sacarosa ni la formación del complejo glucosil-enzima, ni disminuye la afinidad por los aceptores, sólo evita la interacción de los dos grupos glucosilo para la síntesis de dextrana.

11.5. ESTRUCTURA DE LAS DEXTRANSACARASAS

Gracias al desarrollo de nuevas técnicas en el campo de la biología molecular se han aislado genes de diferentes dextransacarasas (tabla 1), los cuales codifican enzimas de 165 kDa en promedio con una estructura muy similar entre sí (figura 7), presentan péptido señal, seguido de una región variable y de la región catalítica, una región altamente conservada entre estas enzimas de aproximadamente 900 aminoácidos (Funane y col. 1993., Shimamura y col. 1994). El dominio de unión a polímero completa estas enzimas, el cual está constituido por una región de entre 300 y 400 aminoácidos donde se presentan secuencias repetidas directa que se han sugerido participan en la unión del polímero (Monchois y col. 1999., Monsan, 2001).

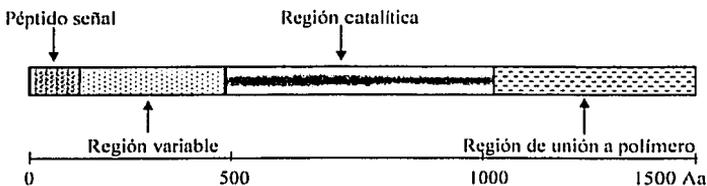


Figura 7.- Esquema estructural de las dextransacarasas.

11.5.1. Péptido señal

Las dextransacarasas presentan un péptido señal típico de bacterias Gram positivas de entre 35 y 39 aminoácidos (von Heijne y col. 1989) formado por una parte básica hacia el extremo amino seguida por una región hidrofóbica y más polar hacia el carboxilo del mismo (Izard y col. 1994). La región hidrofóbica es una región poco común en las glucansacarasas quienes por lo general son de naturaleza hidrofílica (Monchois y col. 1999).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

II.5.2. Región variable

Bozonnet y col. en el 2002 encontraron siete secuencias repetidas directas en la región variable de la DsrE que se localiza posterior al péptido señal, a las cuales en su conjunto llamaron motivo S. Este tipo de organización se encontró también en la DsrT de *L. mesenteroides* B-512 F al cual llamaron motivo T. Anteriormente la región variable se había considerado sin interés debido a que en las glucosiltransferasas reportadas no se encontraba esta organización y en estudios donde se elimina esta región la actividad de la enzima permanecía sin cambio (Abo y col.1991). Sin embargo, con los hallazgos recientes ha surgido el interés de investigar cual es la función de esta región.

II.5.3. Región catalítica

La región catalítica es la porción siguiente a la región variable, abarca parte del extremo amino y toda la porción central de la DXS, está constituida por una región de aproximadamente 900 residuos. Dentro de esta región se encuentran los residuos conocidos como tríada catalítica que en *S. downei* Mfe 28 corresponden al Asp-437, Glu-475 y Asp-547 de la GtfS, los cuales se encuentran conservados en todas la glucosiltransferasas y que se ha visto son importantes en la catálisis (Monchois y col. 1999).

Mooser y col. en 1991 aislaron un péptido de la GtfI y GtfS de *S. sobrinus* (Asp-Ser-Ile-Arg-Val-Asp-Ala-Val-Asp-), el cual, mediante espectrofotometría de masas reveló que el residuo interno del Asp realiza un enlace ester con el residuo glucosilo. Este péptido fue identificado a 449 aminoácidos del N-terminal de la Gtf-I. Estudios posteriores mostraron que al mutar este residuo inhibió la actividad DXS (Devulapalle y col. 1997). Mutaciones homólogas fueron realizadas en el Asp451Thr y Asp451Asn de la GtfB (Kato y col. 1992) así como el Asp453Asn de la GtfI de *S. downei* (Devulapalle y col. 1997), en todos los casos los cambios suprimieron la actividad DXS. Para *L. mesenteroides* el cambio de Asp551Asn en la DsrS también eliminó la síntesis de glucano y de oligosacáridos (Monchois y col. 1997).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Dentro del dominio N-terminal se han identificado otros residuos importantes, los cuales, al ser mutados dan lugar a un cambio en la actividad de la enzima. Por ejemplo, en la DsrS de *L. mesenteroides* NRRL B-512 F los cambios: Asp511Asn y Asp513Asn suprimen por completo la actividad de la enzima (Monchois y col. 1997) e His661Arg provocan una disminución considerable en la síntesis de glucano y oligosacáridos (Tsumori y col. 1997).

11.5.4. Región de unión a polímero

Posterior a la región catalítica se localiza la región de unión a polímero que consta de aproximadamente 500 aminoácidos. Dentro de esta región se localizan secuencias repetidas directas, las cuales han sido agrupadas en cinco clases: A,B,C,D y N de acuerdo a la secuencia que presentan (Monchois, 1997; Arguello, 2000). El número y disposición de estos elementos repetidos es específico de cada enzima.

A: WYFFNxDGQAAATGLQTIDGQTVFDDNGxQVKG

B: VNGKTYFFGSDGTAQTQANPKGQTFKDGSGVLRFFYNLEGQYVSGSGWY

C: DGKIYFFDPDSGEVVKNRfv

D: GGVVKNADGTYSKY

N: YYxAxQGxxxL

A partir del análisis de las secuencias de diferentes unidades repetitivas Giffar y Jacques (1994) propusieron que las unidades A,B,C y D provienen de una secuencia consenso "YG". Hasta el momento se desconoce con certeza la función de estas unidades, pero se sabe que si se eliminan una o varias de ellas puede alterarse la síntesis de glucano como es el caso de la DsrS de *L. mesenteroides* B-512 F a la cual se le borraron 85 aminoácidos del dominio C-terminal y disminuyó un 25% de la actividad inicial (Monchois y col. 1998). En contraste, la remoción de las tres unidades (A-C) de la GifG fueron responsables de disminuir la actividad en un 85 % (Vickerman y col. 1996). Von Eichel-Streiber y col. en 1992 realizaron una predicción de la estructura secundaria de las unidades repetidas de las glucosiltransferasas de *S. mutans* y sugirieron que las unidades repetidas directas pueden adoptar la estructura de un bolsillo de unión funcional. Sin embargo, se desconoce su modelo tridimensional.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

II.6. DsrT, una dextransacarasa truncada

Por su capacidad de sintetizar dextrana soluble y lineal a partir de la DsrS la cepa de *L. mesenteroides* NRRL B-512 F ha sido la más estudiada del género *Leuconostoc*. Sin embargo, en esta misma cepa se encontró una DXS truncada, la DsrT (Funane y col. 2000), esta proteína de 112 kDa es codificada por el gen *dsrT*, el cual, al parecer sufrió una pérdida de cinco nucleótidos al final de la región catalítica por lo que la proteína carece de todo el dominio de unión a polímero y la enzima no presenta actividad transferasa, únicamente una escasa actividad hidrolítica. Al corregir este error con los nucleótidos CAGAT, los cuales se dedujeron a partir de alineamientos con otras GTTs se logró sintetizar una proteína de 164 kDa, la DsrT5 que ya presenta actividad transferasa. El análisis del polímero sintetizado mostró que es insoluble ya que en su estructura presenta un 50 % de enlaces (α 1 \rightarrow 6) y un 40 % de enlaces (α 1 \rightarrow 3) (Funane y col. 2002).

Recientemente el National Center for Biotechnology USA dio a conocer la secuencia genómica de *L. mesenteroides subsp. mesenteroides* ATCC 8293, en donde se localizaron tres secuencias que aparentemente codifican para dextransacarasas: L. mes. 0847, 1684 y 0792, las cuales por alineamiento se observó son diferentes, pero no han sido caracterizadas. La secuencia L. mes. 1684 del genoma reportado tiene un 98 % de identidad con la DsrT5. Sin embargo, en la cepa secuenciada esta proteína no se encuentra truncada por lo que se supone si presenta actividad.

II.7. Predicción de la estructura terciaria de las dextransacarasas a partir del N-terminal

Hasta el momento se carece de la estructura tridimensional de alguna de las glucosiltransferasas, sólo se han realizado predicciones de su estructura terciaria. Estudios de predicción de estructura secundaria del dominio N-terminal realizados por MacGregor y col.1996, y Devulapalle y col. 1997 mostraron que las glucansacarasas poseen una estructura de barril (α/β), parecida a las glicosidasas (incluyendo las α -amilasas), ciclodextrin glucanotransferasas (CGTasa), isoamilasa y glucano glicosidasas de *S. mutans*. Este motivo se caracteriza por la presencia de 8 cadenas β -

plegadas (E1-E8) localizadas en el interior de la proteína alternadas con 8 α -hélices (H1-H8) localizadas en la superficie de la enzima. La predicción de estas estructuras sugiere que el ácido aspártico involucrado en el complejo glucosil-enzima puede estar localizado cercano al C-terminal final de E4. Sin embargo, la localización de H1-H3 no es idéntica para las predicciones realizadas. MacGregor y col. en 1996 propusieron que en las glucansacarinas ocurrió una permutación circular de estos elementos: la hélice N11₂ terminal puede ser el elemento H3 y los siguientes elementos E1-H1-E2-H2-E3, pueden estar lejos y fuera en la secuencia, en lugar de estar localizados en el principio. Según Devulapalle, estos primeros elementos pueden estar localizados en la región variable de las glucansacarinas.

11.8. Regulación de las dextransacarinas

Pese a la gran cantidad de glucosiltransferasas reportadas la regulación de las mismas es un campo poco conocido, principalmente en el género *Leuconostoc*. Dentro del género *Streptococcus*, particularmente en el gene *gfg* de *S. gordonii* se ha observado que es regulado positivamente por el gene *rgg*, el cual, se encuentra localizado río arriba del gene *gfg* (Sulavik y col. 1996., Vickerman y col. 2002., Vickerman y col. 2003). Este gene codifica para una proteína citoplásmica de un peso molecular de 34 kDa. Estos autores observaron que la transcripción del gene *gfg* es policistronica *rgg-gfg* y al bloquear la secuencia entre el *rgg* y el de la *gfg* con la inserción de una secuencia externa se observó que la actividad de la glucosiltransferasa disminuía y al complementarla con la secuencia correcta se reestablecía la actividad. Genes similares al *rgg* han sido descritos en *S. sanguis*, *S. oralis* y *Lactococcus lactis* (Vickerman y col. 2002), donde se ha observado que regulan de manera positiva la transcripción de genes aledaños que codifican para proteínas extracelulares. También se ha observado que los genes regulados son precedidos por secuencias de ADN invertidas repetidas, las cuales se sugieren como sitios de unión de factores de regulación. Sin embargo, hasta el momento no existe una secuencia consenso de esta región con una longitud definida, o bien, regiones promotoras cercanas conservadas. En *S. gordonii* además del *rgg* se ha localizado otro gene del tipo *rgg*, el *rggD* localizado río abajo de la *GfG* en la cadena complementaria, este gene codifica para una proteína citoplásmica de 33.6 kDa, con un 42 % de identidad con el *rgg* localizado río arriba de la *GfG*. Sin embargo, no se ha

comprobado que participe en la transcripción de la GtfG, pero se sugiere que puede regular genes distales (Vickerman y col. 2001).

11.9. *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ

Dentro del laboratorio de biocatálisis del IBT-UNAM se aisló una cepa de *L. mesenteroides* del pulque, una bebida tradicional fermentada del jugo de varios agaves, (principalmente *Agave atrovirens*) que por siglos se ha elaborado y consumido en México (Larios 1996), la cual se denominó IBT PQ. Esta cepa produjo polímero cuando se inoculó en medio de cultivo con sacarosa, más tarde se observó que este polímero era sintetizado por una dextranasa de 166 kDa. Chellapandian y col. en 1998 observaron que esta enzima se encontraba de manera insoluble asociada a la pared celular, lo cual no era común en esta familia de enzimas ya que se habían descrito como extracelulares. Al caracterizar la enzima se observó que producía una mayor cantidad de oligosacáridos (6 %) en comparación con la cepa de *L. mesenteroides* NRRL B-512 F. Por otro lado, al analizar el polímero se observó que presenta enlaces α 1 \rightarrow 6 y enlaces α 1 \rightarrow 3 en una relación 4:1 respectivamente, el cual era también diferente al sintetizado por la B-512 F. Estas características evidenciaban que se trataba de una enzima diferente a la DsrS de la cepa B-512 F. Sin embargo, se desconocían las características estructurales de esta enzima por lo que nos planteamos los siguientes objetivos.

III. OBJETIVOS

Objetivo general:

Aislar y caracterizar el gene que codifica para la dextranasa de *L. mesenteroides* IBT-PQ y expresarlo en un sistema heterólogo.

Objetivos particulares:

- Aislar el gene que codifica para la dextranasa (*dsrP*) de *L. mesenteroides* IBT-PQ.
- Caracterizar el gene *dsrP* de *L. mesenteroides* IBT-PQ.
- Expresar el gene *dsrP* en *E. coli*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IV. MATERIALES Y METODOS

IV.1. Cepas bacterianas

Se trabajó con la cepa de *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ, la cual se cultivó en el medio *L. mesenteroides* (LM) a 30° C y 200 rpm.

La cepa hospedera de las construcciones realizadas fue *E. coli* DH5 α con el genotipo: $\Delta(mcrA)183$, $\Delta(mcrCB-lsdSMR-mrr)173$, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyeA96*, *relA1*, *lac*, [F' *proAB*, *lacI* Δ M15, Tn10 (*tet*)] la cual se cultivó en el medio Luria-Bertani (LB).

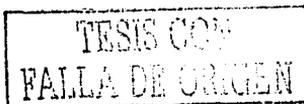
IV.2. Medios de Cultivo

Medio de cultivo de *L. mesenteroides* (LM):

Reactivos	Concentración gr/l
Sacarosa ó glucosa	20
Extracto de levadura	20
K ₂ HPO ₄	20
MgSO ₄ -7H ₂ O	0.2
CaCl ₂ -2H ₂ O	0.05
FeSO ₄	0.01
MnSO ₄ -7H ₂ O	0.01
NaCl	0.01

Medio LB:

Reactivos	Concentración gr/l
Extracto de levadura	5
Peptona de Casefna	10
Cloruro de sodio	10



El medio LB fue suplementado con 15 gr/l de agar para preparar medio sólido; como presión selectiva de los cultivos se utilizaron 200 µg/ml de ampicilina y/o 50 µg/ml de Kanamicina.

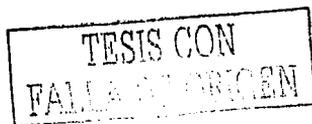
IV.3. MANIPULACIÓN DEL ADN

IV.3.1. Purificación del ADN cromosomal de *L. mesenteroides* IBT-PQ:

Se partió de un cultivo de 5 ml crecido toda la noche con *L. mesenteroides* en el medio de cultivo previamente descrito. Se colectaron las células a 3500 rpm 10 min y se lavaron con 1 ml de T/E 50:20-RNAsa 10 mg/ml, posteriormente, se resuspendieron en 450 µl de la misma solución. Se adicionaron 50 µl de lisozima a 10 mg/ml y se incubó 30 min a 37° C. transcurrido este tiempo se adicionaron 5 µl de Proteinasa K a 20 mg/ml y se incubó 15 min a 37° C, se agregaron 50 µl de SDS 10% incubándose por espacio de 30 min a 37° C. Seguido a lo anterior se agregó 100 µl de NaCl 5M, se agitó por inversión y se incubó 5 min a 65° C, posteriormente se adicionaron 80 µl de CTAB/NaCl, se mezcló por inversión y se incubó 10 min a 65° C. Pasado el tiempo de incubación se realizó una extracción con un volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1 v/v), se agitó por inversión y se centrifugó 10 min a 14,000 rpm (en cada extracción se removió el volumen superior de la capa interfásica que se formó). Se realizaron dos extracciones con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (24:24:1 v/v) y una más con cloroformo/alcohol-isoamílico (24:1 v/v). Después de las extracciones se incubó con un volumen de isopropanol por espacio de 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó 15 min a máxima velocidad, posteriormente se lavó la pastilla dos veces con 1 ml de etanol al 70 %, finalmente se resuspendió en 50 µl de H₂O estéril.

IV.3.2. Purificación de plásmidos:

La purificación de los plásmidos de las construcciones realizadas se hizo utilizando el "Kit Concert Rapid Plasmid Miniprep System" de Gibco BRL siguiendo las instrucciones del fabricante.



IV.3.3. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados (tabla 2) fueron sintetizados por la unidad de síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM mediante el método del Fosfito-Triéster en fase sólida.

Tabla 2.- Tabla de oligonucleótidos utilizados.

Oligonucleótidos	Secuencia (5' → 3')	Longitud
Utilizados en la obtención de una sonda		
PQ +1	AAAT-GAT-RTT-GAT-AAAT-TCA-AAAT-CCA	24 amero
PQ -1	ARC-ATA-ACG-ATC-ARY-AAA-AGC-ATA	24 amero
Utilizados en el PCR-Inverso del extremo 3'		
PQ +3	GAG-TTG-GGG-AAAT-TAC-GAA-CTT-CG	23 amero
PQ -3	CAT-ATT-CAG-CTT-CTG-TGG-TTG-GTG	24 amero
Utilizados en el PCR-Inverso del extremo 5'		
PQ +10	GAT-AGT-GAT-GTC-TCA-CAA-AGC	21 amero
PQ -4	AAG-TTT-AAC-AAG-TAA-TAC-ATC-CC	23 amero
Utilizados en la secuenciación del gene completo		
PQ +2	GGC-TTA-TCA-CCA-ACG-ATG-GAC	21 amero
PQ +5	CGG-AGA-ATA-TCA-GGC-ACT-ATA	21 amero
PQ -6	CGG-TTA-GCT-TTT-AAAT-CAG-CTC-TCC	24 amero
PQ -7	AAG-RAT-GAC-CAT-GTC-CAT-CTG	21 amero
PQ -8	TAC-CAT-AAAT-GAT-CGA-CTG-GTG	21 amero
PQ +9	GGG-CAC-AAG-CAT-ATC-CAA-TAC	21 amero
PQ -10	ACA-GAA-CTT-GAC-CCA-GAT-GTG	21 amero
PQ +11	CTT-GTT-TCC-AAA-GCG-CTA-ATC	21 amero
PQ -12	GTG-CTG-CTT-TAT-TCA-AGG-CAT	21 amero
PQ +13	CAA-TTT-TTG-ACG-ATC-AGT-GTC	21 amero
PQ -13	TTG-TGC-CAA-TGA-GCT-CAC-ATC	21 amero
PQ +14	TAG-TCA-CTT-ATG-TCA-GAG-AGG	21 amero
PQ-14	GAC-TAA-GAA-TAC-TTT-GTC-AGC-A	22 amero
T3	ATT-AAC-CCT-CAC-TAA-AGG-GA	20 amero
T7	TAA-TAC-GAC-TCA-CTA-TAG-GG	20 amero
Utilizados en la amplificación de la DXS para el ensayo de expresión		
PQ +15	AGA-AAAT-AGA-AAAT-GTA-ACA-AGC-GT	23 amero
PQ-15	GCT-TTT-AAAT-CAG-CTC-TCC-AGA	21 amero

IV.3.4. Amplificaciones por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Todas las amplificaciones, incluyendo los ensayos de PCR-Inverso y PCR en colonia se realizaron en un equipo "Robo cycler gradient 96" (Stratagene), en un volumen de reacción final de 100 μ l. Para las amplificaciones de la sonda, PCR-Inverso y PCR en colonia se utilizó la enzima "Taq-Polimerasa" (Invitrogen). En las amplificaciones de los productos clonados en los vectores Topo-XI y Topo-TA, así como, la amplificación del gene completo y la amplificación del gene para los ensayos de expresión de la DXS se utilizó la enzima "Elongasa Enzyme Mix" de Invitrogen.

Condiciones de reacción de las amplificaciones:

Enzima "Taq-Polimerasa"

Reactivos	Concentración
10 x PCR Buffer minus Mg	1X
10 mM c/u dNTPs	0.2mM
50 mM MgCl ₂	1.5mM
Primer 5'	0.5 μ M
Primer 3'	0.5 μ M
Templado	100ng
Enzima	2.0U
H ₂ O	----

Enzima "Elongase Enzyme Mix"

Reactivos	Concentración
10 mM c/u dNTPs	0.4mM
Primer 5'	0.5 μ M
Primer 3'	0.5 μ M
Templado	100ng
Buffer A y B (Mg)	1.5mM
Enzima	1U
H ₂ O	----

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Condiciones de amplificación para la enzima "Taq Polimerasa":

No. de ciclos	1 ciclo	35 ciclos	1 ciclo
Desnaturalización	94°C 10 min	94°C 1 min	
Alineamiento		(Temp.Var.)1 min	
Amplificación		72°C (Tiem.Var.)	72°C 15 min

Condiciones de amplificación para la enzima "Elongase Enzyme Mix":

No. de ciclos	1 ciclo	35 ciclos	1 ciclo
Desnaturalización	94°C 10 min	94°C 1 min	
Alineamiento		(Temp.Var.)1 min	
Amplificación		68°C (Tiem.Var.)	68°C 15 min

Las temperaturas de alineamiento y de extensión difirieron entre un PCR y otro dependiendo de la TM de los oligonucleótidos utilizados y de la enzima utilizada respectivamente. El tiempo de amplificación también difirió en cada ensayo dependiendo del tamaño del fragmento amplificado, para lo cual, se consideró 1min por cada 1000 pb.

IV.3.5. Secuenciación de los productos amplificados

La secuenciación de los productos amplificados se realizó en la unidad de secuenciación del IBT-UNAM mediante el método "Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing" en un equipo "Perkin Elmer/Applied Biosystems" modelo 377-18E1.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IV.4. Ensayos Southern blot

IV.4.1. Digestión del ADN cromosomal

Las digestiones totales del ADN cromosomal de *L. mesenteroides* IBT-PQ se realizaron con enzimas de restricción de las compañías New England Biol.Labs Inc. y Roche. Para cada ensayo de digestión se utilizó 1 µg de ADN cromosomal. Las concentraciones finales de reacción fueron: buffer correspondiente 1X, en los casos que la enzima lo requirió se adicionó BSA 1X, enzima 3 UI en un volumen final de 50 µl. Se incubaron por 16 hrs a la temperatura que especifica el fabricante para cada enzima.

IV.4.2. Hibridizaciones

Las muestras a hibridar se transfirieron a una membrana de Nylon (Amersham) y se fijaron, posteriormente la membrana se incubó en una solución de SSC 5X, SDS 0.5 %, Denhardt 5X por espacio de 2 hrs a 65 °C. Pasado el tiempo de incubación, se adicionó el ADN-sonda desnaturalizado marcado radioactivamente con 5 µCi de [³²P] dCTP y se incubó 16 hrs a la misma temperatura. Para el marcaje de la sonda se utilizó el "Kit rediprime ¹⁸ II" de Amersham Pharmacia Biotech UK. Una vez transcurrido el periodo de hibridización se lavó la membrana dos veces con la solución de lavado SSC2X-SDS 0.1% y se colocó en una pantalla de autorradiografía por 12 hrs, al final se reveló utilizando el equipo "Phosphorimager".

IV.5. PCR-Inverso

Esta técnica se basa principalmente en una reacción de amplificación por PCR, pero difiere en la utilización de un DNA molde previamente circularizado, proveniente de una digestión total y ligado aleatoriamente con una ligasa. Los oligonucleótidos utilizados en la amplificación es otro de los elementos particulares de esta reacción, los cuales, son divergentes entre sí y al aparearse sobre el ADN molde previamente circularizado sintetizan el mismo templado pero de forma lineal (figura 8).



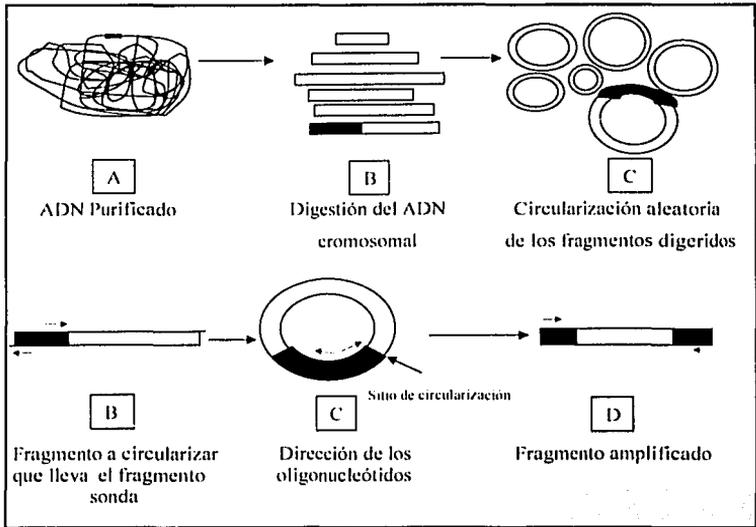


Figura 8.- Representación esquemática del PCR-Inverso.

IV.6. Clonación de los productos de amplificación

El fragmento sonda se clonó en el vector TOPO TA. Los Productos amplificados por PCR-Inverso se clonaron en el vector TOPO XL. Para el ensayo de expresión de la proteína el gene completo se clonó en el vector pBAD/TOPO ThioFusion Expresión. (tabla 3) Todos los vectores utilizados fueron de Invitrogene, para cada ensayo de clonación se siguió el protocolo de la compañía fabricante.

La selección de la clona que contenía el inserto de interés de cada ensayo de clonación se realizó mediante PCR en colonia, donde una colonia fue diluida en la reacción de PCR en lugar de adicionar ADN purificado. Previo a la amplificación se calentó la muestra a 95° C por 5 min. posteriormente se siguió con las condiciones de amplificación previamente descritas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 3.- Tabla de construcciones y clonas obtenidas.

Construcción	Clona obtenida	Especificaciones de la clona obtenida
PQ-Sonda	E.C.PQ-Sonda	Contiene la región central del <i>dsrP</i>
PQ-3'	E.C.PQ-3'	Contiene la región final del <i>dsrP</i>
PQ-5'	E.C.PQ-5'	Contiene la región inicial del <i>dsrP</i>
TOPO-PQ	E.C.TOPO-PQ	Contiene el gene <i>dsrP</i> y regiones adyacentes a:
pBAD-PQ	E.C.pBAD-PQ	Presenta el <i>dsrP</i> a partir del 2do codon

IV.7. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA

IV.7.1. Perfil de expresión

A la clona E.C.pBAD-PQ se le realizó el perfil de expresión de la proteína utilizando diferentes concentraciones de arabinosa: 0.00002 %, 0.0002 %, 0.002 %, 0.02 %, 0.2 %, la cual, es el inductor del sistema pBAD/TOPO Thiofusion, para este ensayo se siguió el protocolo de la casa comercial.

IV.7.2. Expresión de la proteína DsrP

Se inocularon 5 ml de medio LB-Ampicilina 50 µg/ml con la E.C.pBAD-PQ y se incubó 16 hrs. Al termino del cultivo se tomaron 2 ml del mismo con los cuales se inoculó 100 ml de medio fresco, se dejó en incubación hasta alcanzar una D.O. de 0.5. En este momento se tomó una alícuota de 10 ml, la cual, se utilizó como control. El cultivo restante se indujo con arabinosa a una concentración final de 0.02 % y se incubó por cuatro horas más. Al terminó del cultivo se colecto el paquete celular por centrifugación a 6000 rpm 5 min y se lavó dos veces con solución amortiguadora de Acetatos 50 mM pH 5.2. Posteriormente, se resuspendió en 1 ml de la solución anterior suplementada con Tritón 1 %, ésta muestra se sonicó 10 seg y se centrifugó 30 min a 10,000 rpm y 4° C, se separó el sobrenadante del resto celular y este último también se resuspendió en 1 ml de la misma solución. Las muestras se mantuvieron a 4° C hasta ser procesadas. Para la muestra control se siguió el mismo procedimiento.

TESIS CON
FALLA DE CUBIERN

Gel de Poliacrilamida-SDS

Las proteínas obtenidas del perfil con arabinosa así como las células y el sobrenadante de la clona sonicada fueron analizadas en geles de Poliacrilamida-SDS a 40 mA por 2 hrs a 4° C. Para el gel de actividad y tinción con Base de Shift se siguió el mismo procedimiento, las concentraciones del gel son las siguientes:

Gel Concentrador:

Reactivos	Volúmenes	Concentración final
Acrilamida 30%-Bis-acrilamida 1 %	335 µl	4 %
Buffer Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	625 µl	0.125 M
SDS 10%	25 µl	0.1 %
H ₂ O	1.5 ml	---
Persulfato de Amonio 10%	12.5 µl	0.05 %
TEMED	2 µl	0.08 %

Gel Separador:

Reactivos	Volúmenes	Concentración final
Acrilamida 30%- Bis-acrilamida 1 %	1 ml	6 %
Buffer Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	1.5 ml	0.45 M
SDS 10%	50 µl	0.1 %
H ₂ O	2.5 ml	---
Persulfato de Amonio 10%	50 µl	0.1 %
TEMED	5 µl	0.1 %

Tinción con azul de Coomassie: una vez corrida la electroforesis el gel se tiñó con una solución de azul de Coomassie, el exceso de colorante se retiró con solución destañidora.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Geles de Actividad: posterior a la electroforesis los geles se lavaron dos veces con una solución de acetatos 50 mM pH 5.2 - Tween 80 1% por espacio de 30 min c/u, más tarde, se incubaron 16 hrs a 30° C en el mismo buffer suplementado con 10% de sacarosa. Una vez observado el gel de actividad se incubó en buffer de acetatos 50 mM pH 6.0-Dextranasa 0.06 U/ml a 37°C por 24 hrs.

Tinción con el reactivo de Shift: la tinción se realizó sobre el gel de actividad previamente incubado con sacarosa, el cual fue sometido a un tratamiento con etanol 75 % por 30 min, posteriormente se incubó 1 hr en ácido periódico 0.7 %-ácido acético 5 % y se le realizaron tres lavados con metabisulfito de sodio 0.2 %-ácido acético 5 % 20 min c/u, finalmente se puso en contacto el gel con el reactivo de Shift.

IV.7.3. Incubación del gel de actividad con dextranasa

Una vez incubado el gel de actividad con sacarosa se lavó dos veces con solución acetatos 50 mM pH 5.2. 15 min c/u, posteriormente se incubó en buffer acetatos 50 mM pH 6.0 suplementado con dextranasa (SIGMA) a 0.06 U/ml por espacio de 12 hrs.

IV.7.4. Medición de actividad de la proteína recombinante

La medición de actividad de la proteína recombinante se realizó midiendo los azúcares reductores liberados mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) descrito por Sumner y col. en 1953 en un medio de reacción que contenía 10 % de sacarosa, solución acetatos 50 mM pH 5.2 a 30° C y la enzima. La determinación de actividad se realizó tanto en los restos celulares como en el sobrenadante del paquete celular sonificado, ambos provenientes del cultivo inducido con arabinosa. Una unidad de actividad dextranasa se reporta como la cantidad de enzima que libera una μ mol de D-fructosa por minuto.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IV.7.5. Cuantificación de la proteína

La medición de la proteína se realizó por el método Bradford mediante el kit Bio-Rad (Hércules, CA) y se utilizó albúmina sérica bovina (Fracción V, SIGMA) como estándar.

IV.8. Análisis de las secuencias:

Los análisis de comparación de secuencias (Blast) se realizaron utilizando el Software "Translated query-Protein db blastx" del National Center for Biotechnology Information U.S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894.

Para la determinación de los marcos de lectura abiertos se utilizó el programa "Open Reading Frame Finder" del National Center for Biotechnology Information U.S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894.

La identificación del péptido señal se realizó mediante el software "SignalP World Wide Web Server V1.1." de la The Danish National Research Foundation.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

V. RESULTADOS

V.1. Aislamiento del gene *dsrP* de *L. mesenteroides* IBT-PQ

El aislamiento del gene que codifica para la DXS de *L. mesenteroides* IBT-PQ (*dsrP*) se desarrolló en tres etapas. En la primer etapa se realizó un alineamiento de diferentes glucosiltransferasas, del cual, se diseñó un par de oligonucleótidos con los que se amplificó la región central del gene. En la segunda y tercer etapa se aislaron las regiones 3' y 5' del gene respectivamente, ambas por PCR-Inverso.

V.1.1. Aislamiento de la región central del gene *dsrP*

Se realizó un alineamiento de diversas GTFs reportadas en la literatura, del cual se diseñaron los oligonucleótidos degenerados PQ+1 y PQ-1, con los que se logró amplificar un fragmento de 1505 pb sobre el ADN cromosomal de *L. mesenteroides* IBT-PQ (figura 9). De acuerdo al alineamiento, el producto amplificado fue del tamaño esperado, por lo que, se clonó en el vector TOPO-TA (PQ-Sonda) y se secuenció. La secuencia obtenida mostró una identidad del 94 % con el gene *dsrT* de *L. mesenteroides* B 512-F, el cual codifica para una DXS truncada y una identidad del 50 % con las GTFsas de *Streptococcus spp.* Del alineamiento con las DXS reportadas se dedujo que se tenía la parte central del gene y faltaban aproximadamente 1500 pb a cada extremo para tener el gene completo.

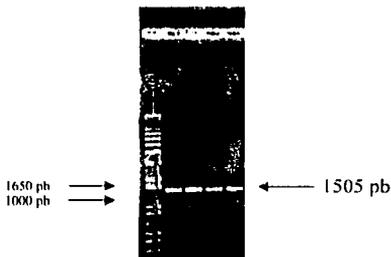


Figura 9.- Fragmento amplificado por PCR con los oligonucleótidos PQ+1 y PQ-1.

V.1.2. Aislamiento de la región final del gene *dsrP*

El aislamiento del extremo 3' del gene se realizó mediante PCR-Inverso, para lo cual, se determinó el patrón de restricción del fragmento amplificado (figura 10). Este fragmento se utilizó como sonda en ensayos Southern blot realizados con las enzimas de restricción: Eco RV, Sma I, Xho I, Sac I, Sal I, Cla I, Bam HI, Neo I, Kpn I, Pst I, Hind III y Xba I. Al comparar los resultados de los ensayos de southern blot con el patrón de restricción del fragmento observamos que la enzima ClaI cortó el fragmento a los 300 pb dividiéndolo en dos, uno de 300 pb y otro de 1200 pb, mientras que, la señal de hibridización con esta misma enzima se observaba en dos fragmentos, uno de 3.5 Kb y otro de 300 pb (figura 11), estos resultados nos sugirieron que, dentro del fragmento de 3.5 Kb estaba contenido el fragmento de 1200 pb que se observaba en el patrón de restricción, el cual, tenía una orientación hacia el extremo 3'. Con lo anterior era posible obtener la parte final del gene mediante PCR-Inverso.

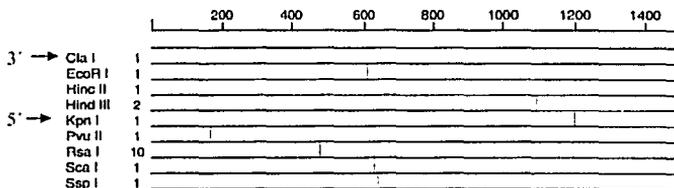


Figura 10.- Mapa de restricción del fragmento amplificado con los oligos PQ+1 y PQ-1

Se digirió nuevamente ADN cromosomal de la IBT-PQ con ClaI y se circularizó con T4 ligasa. Con base en la secuencia del fragmento sonda se diseñaron los oligonucleótidos PQ+3 y PQ-3 con los cuales se logró amplificar un fragmento de 3.2 Kb (figura 12) sobre el ADN previamente circularizado, el producto de amplificación fue del tamaño esperado de acuerdo con el diseño realizado. Para confirmar la identidad de este fragmento se hibridizó contra el fragmento sonda dando como resultado una señal positiva con lo cual se confirmaba que este fragmento formaba parte del que ya se tenía. Este producto se clonó en el vector TOPO-XL (PQ-3') y se secuenció. La secuencia obtenida correspondía a la porción 3' del fragmento sonda y más allá del final del gene.

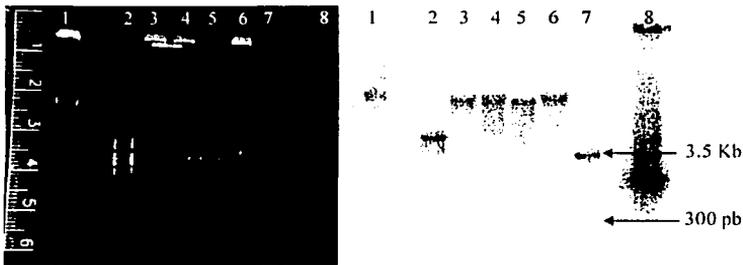


Figura 11.- Southern blot utilizando el fragmento de 1505 pb como sonda. 1.- ADN cromosomal IBT-PQ. 2.- EcoRV. 3.- Sma I. 4.- Xho I. 5.- Sac I. 6.- Sal I. 7.- Cla I. 8.- sonda.

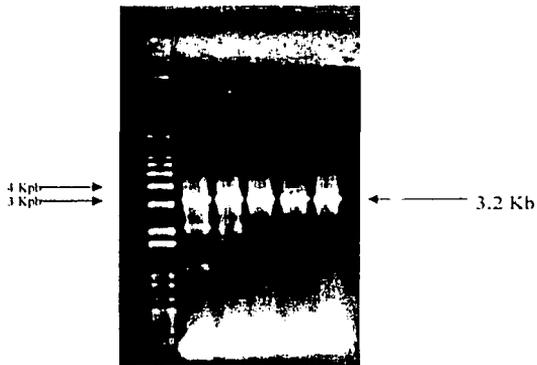


Figura 12.- Fragmento de 3.2 Kb amplificado por PCR-Inverso, el cual lleva la región final del *dsrP*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

V.1.3. Aislamiento de la región inicial del gene *dsrP*

El aislamiento del extremo 5' del gene *dsrP* fue muy similar a la obtención del extremo 3'; se siguió la metodología del PCR-Inverso pero ahora se utilizó la enzima *KpnI*. Como se observa en la figura 10, *KpnI* corta el fragmento sonda a los 1200 pb liberando otro fragmento de 300 pb. La señal del southern blot con *KpnI* (figura 13) mostró dos señales de aproximadamente 3.5 Kb y de 600 pb. Estos resultados sugirieron que, dentro del fragmento de 3.5 Kb estaba contenido el fragmento de 1200 pb que se observó en el patrón de restricción, el cual, estaba orientado hacia la región 5' de la sonda.

Se realizó una nueva digestión del ADN cromosomal de la IBT-PQ con *KpnI*, se circularizó y se utilizó como templado en un PCR-Inverso con los oligonucleótidos PQ+10 y PQ-4, los cuales, se diseñaron a partir de la secuencia del fragmento sonda. El resultado del PCR-Inverso fue la amplificación de un fragmento de 2.8 Kb (figura 14), el cual fue del tamaño esperado. Para confirmar que el fragmento amplificado formaba parte del gene se hibridizó contra el fragmento sonda, la hibridización fue positiva, por lo que se clonó en el vector TOPO-XL (PQ-5') y se secuenció.

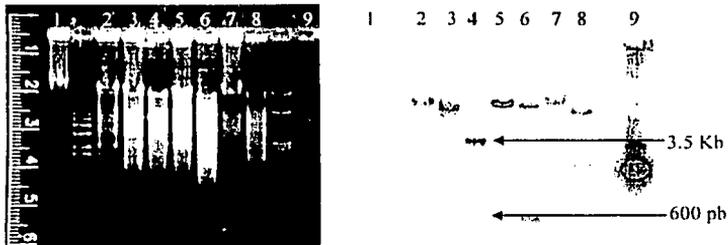


Figura 13.- Southern blot utilizando el fragmento de 1505 pb como sonda. 1.- ADN cromosomal IBT-PQ. 2.- Bam III. 3.- Nco I. 4.- *Kpn I*. 5.- Pst I. 6.- Hind III. 7.- Xba I. 8.- Eco RI. 9.- sonda.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

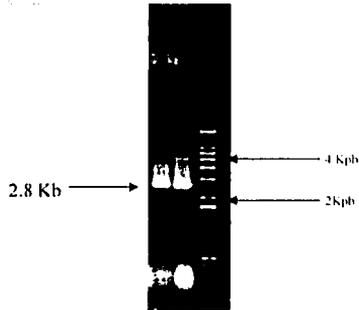


Figura 14.- Fragmento de 2.8 Kb amplificado por PCR-Inverso, el cual, contiene la región final del *dsrP*.

Una vez obtenida la secuencia que faltaba del gene *dsrP*, se diseñó el oligonucleótido PQ+11 y en combinación con el oligonucleótido PQ-10 se logró amplificar sobre el ADN cromosomal de la IBT-PQ un fragmento de 5909 pb (figura 15), el cual contenía todo el gene *dsrP*, éste fragmento se clonó en el vector TOPO-XL (TOPO-PQ).

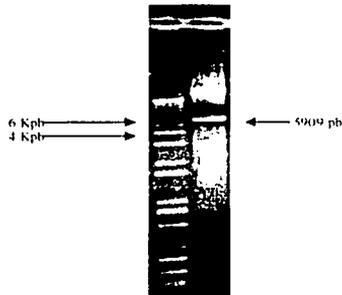


Figura 15.- Amplificación de un fragmento de 5909 pb dentro del cual esta contenido el *dsrP*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

V.2. Caracterización del gene *dsrP*

Se obtuvo una secuencia total de 5909 pb (figura 16) dentro de la cual se encontró el *dsrP* ubicado del nucleótido 1063 al 5427. El gene presentó un 37.7 % de G + C y se localizó una secuencia consenso del sitio de unión al ribosoma (RBS) AGGGA 8 nucleótidos arriba del codón de inicio ATG. La posible región promotora -10 y -35 se localizó 79 pb arriba del codón de inicio, la distancia entre estas regiones fue de 23 pb.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TAGCAATACTATAGGCGTGCCTAATTTTGTATTATTATGCTCAAACACCCCAGTCCAAA 60

— Posible Regulador —

ATAGTAGCCATGTTTGAAACTTGAAGTCATCGGTGTTAAATTTATATTTTTAACTTTAT 120

— Posible Regulador —

C TAGTAGATATCTCGTAAAGTCATCTTTTTGTGTATAATACTTGTTCCAAAGCGCTAA 180

— Posible Regulador —

TCAATATTTTGTTCACAATTTCAACGGATGCCGTAGGCATATTATTCGTAGCATACTGT 240

— Posible Regulador —

T AAGTATGTCAGATATATAAGGTATGCTTCTGTCAATATGTATCATGTTAACTACATTCG 300

— Posible Regulador —

CCAGTAAAAATAAGTCATAGAACTGCCAGTAACTAATATTA AAAAAGTAATCAATCAATT 360

— Posible Regulador —

CATTCTGATCGTCTATIGATGCGATTAGAAATCTAAGTGATACAAAAGTAGATAACGACA 420

— Posible Regulador —

T TAAATAATAATGACGCATGAATGGGTCGT TAGGATTCTTAATGGCATCAGTTTGAATA 480

— Posible Regulador —

ATTGTGTTAATTGATTCAATTTTTGACGATCAGTGTCTTGATAATATTGATCTAAAACAG 540

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TTGTCAGCTTTTTTAAGTTATTTTTTCCCGAAAAGACAGTTGAAAAATATTCTTCAAAT 600

GAAATATTTAGAGCGTTACACAGCAAAAGTACGGTGAATCAGTTGGTTCTGTTTTATTA 660

TTCTCTATTCTAGATACCATTGATTGTGAGCCAATTA AACACCTAATTGCTGTTGAGAT 720

ATTCCGCGTTTTCTGCCTAGTTCTTTGATAATAGATCTTTTTTTATTGTTTCATATTCCTT 780

ATTAACCTATAATTATTTAATATTTTATTTAAGAGCAACTATTTATTATATATTA AAAATA 840

ACCTTGATATTTTCTAATTATTTCAATTTCTGCATAATTTATTTTAAATATTTGTTTCATTA 900

TATATTAAGAGTTAATTTTAAATGATTAACGTTTGTAAAAACAATTGCTGACAAAAGTA 960

[- 35]

TTCTTAGTCGCAAAATGTTTATGATCTCACAAAGCACAAAATAACCATTTTACTCAAAGAATA 1020

[- 10]

GTCACCTTATGTCAGAGAGGGAAAAGAATGAAGGGAAGAAGTAAATGAGAAATAGAATGTA 1080

■ RBS ▶ ■ Peptido señal ■
M R N R N V

ACAAGCGTTTTCCGGAAAAAGATGTATAAATCTGGGAAAATGTTAGTCATTGCAGGAAGT 1140

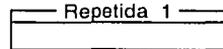
Peptido señal
T S V F R K K M Y K S G K M L V I A G S
Repetida Directa →

GTTTCGATAAATGGTGTTACCAGTTTTATTCAACAAGCACAAAGCTGATGTTTCACAAAAA 1200

Peptido señal →
V S I I G V T S F I O O A O A D V S O K

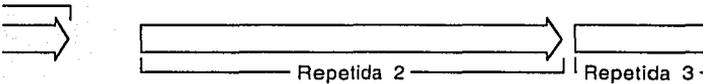
TESIS CO
FALLA DE ORIGEN

AATGGGGTAGTAGTAACCACAGCAGTCAATCAATCGAATTCGGATGCGACTACGACTGAT 1260



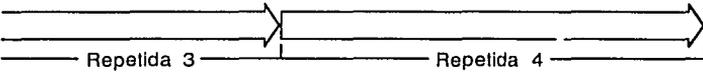
N G V V V T T A V N O S N S O A T T T D

AAATCAATCACAAACGAATGATAAGGCTACAACAACGGCCGATACATCAACGAATGATAAG 1320



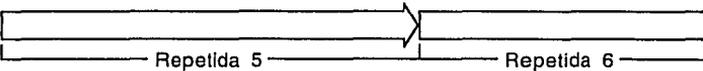
K S I T T N D K A T T T A D T S T N D K

GCTACAACAACGGCCGATACATCAACGAATGATAAGGCTACAACAACGGCCGATACATCA 1380



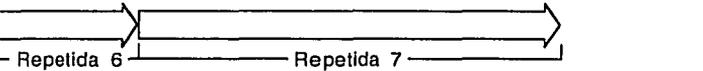
A T T T A D T S T N D K A T T T A D T S

ACGAATGATAAGGCTACAACAACGGCCGATATATCAACGAACAATAAGGCTACAACAACA 1440



T N D K A T T T A D I S T N N K A T T T

GCCGATACATCAACGAACAATAAGGCTGCAACAACAGCCGACACATCTGATAATAATAAT 1500



A D T S T N N K A A T T A D T S D N N N

TCAGCTACGACAAGCGATAAAGATGTGAGCTCATTGGCACAAAAAAGTCAAGCGATTGAC 1560

S A T T S D K D V S S L A O K S O A I D

AATAATTCGAAGACGACTGATACTGCTGCATCATTGGAAGCTAGTTCAAAGAACTGAAA 1620

N N S K T T D T A A S F E A S S K N L K

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ACGATTGATGGTAAAACATATTATTACGACGATAATGGTCAAATAAAAAAGAACTTTGCT 1680

————— Repetida Directa B —————

T I D G K T Y . Y Y D D N G O I K K N F A
ACCGTAATTGATGGTAAAGTACTTTATTTTGATAAAGATACTGGCGCATTAGCTGATACA 1740

• Repetida Directa B

T V I D G K V L Y F D K D T G A L A D T
AATGACTACCAATTTTTAGAAGGATTGACTAGTGAAAATAAATAATTATACGGAGCATAAT 1800

N D Y O F L E G L T S E N N N Y T E H N
GCCTCAGTTGGTACATCTTCTGCTAGTTATACAAACGTTGACGGGTATCTAACAGCCGAC 1860

A S V G T S S A S Y T N V D G Y L T A D
AGTTGGTACAGACCAAAGGATATATTTGTCAATGGCCAAAACGGGAATCATCAAAGGAT 1920

S W Y R P K D I F V N G O N W E S S K D
GACGATTTACGACCTTTGTTAATGACTTGGTGGCCAGATAAGGCAACACACGTAACATAT 1980

D D L R P L L M T W W P D K A T H V N Y
TTGAATGCGATGAAGTATTTAGATGCCACTGAAACGGAAACTGTTTATACTTCAGATGAC 2040

L N A M K Y L D A T E T E T V Y T S D D
AGTCAAGATGCCTTGAATAAAGCAGCACAAAACATTCAAGTGAAGATTGAAGAAAAAATT 2100

S O D A L N K A A O N I O V K I E E K I
AGTCAAGAAGTCCAAACACAAATGGCTCAAGGATGACATTTCAAATTTGTTGATAGCCAA 2160

S O E V O T O W L K D D I S K F V D S O
TCAAATTGGAAATATGCTAGTGAATCAAAGGAACTGATCATTGCAAGGTTGGTGCATTG 2220

S N W N I A S E S K G T D H L O G G A L
TTGTATGTCAATAGTGACAAAACACCAGATGCAAATTTCTGATTATCGATTACTTAATCGC 2280

L Y V N S D K T P D A N S D Y R L L N R

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ACACCAACAAATCAAACAGGCACGCCCTTTGTATACGACAGATCCAACCTCAAGGTGGTTAT

2340

T P T N O T G T P L Y T T D P T O G G Y
 GACTTCTCTTGGCCAATGATGTGGATAATTCTAACCCAGTTGTTCAAGCAGAACAATA

2400

Región Homóloga al Sitio Activo
 D F L L A N D V D N S N P V V O A E O L
 Oligo PQ+1

AATGGGATGTATTACTTGTTAAACTTTGGATCAATTACTAATAACGATGCAGATGCTAAC

2460

N G M Y Y L L N F G S I T N N D A D A N
 TTTGATAGTATTCGAGTGGATGCTGTCGATAACGTTGATGCCGACTTATTGCAAATTGCA

2520

Sitio de Unión a Sacarosa
 F D S I R V D A V D N V D A D L L O I A
 GCTGACTATTTAAGGCAGCATATGGCGTCGATAAGAGTGATGCAATTTTCAATCAACAT

2580

A D Y F K A A Y G V D K S D A I S N O H
 GTTTCATTCTTGAAGACTTGGAGTGACAATGATGCTGAATATGTGAAGACAATGGCGAC

2640

V S I L E D W S D N D A E Y V K D N G D
 AATCAAITATCGATGGATAATAAATTGCGTTTGTCATTAATAACTCACTCACTATGCCA

2700

N O L S M D N K L R L S L K Y S L T M P
 CCAGTCGATCATTATGGTAATAAAGAAGTGGATTAGAACCATTTTTGACAAATAGTTTA

2760

P V D H Y G N K R S G L E P F L T N S L
 GTAATCGTACAAATGATTGAGAGATAAACACTGCACAACCAAAATTATTCTTTTGTTTCGT

2820

V N R T N D S R D N T A O P N Y S F V R
 GCACATGATAGTGAAGTACAACAGTTATTGCTGAAATTTAAACAACGGATTGATCCG

2880

A H D S E V O T V I A E I I K O R I D P

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

GATTCTGATGGCTTATCACCAACGATGGACCAATTAACAGAAGCATTAAAAATTTATAAT 2940

D S D G L S P T M D O L T E A F K I Y N
GCTGATCAATGAAAACGGATAAAGAATTCACACAATATAACATTCCAAGTACTTACGCC 3000

A D O L K T D K E F T O Y N I P S T Y A
ACAAATTAACGAATAAAGATACAGTGCCACGTGTGACTATGGTGATATGTATACAGAT 3060

T I L T N K D T V P R V Y Y G D M Y T D
GATGGTCAATACATGGCAACAAAGTCACTTTATTACGATGCAATTGATACTTTGCTGAAG 3120

D G O Y M A T K S L Y Y D A I D T L L K
TCTCGTATCAAGTATGTTTCTGGCGGGCAAACAATGTCTATGAAATATATGCAAGGTGAT 3180

S R I K Y V S G G O T M S M K Y M O G D
AGTAGTATGGCTGCTGACAGTTATAGAGGCATTTTGACATCAGTTCGTTATGGTAATGGT 3240

S S M A A D S Y R G I L T S V R Y G N G
GCCATGACTGCTACCGATGCAGGGACAATGAAACACGTACGCATGGTATTGCAAGTAATI 3300

A M T A T D A G T N E T R T H G I A V I
GAAAGTAATAACCCAGATTTGAAGTTGAGCAGTACAGATCAAGTAGTTGTAGATATGGGC 3360

E S N N P D L K L S S T D O V V V D M G
ATAGCGCACAAAAACAGGCTTATCGTCTGCTTTGTTAACAACTAAAGATGGCATAGAT 3420

I A H K N O A Y R P A L L T T K D G I D
ACTTATGTATCTGATAGTGATGTCTCACAAAGCTTGATAAGATATACAATAGTAATGGG 3480

T Y V S D S D V S O S L I R Y T N S N G
CAACTTATTTTCAATAGTTCAGATATTGTTGGTACAGCAAATCCACAAGCTTCTGGATAC 3540

O L I F N S S D I V G T A N P O A S G Y
TTGGCGGTCTGGGTACCCGTTGGTGCTTCAGATACTCAAGATGCGCGAACTGAAAGTAGT 3600

L A V W V P V G A S D T O D A R T E S S

FECHA DE ORIGEN
 FECHA DE ORIGEN

AGCAACAGCAGTGTATTTTTGCCAAAGCAGTTGACGAATGAAGAATCAAACTGGATT 4380

S N S S V F L P K O L T N E E S N T G F
ATTTCAACTGATGGGGGGATGACATATTATTCTACAAGTGGATACCAGGCAAAAGATACA 4440

I S T D G G M T Y Y S T S G Y O A K D T
TTATCCAAGATGACAAATCTAATTGGTATTACTTTGACAAGAATGGTTATATGACATAC 4500

██████████ Repetida directa A ██████████
F I O D D K S N W Y Y F D K N G Y M T Y
GGTTCCAGACAGTCAATGATAATAATTATTACTTCTTGCTAATGGTATTGAATTACAA 4560

██████████ Repetida directa A ██████████
G F O T V N D N N Y Y F L P N G I E L O
GATGCTATCTTAGAAGATAGTAAAGGAGATGTGTATTATTTCATCAATATGGCAAACAA 4620

D A I L E D S K G D V Y Y F N O Y G K O
ACAATTGATGGGTATTATATGTTAGCTAATAAGACTTGGCGTTACTTTGACAAAAATGGT 4680

██████████ Repetida Directa A ██████████
T I D G Y Y M L A N K T W R Y F D K N G
GTTATGGCTAATGCCGATTAACAACAGTAACTGTTGATGGGCAGAAGCATATCCAATAC 4740

██████████ Repetida Directa A ██████████
V M A N A G L T T V T V D G O K H I O Y
TTTGATAAAAACGGTATCCAGGTCAAAGGGACTTCCGTGAAAGACGCAGACGGAAAGTTA 4800

██████████ Repetida Directa A ██████████
F D K N G I O V K G T S V K D A D G K L
CGTTACTTTGATACTGATTCTGGTGAAATGGTGACAAACCGCTTTGGTAAAAAACAGAT 4860

██████████ Repetida Directa A ██████████
R Y F D T D S G E M V T N R F G E K T D

RESIS CON
MILLA DE ORIGEN

GGTACATGGTCATACTTTGGTGCTGACGGTATCGCTGTAACIGGTGCACAGACAATTAGT 4920

—————|—————

Repetida Directa A

G T W S Y F G A D G I A V T G A O T I S

GGTCAAAAATTGTTCTTTGATGCTGACGGACAACAGATTAAGGTAAGGAAGCGACTGAT 4980

—————|

G O K L F F D A D G O O I K G K E A T D

AAAAAGGGGAAAATGCATTATTATGATGCTGATTCTGGTGAAATGACCACTAATCGTTTT 5040

K K G K M H Y Y D A D S G E M T T N R F

GAAAAGTTATCAGATGGATCATGGATGACTTTAATAAAAAAGGTAACGTTGTAACCGGT 5100

—————|—————

Repetida Directa A

E K L S D G S W M Y F N K K G N V V T G

GCACAAGTCATTAATGGTCAACATTTGTTCTTTGAAAGCAATGGTAACCAAGTTAAGGGT 5160

—————|—————

Repetida Directa A

Repetida Directa N

A O V I N G O H L F F E S N G N O V K G

CGTGAATACACGGCTACTGATGGTAAGATGCGCTACTACGATGCAGATTTCTGGTGATG 5220

—————|—————

Repetida Directa N

Repetida Directa N

R E Y T A T D G K M R Y Y D A D S G D M

BTGACGAATCGCTTTGAGCGAATATCAGACGGATCATGGGCATATTTTGGTGCTAATGGT 5280

—————|—————

Repetida Directa N

Repetida Directa A

V T N R F E R I S D G S W A Y F G A N G

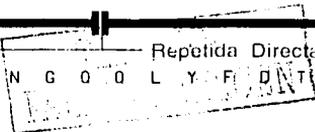
GTIGCTGTAACIGGTGCACAAAATATAAATGGACAACAACCTGTATTTTGATACCAAGGGT 5340

—————|—————

Repetida Directa A

Repetida Directa A

V A V T G A O N I N G O O L Y F D N T K G



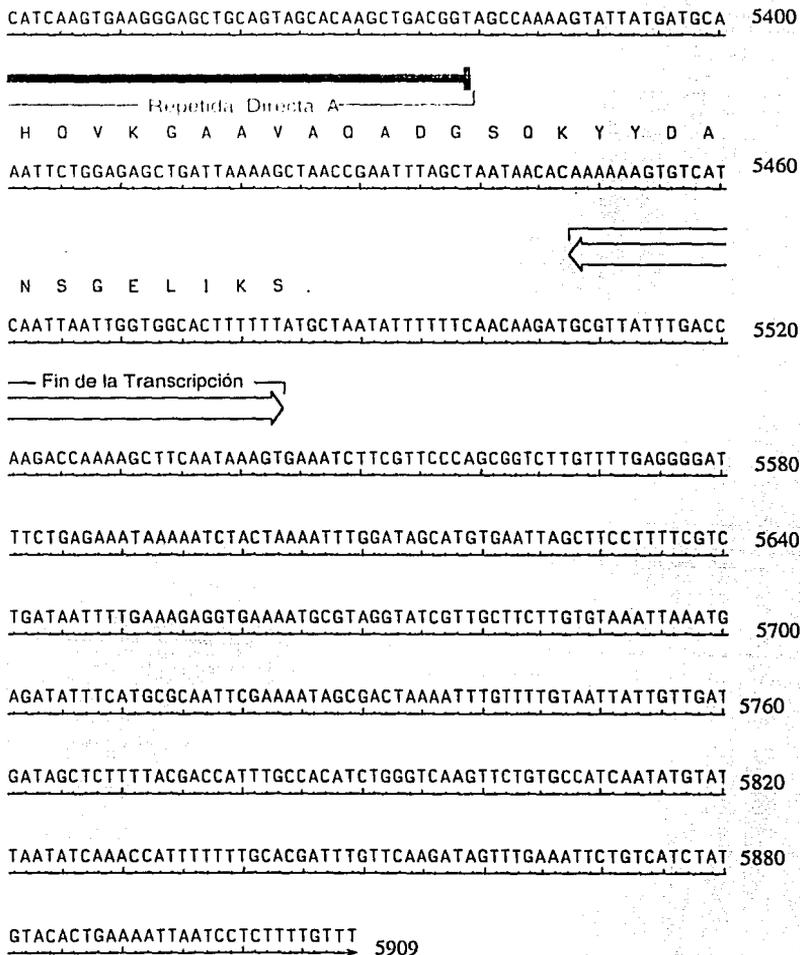


Figura 16.- Secuencia nucleotídica de 5909 pb aislada de *L. mesenteroides* IBT-PQ con los oligonucleótidos PQ+11 y PQ-10.

FALLA DE CARGA

V.2.1. Análisis de la secuencia peptídica

El gene de la *dsrP* codifica para una proteína de 1454 residuos con un peso molecular de 160.5 kDa y un p.I calculado de 4.5. En un análisis de identidad con la base de datos (BLAST) se observó que la DsrP presenta una identidad del 95 % con la DsrT5 y con la secuencia de la proteína Lmes1684 proveniente de la cepa de *L. mesenteroides* ATCC 8293 cuyo genoma fue secuenciado recientemente. Con respecto a las demás glucosiltransferasas reportadas, la DsrP presenta alrededor de un 50 % de identidad (tabla 4). En este análisis se observó que la DsrP presenta la estructura propia de las glucansacarasas: péptido señal, región variable, región catalítica y dominio de unión a polímero (figura 17).

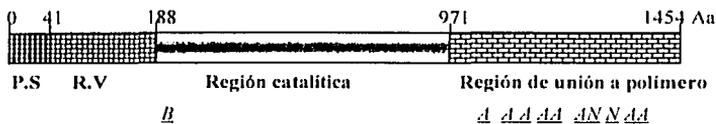


Figura 17.- Representación esquemática de la organización estructural de la DsrP. P.S= Péptido señal, R.V= Región variable, Aa= Aminoácido. *B, A, N* = Corresponden al tipo de secuencia repetida directa.

Se realizó un análisis de comparación (dendograma) con las secuencias reportadas de las glucosiltransferasas (figura 18), en él se observa como se encuentran separadas las dextransacarasas del género *Leuconostoc* de las glucosiltransferasas de *Streptococcus spp*; así mismo se observa como la DsrP, DsrT5 y Lmes 1684 están agrupadas en un clado independiente de las demás dextransacarasas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

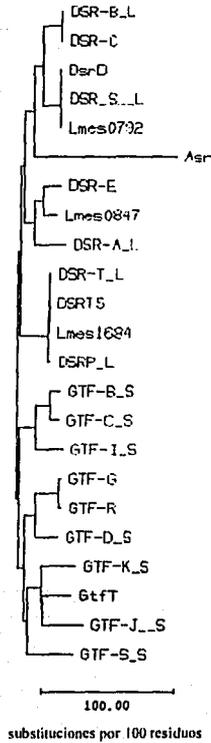


Figura 18.- Dendrograma de las dextransacarasas del género *Leuconostoc* y glucosiltransferasas de *Streptococcus spp.*

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Tabla 4.- Tabla de identidad entre la DsrP de *L. mesenteroides* IBT-PQ y las diferentes glucosiltransferasas reportadas.

	DsrP	Referencia	DsrP	Referencia
DsrA	57 %	Monchois (1996)	0792	50 % NCBI (2002)
DsrB	53 %	Monchois (1998)	GtFB	53 % Shiroza (1987)
DsrC	51 %	Arguello (1999)	GtFC	52 % Ueda (1998)
DsrD	50 %	Neubauer (2003)	GtFD	53 % Honda (1990)
DsrE	55 %	Bozonnet (2002)	GtFG	52 % Vickerman (1997)
DsrS	50 %	Bhatnagar (1996)	GtFI	52 % Sato (1993)
DsrT	95 %	Funane (2000)	GtFJ	46 % Giffard (1991)
DsrTS	95 %	Funane (2000)	GtFK	46 % Giffard (1993)
Asr	45 %	Arguello (2000)	GtFR	52 % Fujiwara (2000)
1684	95 %	NCBI (2002)	GtFS	47 % Gilmore (1990)
0847	62 %	NCBI (2002)	GtFT	48 % Inoue (1999)

V.2.2. Péptido señal

De acuerdo al programa Signal P VI.1 (Nielsen, 1997) se identificó el péptido señal de la DsrP localizado del residuo Met1 a la Ala41 (figura 16). En un alineamiento con sus homólogos de la DsrS y DsrC se observó que la región central del péptido señal se encuentra conservada (figura 19). Con respecto al péptido señal de la DsrT, la DsrP es 13 residuos más grande. Sin embargo, la secuencia restante esta 100 % conservada entre estas dos enzimas. En la secuencia nucleotídica del péptido señal se localizó una secuencia repetida inversa entre los nucleótidos 26 y 37 del gene *dsrP* (figura 16) .

```

DSRS  _MPFTEK_VMRKKLYKVGKSW_VVGGVCAFALTA_SFALAT
DSRC  NVL1KERNV_RKKLYKSGKSW_VIGGLILSTIML_SMTATS
DSRP  MRNRNVTSVFRKKMYKS_KGMLVIAGSV_SIIGVTSFIIQQAQA
DSRT  MYKS_KGMLVIAGSV_SIIGVTSFIIQQAQA

```

Figura 19.-Alineamiento de los péptidos señal de las DsrS, DsrC, DsrP y DsrT.

V.2.3. Región Variable

La región variable de la DsrP se localizó entre los residuos Asp42 al Ile88, esta región como su nombre lo indica mostró una baja identidad entre las GTF's reportadas. Dentro de esta región se localizaron siete regiones repetidas directas seguidas una de otra, a excepción de la primera que se encuentra separada por dos residuos de la segunda repetida (figura 16). Cada secuencia repetida consta de 12 residuos ricos en treonina, ácido aspártico y alanina. (Figura 20)

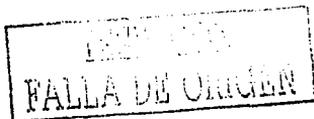
```
61   D_ATTT_DKS 68
71   TNDKATTTADTS 82
83   TNDKATTTADTS 94
95   TNDKATTTADTS 106
107  TNDKATTTADIS 118
119  TNNKATTTADTS 130
131  TNNKAATTADTS 142
```

Figura 20.- Alineamiento de las secuencias repetidas directas de la región variable de la DsrP.

Este tipo de organizaciones se han descrito en la DsrT y DsrE a las cuales Bozonnet y col. en el 2002 llamaron motivos T y S respectivamente, para el caso DsrP el motivo fue similar al de la DsrT. Sin embargo, se desconoce la función de este arreglo.

V.2.4. Región Catalítica

La región catalítica de la DsrP se localizó entre los residuos Asp189 y Gln971 (figura 16), dentro de ella se localizaron los residuos Asp 473, Glu511 y Asp 589 que en su conjunto forman lo que se conoce como la triada catalítica (DED). Estos residuos se conservan entre las glucosiltransferasas y se sabe son importantes en la catálisis de estas enzimas (figura 21).



Dentro de la región catalítica se localizó la región que se conoce como el sitio de unión a sacarosa la cual se ubico del residuo Ala465 al Ile485 (ANFDSIRVDAVDNVDADLI.QI). Se localizó también la secuencia homóloga al sitio activo de la DsrP entre los residuos Gly424 y Asn447 (figura 21).

		Región del Sitio Activo										600				
DSR-B_L	..S	FELL	IA	DVD	S	P	WV	SE	IL	YL	F	SIT	..A	DSAA	F	
DSR-C	..st	feLL	IA	dvD	s	p	wv	se	il	yl	f	sit	..a	dsaa	f	
DsrD	..2	feLL	IA	dvD	s	p	wv	se	il	yl	f	sit	..a	dsaa	f	
Lmes0792	..st	feLL	IA	dvD	s	p	wv	se	il	yl	f	sit	..a	dsaa	f	
DSR_S_L	..S	FELL	IA	DVD	S	P	WV	SE	IL	YL	F	TIT	..A	DADA	F	
GTF-B_S	..dt	yeLL	IA	dvD	s	p	wv	se	il	yl	f	ty	..a	dpda	f	
GTF-C_S	..drt	yeLL	IA	dvD	s	p	wv	se	il	yl	f	ty	..a	dpda	f	
GTF-I_S	..DP	YFEL	IA	DVD	S	P	WV	AE	IL	YL	F	SIY	..A	DADA	F	
GTF-G	..a	yeLL	IA	dvD	s	p	wv	se	il	yl	f	ty	..a	dpda	f	
GTF-R	..a	yeLL	IA	dvD	s	p	wv	se	il	yl	f	ty	..a	dpda	f	
GTF-D_S	..ss	yeLL	IA	dvD	s	p	wv	se	il	yl	f	ty	..a	dpda	f	
DSR-T_L	..T	YFEL	IA	DVD	S	P	WV	AE	IL	YL	F	SIT	..A	DADA	F	
DSRTS	..T	YFEL	IA	DVD	S	P	WV	AE	IL	YL	F	SIT	..A	DADA	F	
Lmes1684	..T	YFEL	IA	DVD	S	P	WV	AE	IL	YL	F	SIT	..A	DADA	F	
DSRP_L	..T	YFEL	IA	DVD	S	P	WV	AE	IL	YL	F	SIT	..A	DADA	F	
DSR-E	..K	yeLL	IA	dvD	s	p	wv	se	il	yl	f	ty	..a	dpda	f	
Lmes0847	..T	yeLL	IA	dvD	s	p	wv	se	il	yl	f	ty	..a	dpda	f	
DSR-A_L	..K	FELL	IA	DVD	S	P	WV	AE	IL	YL	F	SIT	..A	DADA	F	
GTF-K_S	..D	YFEL	IA	DVD	S	P	WV	AE	IL	YL	F	SIY	..A	DADA	F	
GcIT	..D	yeLL	IA	dvD	s	p	wv	se	il	yl	f	ty	..a	dpda	f	
GTF-J_S	..P	FELL	IA	DVD	S	P	WV	AE	IL	YL	F	SIY	..A	DADA	F	
GTF-S_S	..TT	YFEL	IA	DVD	S	P	WV	AE	IL	YL	F	SIY	..A	DADA	F	
Asr	..sdl	sdldst	..D	..K	..T	..D	..K									
Consensus	..T	YFEL	IA	DVD	S	P	WV	AE	IL	YL	F	SIT	..A	DADA	F	

		D										650			
DSR-B_L	..DIR	..T	..AV	..DV	..D	..A	..L	..IA
DSR-C	..dir	..t	..av	..dv	..d	..a	..l	..ia
DsrD	..dir	..t	..av	..dv	..d	..a	..l	..ia
Lmes0792	..dir	..t	..av	..dv	..d	..a	..l	..ia
DSR_S_L	..DIR	..T	..AV	..DV	..D	..A	..L	..IA
GTF-B_S	..dsir	..t	..av	..dv	..d	..a	..l	..ia
GTF-C_S	..dsir	..t	..av	..dv	..d	..a	..l	..ia
GTF-I_S	..DSIR	..T	..AV	..DV	..D	..A	..L	..IA
GTF-G	..dir	..t	..av	..dv	..d	..a	..l	..ia
GTF-R	..dir	..t	..av	..dv	..d	..a	..l	..ia
GTF-D_S	..dir	..t	..av	..dv	..d	..a	..l	..ia
DSR-T_L	..DSIR	..T	..AV	..DV	..D	..A	..L	..IA
DSRTS	..DSIR	..T	..AV	..DV	..D	..A	..L	..IA
Lmes1684	..dsir	..t	..av	..dv	..d	..a	..l	..ia
DSRP_L	..DSIR	..T	..AV	..DV	..D	..A	..L	..IA
DSR-E	..dir	..t	..av	..dv	..d	..a	..l	..ia
Lmes0847	..dir	..t	..av	..dv	..d	..a	..l	..ia
DSR-A_L	..DIR	..T	..AV	..DV	..D	..A	..L	..IA
GTF-K_S	..DIR	..T	..AV	..DV	..D	..A	..L	..IA
GcIT	..dir	..t	..av	..dv	..d	..a	..l	..ia
GTF-J_S	..DIR	..T	..AV	..DV	..D	..A	..L	..IA
GTF-S_S	..DIR	..T	..AV	..DV	..D	..A	..L	..IA
Asr	..ds	..r	..k	..i	..t	..d	..k	..t	..d	..k	..t	..d	..k	..t	..d
Consensus	..DIR	..T	..AV	..DV	..D	..A	..L	..IA

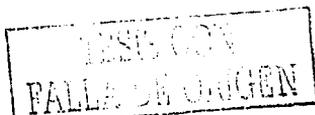
Sitio de Unión a Sacarosa

TESIS CON
FALLA DE CARGEN

651		E		700	
DSR-B_L	ADYFKAAY V DK DATA	LSILEEWS	DPE...YVKDF	
DSR-C	adyfkaay v dk data	LSILEEWS	dp...yykdf	
DsrD	adyfklay v d dsta	LSILEEWS	dpl...yytdsd	
Lmes0792	adyfklay v d data	LSILEEWS	dpl...yytds	
DSR_S_L	ADYFKRAY V DL DATA	LSILEEWS	DPL...YYTDS	
GTF-B_S	dylkaak i k dkaa d	LSILEAUSD	d...tpyl dd d m	
GTF-C_S	dylkaak i k dkaa d	LSILEAUSD	d...tpyl dd d m	
GTF-I_S	SDYKAAAY I DK E A	LSILEANSL	d...TPYL DD D L	
GTF-G	sdylkarykv eseeak	LSILEAUSD	dpl...y kdtk a	
GTF-R	sdylkarykv eseeak	LSILEAUSD	dpl...y kdtk a	
GTF-D_S	sdylka y y dksak a	LSILEAUSD	dp...y kdtk a	
DSR-T_L	ADYFKAAY V DESDAS	LSILEEUSD	DAE...YVKDD	
DSRT5	ADYFKAAY V DESDAS	LSILEEUSD	DAE...YVKDD	
Lmes1684	adyfkaay v dksaas	LSILEEUSD	DAE...YVKDD	
DSRP_L	ADYFKAAY V DESDAS	LSILEEUSD	DAE...YVKDD	
DSR-E	adyfkaay t kda a	LSILEAUSD	d...payka	
Lmes0847	adyfkaay t kda a	LSILEAUSD	d...payka	
DSR-A_L	EYAKAAAY V DEH...TRER	LSILEEUS	ENKI...TNSKNATSK	
GTF-K_S	SSYHKAAYKV ESEAFALA	LSILEAUS	D...PYVY ETAA	
GLIT	t yl avy v dksa a	LSILEAUSD	d...y dt aa	
GTF-J_S	T YFREYV Y KGEFA ALA	LSILEANSL	D...Y DKTD AA	
GTF-S_S	RDYFKAAY T DE EK AID	LSILEAUS	D...EYVKDFS	
Astr	. ylf f st t a a a	LSILEEUSD	D...EYVKDFS	
Consensus	ADYFKAAY V EKDA A	LSILEEUSD	DPE...PYVKD	-----D	

801		D		850	
DSR-B_L	SFVRA ISEV	TVIAIISE	IL PVVK	LS LAPTADLAE	AFKIY DEK
DSR-C	sfvra dbev	tviaiise	il pvvk	LS laptadlae	afkiy dek
DsrD	sfvra dbev	tviaiise	il pyvve	LS laptceila	afkvy edek
Lmes0792	sfvra dbev	tviaiise	il pyvve	LS laptceila	afkvy edek
DSR_S_L	SFVRA ISEV	TVIAIISE	ILVPPVE	LS LAPTTE LAA	AFKVV EDEK
GTF-B_S	sfvra dbev	tviaiika	ei p vy ys	LS lttedeik	afkiy kdll
GTF-C_S	sfvra dbev	tviaiika	ei p vy ys	LS lttedeik	afkiy kdll
GTF-I_S	SFARA ISEV	TVIAIIKA	EI P SF YS	LS FTTEIEE	AFKIY EDEK
GTF-G	sfvra dbev	tviaiika	ei p td l	LS lttedeik	afkiy edhr
GTF-R	sfvra dbev	tviaiika	ei p td l	LS lttedeik	afkiy edhr
GTF-D_S	sfvra dbev	tviaiika	ei p ktd l	LS lttedeik	afkiy edhr
DSR-T_L	SFVRA ISEV	TVIAIIEK	RIDPDS LS	PTH...LTE	AFKIY ADL
DSRT5	SFVRA ISEV	TVIAIIEK	RIDPDS LS	PTH...LTE	AFKIY ADL
Lmes1684	sfvra dbev	tviaiika	ridpds	LS pth...lte	afkiy adl
DSRP_L	SFVRA ISEV	TVIAIIEK	RIDPDS LS	PTH...LTE	AFKIY ADL
DSR-E	sfvra dbev	tviaiika	ki p kd l	LS lttedeik	afkiy adel
Lmes0847	sfvra dbev	tviaiika	ki p kd l	LS lttedeik	afkiy adel
DSR-A_L	SFIRA ISEV	TVIAIIEK	KI PAST	LS STVTLDEK	AFKIY ABEL
GTF-K_S	SFVRA ISEV	TVIAIIEK	KIPPT...T	F TFLDEK	AFKIY ABEL
GLIT	sfvra dbev	tviaiika	kippt...t	F t fld lk	afkiy kba
GTF-J_S	SFIRA ISEV	TVIAIIEK	EI PRSD F T	LITDAEIK	AFKIY KDL
GTF-S_S	SFIRA ISEV	TVIAIIEK	EL KT AD L T	LTLDEL K	AFKIY DEK
Astr	sfvra dbev	tviaiika	ki p kd l	LS lttedeik	afkiy adel
Consensus	SFVRA ISEV	TVIAIIEK	KI PDS LS	LTFP...LDEK	AFKIY ABEL

Figura 21.- Alineamiento de la DsrP y demás glucosiltransferasas reportadas, en él se señalan los residuos DED triada catalítica que se conservan entre la glucosiltransferasas.



 INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS
 FALTA DE OROGEN

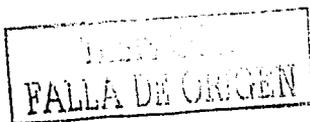
El residuo Thr594 de la DsrP se menciona como un residuo importante ya que en las GTF's del género *Streptococcus* se ha observado que interviene en la estructura del glucano sintetizado (Shimamura y col. 1994., Monchois y col. 1996). Este residuo dentro del género *Streptococcus* no está 100 % conservado, mientras que en el género *Leuconostoc* se le encuentra como Treonina.

Los residuos Asp 440, Asn441, Ala476, Trp477 y Ser478 de la GtFS de *Streptococcus downei* corresponden a los residuos Asp476, Asn477, Asp512, Trp513 y Ser514 de la DsrP respectivamente. Se sugiere que estos residuos desempeñan un papel importante en la unión con la molécula aceptora y en la transferencia del residuo glucosilo. El residuo Asp512 de la DsrP es el único residuo que difiere con respecto a la GtFS. Sin embargo, en el género *Leuconostoc* este residuo se presenta como Asp, mientras que, en el género *Streptococcus* varía.

Como se ha mencionado, la DsrP y DsrT5 presentan una identidad del 95%. Sin embargo, dentro de la región catalítica se localizaron 17 residuos diferentes entre estas dos enzimas (tabla 5), los cuales se localizan fuera del la región del sitio activo y del sitio de unión a sacarosa.

		R E S I D U O S																
DsrP	N	G	I	D	N	S	A	F	H	V	G	P	H	N	R	H	A	
	198	199	201	219	241	252	254	275	303	350	448	547	550	568	574	741	823	
DsrT5	D	D	V	E	T	T	D	L	Q	G	W	A	Q	D	T	Q	V	
	243	244	246	264	286	297	299	320	348	395	493	592	595	613	619	786	868	

Tabla 5.- Residuos diferentes de la región catalítica entre la DsrP y DsrT5.



V.2.5. Región de unión a glucano

La región de unión a polímero ó glucano como se le conoce, abarca un 32 % de la proteína total, se ubica del residuo Gln971 a la Ser1454 (figura 16). Dentro de esta región se localizaron 10 regiones repetidas de unión a pared celular putativas según el programa <http://pfam.wuol.edu/cgi-bin/nph-hmmsearch> dentro de las cuales se localizaron las secuencias repetidas directas. De acuerdo a la clasificación de las repetidas directas ocho de las diez fueron del tipo A y dos del tipo N (A-A-A-A-A-N-N-A-A). La secuencia peptídica de las repetidas directas de la DsrP fue prácticamente idéntica a las de la DsrT5, salvo por nueve residuos distintos distribuidos en cuatro de las repetidas directas como se muestra en la figura 22.

Al inicio de la región catalítica de la DsrP, entre los residuos Thr192 y Lys212 (figura 16), se localizó también una posible secuencia de unión a pared celular similar a las repetidas directas del dominio carboxilo, pero del tipo B. Este tipo de estructuras se han descrito en diferentes glucansacarosas, principalmente al inicio de la región catalítica como es el caso de la DsrE (Bozonnet y col. 2002) y DsrP (Funane y col. 2000), donde la identidad entre las diferentes enzimas es muy alto. Sin embargo, hasta el momento se desconoce la función de dicha estructura.

A 21 nucleótidos río abajo del codón de paro se localizó una secuencia invertida repetida de 18 nucleótidos que al aparearse forman una horquilla (figura 16), esta misma secuencia fue encontrada a la misma distancia en el gene DsrT5, en donde se sugiere que puede estar involucrada en la terminación de la transcripción del gene.

DsrP 192 TYY^YDDNGQIKKNFATVIDGK²¹²
DsrT5 233 TYY^YDDDGQIKKNFATVIDGK²⁵⁷

DsrP 1135 WYFFDKNGYMTYGFQTVNDN¹¹⁵⁴
DsrT5 1180 WYFFDKNGYMTYGFQTVNDN¹¹¹⁹⁹

DsrP 1199 WR^YFDKNGVMANAGLTTVTVDGQ¹²²¹
DsrT5 1244 WR^YFDKNGVMANAGLTTVTVDGQ¹²⁶⁷

DsrP 1224 IQYFDKNGIQVKGTSVKDADG¹²⁴⁴
DsrT5 1269 IQYFDKNGIQVKGTSVKDADG¹²⁸⁹

DsrP 1246 LRYFDTDSGEMVTNRFGEKTDGT¹²⁶⁸
DsrT5 1291 LRYFDTDSGEMVTNRFGENTDGT¹³¹³

DsrP 1269 WSYFGADGIAVTGAQTISGQ¹²⁸⁸
DsrT5 1314 WSYFGADGIAVTGAQTISGQ¹³³²

DsrP 1354 H^LFFESNGNQVKGREYATDGK¹³⁷⁵
DsrT5 1399 H^LFFESNGNQVKGREYATDGK¹⁴²⁰

DsrP 1377 RYDADSGDMVTNRFERISDG¹³⁹⁷
DsrT5 1422 RYDADSGDMVTNRFERISDG¹⁴⁴²

DsrP 1334 WMYFNKKGNI^VTGAQVINGQ¹³⁵³
DsrT5 1379 WMYFNKKGNI^VTGAQVINGQ¹³⁹⁸

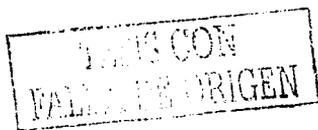
DsrP 1399 WAYFGANGVAVTGAQONINGQ¹⁴¹⁸
DsrT5 1444 WAYFDANGVAVTGEQONINGQ¹⁴⁶³

DsrP 1419 QLYFDTKGHQVKGAAVAQADG¹⁴³⁹
DsrT5 1464 QLYFDANGHQVKGAAVKQADG¹⁴⁸⁴

Figura 22.- Alineamiento de las secuencias repetidas de unión a pared celular putativas, dentro de las cuales se localizan las repetidas directas del dominio carboxilo. La primer secuencia corresponde a la repetida del dominio catalítico. muestra los cambios entre la DsrP y la DsrT5.

V.2.6. Identificación de un posible gene regulador de la DsrP

A 624 pb río arriba en la cadena complementaria del gene *dsrP* se encontró una secuencia de 439 pb (figura 16) con un 21 % de identidad con el gene regulador *rgg* de *S. gordonii*, el cual se sabe regula de forma positiva a la GtFD (Vickerman y col. 2001). Por alineamiento (figura 23) calculamos que para aislar completamente el posible regulador en la cepa IBT-PQ faltan aproximadamente 100 pb, los cuales corresponden a la parte final del gene. La secuencia obtenida muestra también un 23% de identidad con el gene *rggD* de *S. gordonii* que se localiza río abajo en la cadena complementaria del



g/D, aún no se ha dilucidado la participación de este gene en la regulación de las GTFs, pero se sabe que pueden regular la expresión de proteínas distales.

```

1
Rgg mliivkss kl ikircesk h sikavaa di sva laryer asilicvaf
RggD ---nt l y rrrrcaat i siseat ef sksuisrre selaa.kl
Regulador_Ds
Consensus -----R-E-----S-E-----S---LGR-E--G-----

51
Rgg yscir nsvs laef yv... lly ycead dvvta kiae a re rki
RggD faaisa te rrrfvaa s d s kv... llll l e llt l ll
Regulador_Ds
Consensus -S-E-----EF-----E-----E-----E-----

101
Rgg esila seam a efpekk y kl tivirat itac pdy . ....vsk di
RggD eklylkkkk s kskss dv verilykay laalkesek. ....aspdi
Regulador_Ds
Consensus E-----E-----AY L-SL---Y---AS-IL-

101
Rgg esila seam a efpekk y kl tivirat itac pdy . ....vsk di
RggD eklylkkk s kskss dv verilykay laalkes-k. ....aspdi
Regulador_Ds
Consensus E-----E-----AY L-SL---Y---AS-IL-

151
Rgg efitdylyfaw eeu kvvvl tt dy lli eblatfawen i ct fy i
RggD dfl dylyfaw dv rpekl fsecpvlff dlfs ytk- lsc ditalf
Regulador_Ds
Consensus -FL-DYLFSTV --R RVEL-L F- -V -L-L D-----Y-SL L-R--F- --

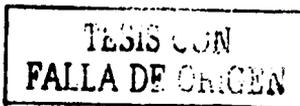
201
Rgg p rrrrke kl vrbacie l varkt l yid tkip ebllydvrit
RggD a r t l t f yllais se la adyf lvyer fy- -tyzlyf
Regulador_Ds
Consensus -- R---K- LL -----I- -----A-YF L--I---K-- E-D-YFR--

251
Rgg ky ka.lysy kv p ar d iencistfey ldsf varki ke.fornit
RggD ifa elaac k kke la mekavilf l e e salyy eal-aaif k
Regulador_Ds
Consensus L-F-- -L--- K--- A--- -E-----F-- L-----A--- -E---E-----

301
Rgg vradl re
RggD ysk-----
Regulador_Ds
Consensus -----

```

Figura 23.- Alineamiento de la Rgg, RggD y la región previa a la DsrP.



V.3. Expresión de la proteína

Una vez obtenido el gene *dsrP* con los oligonucleótidos PQ+11 y PQ-10 se clonó en el vector TOPO-XL, la construcción resultante fue llamada (TOPO-PQ). Esta construcción lleva el fragmento de 5.9 Kb dentro del cual está contenido todo el *dsrP* con su propia región promotora. Esta construcción se transformó en *E.coli* DH15 α (E.C.TOPO-PQ) a la cual se le realizaron ensayos de medición de actividad por DNS en el sobrenadante y en los restos celulares, ambos provenientes de un paso de sonicación (ver materiales y métodos). Con estas muestras se corrieron geles de actividad. Tanto la medición de actividad por DNS como los geles de actividad proporcionaron resultados negativos de expresión de la DsrP.

Con el objetivo de expresar la proteína se diseñaron los oligonucleótidos PQ+15 y PQ-15, los cuales, amplificaron el gene *dsrP* a partir del 4to nucleótido hasta el codón de paro. Con estos oligonucleótidos se amplificó un fragmento de 4365 pb sobre el ADN cromosomal de la IBT-PQ (figura 24), el cual contenía única y exclusivamente el *dsrP*. Este fragmento se clonó en el vector de expresión pBAD y la construcción realizada (pBAD-PQ) se transformó en *E.coli* DH15 α (E.C.pBAD-PQ).

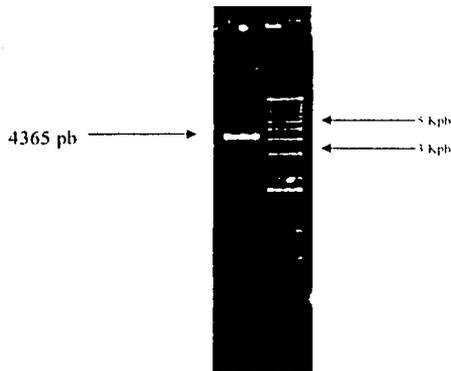


Figura 24.- *dsrP* amplificado por PCR con los oligonucleótidos PQ+15 y PQ-15.

A la clona E.C-pBAD-PQ se le realizó el perfil de expresión de la DsrP utilizando arabinosa como inductor, la concentración de arabinosa que indujo mejor la expresión observada en gel fue de 0.02 % (figura 25). Una vez obtenida dicha concentración del inductor se corrió un gel de actividad con los restos celulares de la E.C-pBAD-PQ y se tñó con el reactivo de shift para ver si había síntesis de polímero (figura 26).



- 1.- Marcador de peso molecular
- 2.- Muestra sin inducir
- 3.- Muestra inducida con 0.00002 % de arabinosa
- 4.- Muestra inducida con 0.0002 % de arabinosa
- 5.- Muestra inducida con 0.002 % de arabinosa
- 6.- Muestra inducida con 0.02 % de arabinosa
- 7.- Muestra inducida con 0.2 % de arabinosa

DsrP

Figura 25.- Perfil de expresión de la DsrP en *E. coli* utilizando arabinosa como inductor.
 * Indica la mejor concentración de arabinosa que induce la expresión.



Dextrana

Figura 26.- Gel de actividad incubado con el reactivo de shift, en el gel se observa la dextrana teñida producida por la E.C-pBAD-PQ.

TRABAJE CON
 FALSA DE ORIGEN

V.3.1. Expresión de la DsrP en *E. coli*

Una vez obtenida la mejor concentración de arabinosa que induce la expresión de la DsrP en la E.C-pBAD-PQ y al observarse que es capaz de sintetizar polímero se midió entonces la actividad tanto en el sobrenadante como en los restos celulares ambos provenientes de un paso de sonicación (ver materiales y métodos). La actividad en el sobrenadante fue de 0.06 U/mg de proteína, en tanto que, en los restos celulares fue de 0.026 U/mg de proteína.

Con las mismas muestras que se midió actividad por DNS se corrieron geles de actividad y se incubaron con sacarosa (figura 27-A). Como control se utilizó la cepa silvestre de la IBT-PQ y la DsrS de la B-512 F expresada en *E.coli* dentro del laboratorio, ambas con capacidad de sintetizar dextrana. En este gel se observó la producción de polímero en el sobrenadante y en los restos celulares de la E.C-pBAD-PQ sonicada, así como en los controles de la IBT-PQ y la B-512 F. Una vez observado el resultado del gel de actividad, éste se incubó con dextranasa, enzima que rompe los enlaces α 1 \rightarrow 6 de la dextrana, esto último para confirmar que el polímero sintetizado era dextrana. La desaparición del polímero en los controles fue total, mientras que en los restos celulares y en el sobrenadante aún permaneció una porción del polímero sin hidrolisarse (figura 27-B). Suponemos que esta porción de dextrana que no fue reconocida por la dextranasa presenta enlaces α 1 \rightarrow 3 ya que en la cepa silvestre Chellapandian y col. reportaron que el polímero producido por esta cepa presenta enlaces de este tipo.

GENS CON
FALLA DE ORIGEN

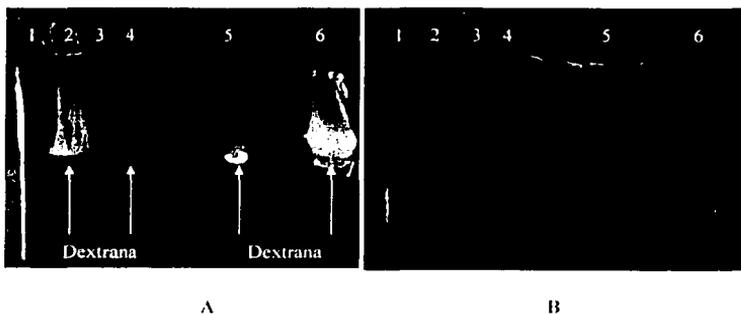


Figura 27.- Gies de actividad. A.- Gel incubado con sacararosa. B.- Gel A incubado con dextranasa. 1.- Restos celulares sin inducir, 2.- Restos celulares inducidos, 3.- Sobrenadante sin inducir, 4.- Sobrenadante inducido, 5.- IBT-PQ, 6.- DsrS expresada en *E.coli*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VI. DISCUSION

Se aisló el gene *dsrP* que codifica para la dextranasa DsrP de *L. mesenteroides* IBT-PQ la cual presenta una masa molecular de 160kDa que concuerda con el tamaño reportado por electroforesis por Chellapandian y col. en 1998 (166 kDa) para esta enzima. La DsrP fue muy similar tanto en tamaño como en estructura con las glucosiltransferasas reportadas en la literatura, ya que presenta en su estructura primaria un péptido señal, seguido de una región variable, un dominio catalítico y una región de unión a polímero.

En el análisis comparativo de la secuencia de la DsrP se observó que presenta los residuos clave en la catálisis, Asp 473, Glu511 y Asp589 (triada catalítica), además presenta un 95 % de identidad con la DsrT de *L. mesenteroides* NRRL B 512-F, una dextranasa truncada y alrededor del 50 % con las demás glucosiltransferasas reportadas (tabla 4). Del alineamiento de las secuencias peptídicas de la DsrP de las glucosiltransferasas de *Streptococcus spp.* reportadas en la literatura y de las secuencias de las tres posibles dextranastas que reporta el NCBI se realizó un árbol de identidad (figura 18), en él se observó como se separan en dos grandes grupos las dextranastas del género *Streptococcus* de las dextranastas de *L. mesenteroides*. Dentro de las dextranastas se observa como se agrupan principalmente en tres clados importantes y dentro de cada uno de estos clados se localiza una dextranasa diferente de la cepa ATCC. Es bien sabido que en *L. mesenteroides* se pueden encontrar una o más glucosiltransferasas activas como es el caso de *L. mesenteroides* NRRL B-1299 y NRRL B-1355, donde se han localizado dos dextranastas diferentes(Monchois y col. 1996., Monchois y col. 1997., Cote y col. 1983). Sin embargo, no se descarta que el número de genes presentes que codifican para glucosiltransferasas sea mayor en cada cepa de *L. mesenteroides* al reportado actualmente en la literatura, pero debido a procesos como recombinaciones que resultan en la pérdida de secuencias que generan proteínas no funcionales como la DsrT, (Funane y col. 2000) o bien por procesos de regulación se expresen solo una o dos glucosiltransferasas.

Diferentes estudios han proporcionado una a una las secuencias de las dextranastas reportadas que al ser agrupadas por alineamiento de sus secuencias peptídicas coinciden en el tipo de polímero sintetizado, tal es el caso de la DsrS, la dextranasa más

estudiada y utilizada en la industria fue agrupada con la DsrD recientemente publicada (Neubauer y col. 2003) que también ha sido utilizada a nivel industrial y con quien presenta más del 90 % de identidad con la DsrS, observándose que la dextrana que producen ambas enzimas son muy similares, más del 90 % de enlaces $\alpha 1 \rightarrow 6$ en la cadena principal del polímero. A su vez, estas dos enzimas fueron agrupadas con la DsrB y DsrC que también sintetizan un alto número de enlaces $\alpha 1 \rightarrow 6$ (tabla 1).

En un segundo grupo de las dextranas encontramos a la DsrE publicada por Bozonnet y col. (2002), esta enzima presenta dos sitios catalíticos, una organización poco común en esta familia de enzimas. En el análisis la DsrE se agrupó con la enzima Lmes 0847 de la cepa ATCC que también presenta la misma estructura pero de la cual se desconocen sus características fisicoquímicas y bioquímicas ya que ninguna de las dextranas de la cepa ATCC han sido caracterizadas.

Como se esperaba para la DsrP, ésta se agrupó con la DsrT-DsrT5, así como con la tercer dextranasa encontrada en la ATCC, Lmes. 1684, la identidad entre estas tres enzimas fue del 95 %. Pese a la gran identidad entre la DsrP y DsrT5 a nivel peptídico existe una gran diferencia entre los polímeros que sintetizan ambas enzimas. Funari y col. en el 2002 reportaron que la DsrT5 expresada en *E. coli* produce un polímero insoluble con un 40 % de enlaces $\alpha 1 \rightarrow 3$ y 50 % de enlaces $\alpha 1 \rightarrow 6$, mientras que, Chellapandian y col. en 1998 reportaron que la cepa IBT-PQ sintetiza un polímero soluble en agua 20 % de enlaces $\alpha 1 \rightarrow 3$ y 80 % de enlaces $\alpha 1 \rightarrow 6$ (un alto % de enlaces $\alpha 1 \rightarrow 3$ favorece que el polímero sea insoluble). Hasta el momento se desconoce que residuos participan en la determinación del tipo de polímero que sintetizan las glucosiltransferasas. Sin embargo, entre la DsrP y DsrT5 encontramos en la región catalítica 17 residuos diferentes (tabla 5), de los cuales 11 de estos cambios son por residuos de la misma carga y 6 por residuos diferentes, que para el caso de la DsrP corresponden a Asn254, His303, Val350, Gly448, Arg574 e His741. Resultaría interesante realizar estudios de mutagenesis sitio dirigida de estos residuos y analizar si participan en el tipo de polímero que se sintetizan. A nivel de la región de unión a polímero también se localizaron diferencias, particularmente dentro de las regiones repetidas directas (figura 23), los cuales desconocemos si determinen el % de enlaces $\alpha 1 \rightarrow 3$.

TRABAJO CON
FALLA DE ORIGEN

En *L. mesenteroides* NRRL B-512 F no se encontró expresión de la DsrT por lo que no se sabe donde se encuentra, si asociada a células o extracelularmente, para ello Funane sugirió que es una enzima extracelular ya que la proteína presentó un péptido señal típico de estas enzimas. Al comparar el péptido señal de la DsrT con su homólogo de la DsrP observamos que el de la DsrP es 13 residuos más grande (figura 19). Sin embargo, al comparar la secuencia nucleotídica río arriba del gene *dsrT* observamos que es idéntica a la DsrP, solo que Funane consideró más pequeño el péptido señal, por lo que, nuestros resultados sugieren que la DsrT puede ser una enzima asociada a células como la DsrP.

Río arriba del gene *dsrP* en la cadena complementaria se localizó una secuencia de 439 pb con una identidad del 21 % con el gene regulador *rgg*, el producto de este gene regula positivamente la transcripción del gene *gtfC* de *S. gordonii*. En la secuencia generada por el proyecto genómico del NCBI se buscó la secuencia del posible gene regulador de la DsrP, localizándose exactamente a la misma distancia río arriba de la proteína L.mes1684 con la cual la DsrP tiene la mayor identidad. En *Streptococcus spp.*, se ha observado que existen diferentes enzimas reguladas por reguladores del tipo *rgg*, estos reguladores se caracterizan por tener un motivo hélice-vuelta-hélice en el extremo amino terminal; para el caso particular de la Rgg de *S. gordonii* éste motivo se localiza entre los residuos Leu11 a la Thr 46. Mediante el programa Protein families databases of alignments and HMMs (Bateman y col. 2000), se observó que la secuencia obtenida previa al DsrP con identidad al *rgg* no es un gene regulador ya que carece del motivo hélice-vuelta-hélice característico.

La expresión heteróloga de la DsrP en *E. coli* bajo su propia región promotora fue nula ya que no se observó actividad dextransacarasa en la clona E.C.TOPO-PQ probablemente por la incompatibilidad de promotores entre los sistemas *Leucomastoc-E. coli*. Para el caso de la clona E.C. pBAD-PQ que contiene el *dsrP* con un promotor inducido se observó una actividad de 0.06 U/mg de proteína para el sobrenadante y de 0.026 U/mg de proteína proveniente de los restos celulares, estos valores son muy bajos si se comparan con los valores de la cepa silvestre que son de 2.08 U /mg⁻¹ de células. Sugerimos que estos valores mínimos de actividad sean debidos a que la enzima no se secreta al medio extracelular quedándose intracelularmente en forma de cuerpos de inclusión. Casos similares de baja expresión de dextransacarasa en sistemas

TESTEON
FALLA DE ORIGEN

heterólogos como *E. coli* han sido descritos en la DsrB (Monchois y col., 1998) donde la expresión de la proteína aún bajo un promotor inducido es muy baja comparado con los valores de la silvestre.

RESERVA
FALLA DE ORIGEN

VII. CONCLUSIONES

Se aisló el gene *dsrP* que codifica para la dextransacarasa (DsrP) de *L. mesenteroides* IBT-PQ y se expresó en *E. coli* bajo un promotor inducido.

La estructura primaria de la DsrP fue similar al que presentan las glucosiltransferasas reportadas en la literatura, principalmente con la DsrT5 de *L. mesenteroides* NRRL B-512-F con quien mostró una identidad del 95%. Sin embargo, el polímero sintetizado por la DsrP recombinante fue soluble, en tanto que, el producido por la DsrT5 es insoluble.

La actividad de la DsrP en *E. coli* fue muy baja, 0.026 U/mg de proteína en el sobrenadante y 0.06 U/mg de proteína en los restos celulares, lo cual atribuimos a que la dextransacarasa sintetizada por el sistema heterólogo E.C.pBAD-PQ permanece dentro de cuerpos de inclusión.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VIII. PERSPECTIVAS

La caracterización del polímero sintetizado por la E.C.pBAD-PQ mediante resonancia magnética nuclear será de gran ayuda para determinar con exactitud el tipo de polímero sintetizado por este sistema ya que la determinación del mismo en el presente trabajo se realizó únicamente por geles de actividad en los cuales se observó una porción de dextrana insoluble de la cual se desconoce el tipo de enlaces que presenta.

La gran identidad entre la DsrP y DsrT5 (95%) hace pensar que ambas enzimas son la misma. Sin embargo, los productos sintetizados por cada una son diferentes. Por lo que será interesante estudiar los cambios de los residuos diferentes de la región catalítica entre estas dos enzimas en la DsrP y ver que tipo de polímero se sintetiza.

El análisis de la secuencia nucleotídica del *dsrP* mostró regiones interesantes, como las secuencias repetidas directas de la región variable y las regiones repetidas directas de la región de unión a polímero. Hasta el momento se carece de información que indique si estas regiones afectan la actividad de la enzima. Por lo que, experimentos de remoción de estas regiones seguido del análisis de los productos sintetizados brindarán información acerca de si son o no necesarias para que la DsrP sea una enzima activa.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IX. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abo, H., Matsumura, T., Kodama, T., Ohta, H., Fukui, K., Kato, K. y Kagawa, H. (1991). Peptide sequences for sucrose splitting and glucan binding withing *Streptococcus sobrinus* glucosyltransferase (Water-insoluble glucan synthetase). *J. Bacteriol.* 173: 989-996.
- 2.- Alsop, R. (1983). Industrial production of dextrans. En: Progress in industrial microbiology. Vol. 18 pp1-43. Buschel, M.e. (Ed.) Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam Holanda.
- 3.- Arcot, P. y Kim, D. (2002). Production of insoluble dextran using cell-bound dextransucrase of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-523. *Carboh. Res.* 337: 1529-1533.
- 4.- Arguello-Morales, M. (2000). L'alternane-saccharase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355. structure primaire et synthèse d'oligosides. Tesis doctoral. L'Institut National des Sciences Appliquees de Toulouse. Francia.
- 5.- Arguello-Morales, M. Remaud-Simeon, M., Pizzut, S., Sarecabal, P., Willemont, R. y Monsan, P. (2000). Sequence analysis of the gene encoding alternansucrase, a sucrose glucosyltransferase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355. *FEMS Microbiol. Lett.* 182:81-85.
- 6.- Bozonnet, S., Dols-Laffargue, M., Fabre, E., Pizzut, S., Remaud-Simeon, M., Monsan, P. y Willemont, R. (2002). Molecular Characterization of DSR-E, an α -1,2 linkage-synthesizing dextransucrase with two catalytic domains. *J. Bacteriol.* 184. (20): 5753-5761.
- 7.- Chellapandian, M., Larios, C., Sanchez-Gonzalez, M. y Lopez-Munguia, A. (1989). Production and properties of a dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ isolated from "pulque", a traditional Aztec alcoholic beverage. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 21: 51-56.
- 8.- Cote, G. y Robyt J. (1983). Isolation and partial characterization of an extracellular glucansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355 that synthesizes an alternating (1-6), (1-3) α -D-glucan. *Carbohydr. Res.* 111:127-142.
- 9.- Devulapalle, K., Goodman, S., Gao, Q., Hemsley, A. y Mooser, G. (1997). Knowledge-based model of a glucosyltransferase from oral bacterial group of mutant *Streptococci*. *Prot. Sci.* 6:2489-2493.
- 10.- Eichel-Streiber, V., Sauborn, M. y Kuramitsu, H. (1992). Evidence for a modular structure of the homologous repetitive C-terminal carbohydrate-binding sites of *Clostridium difficile* toxins and *Streptococcus mutans* glucosyltransferases. *J. Bacteriol.* 174. 6707-6710.
- 11.- Ferretti, J., Gilpin, L. Russell, R. (1987). Nucleotide sequence of a glucosyltransferase gene from *Streptococcus sobrinus* Mf28. *J. Bacteriol.* 169: 4271-4278.
- 12.- Funane, K., Shiraiwa, M., Hashimoto, K., Ichishima, E. y Kobayashi, M. (1993). An active-site peptide containing the second essential carboxyl group of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* by chemical modifications. *Biochem.* 32: 13696-13702.
- 13.- Funane, K., Mizuno, K., Takahara, H. y Kobayashi, M. (2000). Gene encoding a dextransucrase-like protein in *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64. (1): 29-38.



- 14.- Funane, K., Ishii, T., Matsushita, M., Hori, K., Mizuno, K., Tkahara, Y. y Kobayashi, M. (2002). Water-soluble and water-insoluble glucans produced by *Escherichia coli* recombinant dextranucrases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Carbohydr. Res.* 334: 19-25.
- 15.- Giffard, P., Simpson, C., Milward, C. y Jacques, N. (1991). Molecular characterization of a cluster of at least two glucosyltransferase genes in *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. *J. Gen. Microbiol.* 137: 2577-2593.
- 16.- Giffard, P., Allen, D., Milward, C., Simpson, C. y Jacques, N. (1993). Sequence of the *gfk* gene of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975 and evolution of the *gfl* genes of oral Streptococci. *J. Gen. Microbiol.* 139:1511-1522.
- 17.- Giffard, P. y Jacques, N. (1994). Definition of fundamental repeating units in streptococcal glucosyltransferases glucan-binding regions and related sequences. *J. Dent. Res.* 73: 1133-1141.
- 18.- Gilmore, K., Russell R., y Ferretti, J.(1990). Analysis of the *Streptococcus downei gflS* gene, which specifies a glucosyltransferase that synthesizes soluble glucans. *Infect. Immun.* 58: 2452-2458.
- 19.- Hamada, S. y Slade, H. (1980). Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Rev.* 44:331-384.
- 20.- Hanada, N., Isobe, Y., Aizawa, Y., Katayama, T., Sato, S. y Inoue, M. (1993). Nucleotide sequence analysis of the *gflI* gene from *Streptococcus sobrinus* OMZ176. *Infect. Immun.* 61: 2096-2103.
- 21.- Hanada, N., Katayama, T., Kunimori, A., Yamashita, Y. y Takehara, T. (1993). Four different types of glucans synthesized by glucosyltransferases from *Streptococcus sobrinus*. *Microbios.* 73: 23-25.
- 22.- Honda, O., Kato, C. y Kuramitsu H. (1990). Nucleotide sequence analysis of the *Streptococcus mutans gflD* gene encoding the glucosyltransferase-S enzyme. *J. Gen. Microbiol.* 136: 2099-2105.
- 23.- Izard, J. y Kendall, D. (1994). Signal peptides: exquisitely designed transport promoters. *Mol. Microbiol.* 13:765-773.
- 24.- Kato, C., Nakano, Y., Lis, M. y Kuramitsu, H. (1992). Molecular genetic analysis of the catalytic site of *Streptococcus mutans* glucosyltransferases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189: 1184-1188.
- 25.- Kobayashi, M. y Matsuda, K. (1978). Inhibition of dextran synthesis by glucoamylase and endodextranase. *Carbohydr. Res.* 66: 277-288.
- 26.- Larios, C. (1996). Aislamiento y caracterización de microorganismos productores de polisacáridos en el pulque. Tesis de Licenciatura. Instituto de Ciencias Agropecuarias. Universidad del estado de Hidalgo, México.
- 27.- López-Munguía, A., Plene, A., Remaud-Simeon, M., Biton, J., Michel, J., Lang, C., Paul, F. y Monsan, P. (1993). Production and purification of alternansucrase, a glucosyltransferase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355, for the synthesis of oligoartemans. *Enzyme Microb. Technol.* 15: 77-85.
- 28.- MacGregor, A., Jesperen, H. y Svensson, B. (1996). Circularly permuted α -amylase-type α/β -barrel structure in glucan-synthesizing glucosyltransferases. *FEBS Lett.* 398: 263-266.
- 29.- Monchois, V., Willemont, R., Remaud-Simeon, M., Croux, C. y Monsan P. (1996) Cloning and sequencing of a gene coding for a novel dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 synthesizing only $\alpha(1-6)$ and $\alpha(1-3)$ linkages. *Gene* 182: 23-32.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

- 30.- Monchois, V. (1997). Étude des relations structure/fonction des dextran-saccharases de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F & B-1299. Tesis doctoral. I. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, Francia.
- 31.- Monchois, V., Remaud-Simeon, M., Russell, R., Monsan, P. y Willemont, R. (1997). Characterization of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextranucrase (DSR-S) and identification of aminoacid residues playing a key role in enzyme activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 465-472.
- 32.- Monchois, V., Remaud-Simeon, M., Monsan, P. y Willemont, R. (1998). Cloning and sequencing of an extracellular dextranucrase (DSRB) from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 synthesizing only $\alpha(1-6)$ glucan. *FEMS Microbiol. Lett.* 159: 307-315.
- 33.- Monchois, V., Willemont, R. y Monsan, P. (1999). Glucansucrases: mechanism of action and structure-function relationships. *Microbiol. Rev.* 23: 131-151.
- 34.- Monsan, P. y Paul, F. (1995). Enzymatic synthesis of oligosaccharides. *FEMS Microb. Rev.* 16: 187-192.
- 35.- Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemont, R. y Remaud-Simeon, M. (2001). Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int. Dairy. J.* 11: 675-685.
- 36.- Mosser, G., Hefta, S., Paxton, R., Shively, J. y Lee, T. (1991). Isolation and sequence of an active-site peptide containing a catalytic aspartic acid from two *Streptococcus sobrinus* glucosyltransferases. *J. Biol. Chem.* 266: 8916-8922.
- 37.- NCBI Microbial Genomes Annotation Project. (2002). National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA.
- 38.- Neely, W. y Nott, J. (1962). Dextranucrase, an induced enzyme from *L. mesenteroides*. *Biochemistry.* 1:1136-1140.
- 39.- Neubauer, H., Bauche, A. y Mollet, B. (2003). Molecular characterization and expression analysis of the dextranucrase DsrD of *Leuconostoc mesenteroides* Lec4 in homologous and heterologous *Lactococcus lactis* cultures. *Microbiol.* 149: 973-982.
- 40.- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. y von Heijne, G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Prot. Eng.* 10:1-6.
- 41.- Quirasco, M. (2000). Estudios de expresión de la dextranucrasa producida por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. Tesis Doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, México.
- 42.- Remaud-Simeon, M., López-Munguía, A., Felenc V., Paul, F. y Monsan, P. (1994). Production and use of glucosyltransferases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 for the synthesis of oligosaccharides containing $\alpha(1-2)$ linkages. *Applied. Biochem. Biotechnol.* 44:101-117.
- 43.- Robyt, J., Kimble, B. y Walseth T. (1974). The mechanism of dextranucrase action (The direction of dextran biosynthesis). *Arch. Biochem. Biophys.* 165: 634-640.
- 44.- Robyt, J. y Walseth, T. (1978). The mechanism of acceptor reactions of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextranucrase. *Carbohydr. Res.* 61: 433-445.
- 45.- Sánchez-González, M., Alagon, A., Rodríguez-Sotres, R. y López-Munguía, A. (1999). Proteolytic processing of dextranucrase of *Leuconostoc mesenteroides*. *FEMS Microb. Lett.* 181: 25-30.
- 46.- Shimamura, A., Nakano, Y., Musaka, H. y Kuramitsu, H. (1994). Identification of amino-acid residues in *Streptococcus mutans* glucosyltransferases influencing the structure of the glucan product. *J. Bacteriol.* 176: 4845-4850.
- 47.- Shiroza, T., Ueda, S. y Kuramitsu, H. (1987). Sequence analysis of the *gtfB* gene from *Streptococcus mutans*. 169: 4263-4270.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- 48.- Simpson, C., Cheetham, N., Giffard, P. y Jacques, N. (1995). Four glucosyltransferases, GTFJ, GTFK, GTFL, and GTFM from *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. *Microbiol.* **141**: 1451-1460.
- 49.- Simpson, C., Giffard, P. y Jacques, N. (1995). *Streptococcus salivarius* ATCC 25975 possesses at least two genes coding for primer independent glucosyltransferases. *Infect. Immun.* **63**: 609-621.
- 50.- Sulavick, M. y Clewell, D. (1996). Rgg is a positive transcriptional regulator of the *Streptococcus gordonii* *gtfG* gene. *J. Bacteriol.* **178**. (19): 5826-5830.
- 51.- Sumner, J. y Howell, S. (1935). A method for determination of invertase activity. *J. Biol. Chem.* **108**: 51-54.
- 52.- Tanriseven, A. y Robyt, J. (1992). Inhibition of dextran synthesis by acceptor reactions of dextranucrase, and the demonstration of separate acceptor binding site. *Carbohydr. Res.* **225**: 321-329.
- 53.- Tanriseven, A. y Robyt, J. (1993). Interpretation of dextranucrase inhibition at high sucrose concentrations. *Carbohydr. Res.* **245**: 97-104.
- 54.- Tsumori, H., Minami, T. Y Kuramitsu, H. (1997). Identification of essential aminoacids in the *Streptococcus mutans* glucosyltransferases. *J. Bacteriol.* **179**: 3391-3396.
- 55.- Ueda, S., Shiroza, T. y Kuramitsu, H. (1988). Sequence analysis of the *gtfC* gene from *Streptococcus mutans* GS 5. *Gene*. **69**: 101-109.
- 56.- Vieckerman, M., Sulavik, M., Miniek, P. y Clewell D. (1996). Changes in the carboxy-terminal repeat region affect extracellular activity and glucan products of *Streptococcus gordonii* glucosyltransferase. *Infect. Immun.* **64**: 5117-5128.
- 57.- Vieckerman, M., Sulavik, J., Nowak, J., Gardner, M., Jones, C. y Clewell, D. (1997). Nucleotide sequence analysis of the *Streptococcus gordonii* glucosyltransferase gene, *gtfG*. *DNA Seq.* **7**: 83-95.
- 58.- Vieckerman, M., Miniek, P. y Mather, N. (2001). Characterization of the *Streptococcus gordonii* chromosomal region immediately downstream of the glucosyltransferase gene. *Microbiol.* **147**. 3061-3070.
- 59.- Vieckerman, M. y Miniek P. (2002). Genetic analysis of the *rgg-gtfG* junctional region and its role in *Streptococcus gordonii* glucosyltransferase activity. *Infect. Immun.* **70**. (4). 1703-1714.
- 60.- Vieckerman, M., Wang, M. y Baker, L. (2003). An amino acid change near the carboxyl terminus of the *Streptococcus gordonii* regulatory protein Rgg affects its abilities to bind DNA and influence expression of the glucosyltransferase gene *gtfG*. *Microbiol.* **149**. 399-406.
- 61.- von Heijne, G. y Abrahmsen, L. (1989). Species specific variation in signal peptide design. Implications for protein secretion in foreign hosts. *FEBS Lett.* **244**: 439-446.
- 62.- Wilke-Douglas, M., Perchorowicz, J., Houck C. Y Thomas, B. (1989). Methods and compositions for altering physical characteristics of fruit and fruit products. PCT patent WO 89/12386.

TESIS CON
FALLA DE ORICEN