



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN

CIENCIAS BIOQUÍMICAS

TESIS

**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE
GLICOSILTRANSFERASAS EN
LEUCONOSTOC MESENEROIDES ATCC 8293**

Que para obtener el título de:

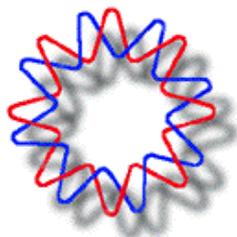
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

Anabel Otero Bilbao

Tutor: Dra. Clarita Olvera Carranza

Cuernavaca, Morelos, 2009





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.

Este trabajo fue realizado bajo la dirección de la Doctora Clarita Olvera Carranza en el laboratorio de Tecnología Enzimática del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México dirigido por el Doctor Agustín López-Munguía.

El proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología mediante el apoyo complementario 2008 a Investigadores Nacionales Nivel I No. 89268

Agradecimientos

Al Dr. Agustín López-Munguía por la ayuda decisiva para viajar a México, la oportunidad de trabajar en su laboratorio y el apoyo constante para la realización de este proyecto.

A la Dra Clarita Olvera por su asesoría, apoyo y entusiasmo para la realización de este proyecto

A los miembros del Comité Tutorial: Dra. Guadalupe Espín y Dra. Maricarmen Quirasco por sus valiosos comentarios y sugerencias

A los integrantes del jurado: Dra. Cinthia Nuñez, Dra. Amelia Farrés, Dr. Ricardo Oropeza y Dr. Enrique Merino por su cuidadosa revisión de la tesis y oportunas observaciones que enriquecieron el documento

Al Dr. Gaspar Pérez-Martínez, la Dra. María J. Yebra y el Dr. Vicente Monedero, del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Valencia, por su asesoría con los experimentos de transporte de azúcares y medición del PTS.

Al Dr. Enrique Merino por su asesoría en los estudios bioinformáticos

A la Dra. Cinthia Núñez por su apoyo para realizar los experimentos de radioactividad

A la MC. María Elena Rodríguez por su apoyo con varias técnicas de Biología Molecular

Al Dr. Paul Gaytan, al QI. Santiago Becerra, al MC. Eugenio López y al Q. Jorge Yáñez por su apoyo en la síntesis de oligonucleótidos y la secuenciación de DNA.

A TL.Fernando González y Aurelia Ocampo por el apoyo técnico

A mi familia por su cariño y presencia en cualquier circunstancia

A mis amigos Mabel y Karel, mi familia en México

A Rosana y Merino por su apoyo e invitarme a compartir su maravillosa familia

A Adriana por estar juntas en la risa y el llanto y por Morelia

A todos los compañeros del laboratorio por la armonía laboral:

A Edithsita y Sarita por tantos buenos e inolvidables momentos

A Angela por sus comentarios y sugerencias que me ayudaron a no perder el camino y por su hegemonía scrabbleana

A María, Arlette, Pau, Malen, Fer porque siempre encontramos momentos para reir y Alex por ser el responsable de buena parte de las risas

Índice de contenido

Abreviaturas	iii
Índice de figuras.....	iv
Índice de tablas	vi
1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Antecedentes.....	4
3.1 Fructosiltransferasas y fructanas	4
3.2 Glucosiltransferasas y glucanos	5
3.3 Leuconostoc mesenteroides. Aspectos metabólicos y genéticos.....	6
3.4 Expresión de glicosiltransferasas	8
3.4.1 <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	8
3.4.2 <i>Streptococcus mutans</i>	9
3.4.2.1 PTS de clase manosa.....	9
3.4.2.2 CcpA	10
3.4.2.3 CovR	11
3.4.3 <i>Bacillus subtilis</i>	12
4. Hipótesis	15
5. Objetivo general.....	15
5.1 Objetivos específicos	15
6. Materiales y Métodos.....	16
6.1 Cepas y medios de cultivo.....	16
6.2 Actividad glicosiltransferasa en <i>L. mesenteroides</i> ATCC 8293 en presencia de diferentes fuentes de carbono.....	17
6.2.1 Fermentaciones.....	17
6.2.2 Medición de la actividad glicosiltransferasa	17
6.2.3 Cuantificación de proteínas.....	18
6.2.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	18
6.2.5 Geles de Actividad <i>in situ</i>	18
6.3 Ensayos de transporte de azúcares	19
6.4 Obtención de mutantes	19
6.4.1 Análisis del genoma de <i>L. mesenteroides</i> ATCC 8293.....	19
6.4.2 Manipulación del DNA	20
6.4.3 Amplificación de fragmentos por PCR.....	20
6.4.4 Fusión de fragmentos por PCR	22

6.4.5 Vectores.....	23
6.4.6 Ligación.....	23
6.4.7 Transformación en <i>E. coli</i> DH5 α	23
6.4.8 Transformación de <i>L. mesenteroides</i> ATCC 8293	24
6.4.9 Ensayo de reemplazamiento genético	24
6.5 Hibridación Southern	25
6.6 Secuenciación.....	25
7. Resultados y Discusión.....	26
7.1 Actividad glicosiltransferasa en <i>L. mesenteroides</i> ATCC 8293 en presencia de diferentes fuentes de carbono.....	26
7.2 Análisis del genoma de <i>L. mesenteroides</i> ATCC 8293	29
7.2.1 Selección de genes como blancos de mutación.....	29
7.2.2 Análisis de las secuencias intergénicas de las posibles glicosiltransferasas	33
7.2.2.1 Elementos de respuesta a catabolito (<i>cre</i>).....	35
7.3 Transporte de azúcares en <i>L. mesenteroides</i> ATCC 8293.....	39
7.4 Obtención de mutantes	43
7.4.1 Construcción de fragmentos y clonación	43
7.4.2 Transformación de <i>L. mesenteroides</i> ATCC 8293	44
7.4.3 Ensayo de reemplazamiento genético y análisis de posibles mutantes.	45
8. Conclusiones.....	49
9. Perspectivas.....	50
10. Bibliografía.....	52

Abreviaturas

GTF	glucosiltransferasas
FTF	fructosiltransferasas
<i>L. mesenteroides</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
BAL	bacterias ácido lácticas
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>L. reuteri</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
PTS	sistema fosfotransferasa de azúcares (phospho transferase system)
ORF	marco de lectura abierto (open reading frame)
PEP	fosfoenolpiruvato
<i>S. gordonii</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>
EI	enzima I del PTS
HPr	proteína fosfotransportadora termoestable
PTS ^{Man}	PTS de la clase manosa/glucosa
RCC	represión por catabolito carbonado
<i>cre</i>	elemento de respuesta a catabolito (catabolite response element)
CcpA	catabolite control protein A
<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
SacB	levansacarasa de <i>Bacillus subtilis</i>
RAT	antiterminador ribonucleótido (ribonucleotide antiterminator)
HPr K/P	HPr quinasa/fosforilasa (HPr kinase/phosphorylase)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
DNS	ácido 3,5-dinitrosalisílico (dinitrosalicylic acid)
SDS-PAGE	gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
CCCP	carbonil cianida m-cloro fenil hidrazona
Km	kanamicina
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Clor	cloranfenicol
actividad GT	actividad glicosiltransferasa
<i>L. citreum</i>	<i>Leuconostoc citreum</i>
Ts	termosensible
<i>cat</i>	cloranfenicol acetil transferasa
<i>L. lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>

Índice de figuras

Figura 1. Estructura de los polímeros de fructosa.....	4
Figura 2. Estructura de los polímeros de glucosa.....	5
Figura 3. Algunas rutas catabólicas de carbohidratos en <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	7
Figura 4. Cascada de fosforilación del sistema fosfotransferasa de azúcares.....	10
Figura 5. Representación esquemática de las regiones de homología seleccionadas para genes seleccionados en <i>L. mesenteroides</i> ATCC 8293	21
Figura 6. Esquema de la estrategia para la fusión de fragmentos mediante reacciones de PCR sucesivas.....	22
Figura 7. Electroforesis en gel de poliacrilamida y geles de actividad in situ del sobrenadante y la fracción insoluble de cultivos crecidos en sacarosa o fructosa.....	28
Figura 8. Comparación del arreglo genético de los loci de transporte y catabolismo de sacarosa que contienen sacarosa hidrolasas de diferentes bacterias.....	31
Figura 9. Comparación del arreglo genético de los genes <i>man</i> y las zonas adyacentes de diferentes bacterias Gram positivas.....	32
Figura 10. Diagramas de contenido de información y valor de expectancia de los motivos detectados en las regiones 5' de las seis posibles glicosiltransferasas de <i>L. mesenteroides</i> ATCC 8293.	33
Figura 11. Estrategia para encontrar genes potencialmente regulados por CcpA en <i>L. mesenteroides</i> ATCC 8293.	35
Figura 12. Diagrama de contenido de información y valor de expectancia de la secuencia <i>cre</i> encontrada en <i>B. subtilis</i> y genes localizados en <i>L. mesenteroides</i> ATCC 8293 con secuencias parecidas a la <i>cre</i> de <i>B. subtilis</i>	36
Figura 13. Diagrama de contenido de información y valor de expectancia (E) de la secuencia <i>cre</i> encontrada para <i>L. mesenteroides</i> ATCC 8293.....	37
Figura 14. Transporte de ¹⁴ C sacarosa, ¹⁴ C glucosa, ¹⁴ C fructosa y ¹⁴ C manosa en <i>L. mesenteroides</i> ATCC 8293 con o sin CCCP.....	41
Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio de digestiones BamHI/EcoRI de pSET5s recombinantes.....	44
Figura 16. Representación esquemática de las estructuras cromosomales antes y después de los eventos de recombinación doble y recombinación simple entre el vector pSET5s recombinante y el cromosoma de <i>L. mesenteroides</i> ATCC 8293.	46

Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa de fragmentos amplificados de DNA genómico de colonias transformadas con los plásmidos pSET5s recombinantes después de intentar el ensayo de reemplazamiento genético.47

Figura 18. Hibridación Southern de DNA genómico con sonda del gen de resistencia a Km marcada con P³²47

Índice de tablas

Tabla 1. Composición del medio de cultivo de <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	16
Tabla 2. Composición del medio de cultivo LB.	16
Tabla 3. Composición del medio YENB.....	17
Tabla 4. Composición del medio SOC.....	17
Tabla 5. Oligonucleótidos empleados en el estudio.....	21
Tabla 6. Actividad específica de glicosiltransferasas en cultivos de <i>L. mesenteroides</i> ATCC 8293 empleando sacarosa como sustrato.....	26
Tabla 7. Actividad específica de fructosiltransferasas en cultivos de <i>L. mesenteroides</i> ATCC 8293 empleando rafinosa como sustrato.....	27
Tabla 8 Genes identificados en el genoma de <i>L. mesenteroides</i> ATCC 8293 como posibles reguladores de las glicosiltransferasas.....	29
Tabla 9. Valores de Expectancia para las secuencias encontradas en las regiones 5´ de los genes de las seis posibles enzimas.	34
Tabla 10. Valores de Expectancia para las secuencias encontradas en las regiones 5´ de los genes detectados con la secuencia cre de <i>L. mesenteroides</i> ATCC 8293.....	37

1. Resumen

Varias especies del género *Leuconostoc* producen exopolisacáridos de glucosa (glucanos) y fructosa (fructanas). Las enzimas responsables de la síntesis de estos polímeros son las glicosiltransferasas que incluyen a las glucosiltransferasas (GTFs) y fructosiltransferasas (FTFs) capaces de sintetizar glucanos o fructanas respectivamente. Mediante estudios bioinformáticos se identificaron tres posibles GTFs y tres FTFs en el genoma de *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293. En el presente trabajo se midió la actividad glicosiltransferasa en cultivos de esta cepa crecidos en diferentes fuentes de carbono, encontrándose que las glicosiltransferasas se expresan en presencia de sacarosa, fructosa y glucosa. Los valores de actividad específica indican que si bien la fructosa no es tan buen inductor de las FTFs como la sacarosa, los niveles de actividad son superiores a los inducidos por este azúcar en otras cepas. Se localizaron en el genoma de *L. mesenteroides* ATCC 8293 regiones con identidad de secuencia a genes que, en otras bacterias Gram positivas, están relacionados con la regulación de la expresión de las glicosiltransferasas. Así, los genes Leum 0544 (CcpA), Leum 1950 (CovR), Leum 0288 (EII BCA PTS de sacarosa) y Leum 1768 (EIIA PTS manosa/fructosa) se propusieron como blancos de mutación para evaluar su efecto sobre la actividad glicosiltransferasa. Se seleccionó un sistema de mutación que se basa en la doble recombinación homóloga entre el genoma y secuencias de homología en el vector termosuicida pSET5s. El resultado de nuestros análisis evidenció que el vector pSET5s no se integró en el genoma de *L. mesenteroides* ATCC 8293, sino que continúa replicándose aún a la temperatura no permisible de 37°C. Esto dificulta la selección de células en las que haya ocurrido el evento poco probable de recombinación por lo que el sistema de mutación no resultó funcional en esta cepa. Adicionalmente, se estudió el transporte de varios azúcares en cultivos de *L. mesenteroides* ATCC 8293 crecidos en diferentes fuentes de carbono. El transporte de fructosa es inducido y el de sacarosa y manosa ocurre en células crecidas en estas fuentes de carbono y en menor medida en células crecidas con fructosa. El transporte de glucosa parece ser constitutivo pues ocurre en igual magnitud tanto en células crecidas en glucosa como en células crecidas en sacarosa y fructosa. La sacarosa y la glucosa tienen al menos dos sistemas de transporte uno de ellos dependiente del gradiente de protones.

2. Introducción

Las bacterias ácido lácticas (BAL) se han empleado por siglos para la producción de alimentos fermentados debido a que su actividad metabólica permite la conservación y genera el sabor característico de estos alimentos (Caplice y Fitzgerald, 1999). El atributo más importante de las BAL es la producción de ácido láctico el cual, entre otras funciones, disminuye el pH del medio provocando un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de microorganismos indeseados. Una propiedad interesante en varios géneros de BAL es su capacidad para sintetizar exopolisacáridos que, entre otras funciones, forman parte de la matriz en la cual crecen embebidos formando biopelículas. Estos polímeros de carbohidratos protegen a los microorganismos de la desecación, fagocitosis, acción de antibióticos, depredación por protozoarios y del estrés osmótico (Cerning, 1990). Los exopolisacáridos pueden ser homopolisacáridos de glucosa (glucanos) o fructosa (fructanas) y su síntesis está catalizada por las GTFs o las FTFs dependiendo de si producen glucanos o fructanas respectivamente. En su conjunto estas enzimas se conocen como glicosiltransferasas.

Las GTFs microbianas catalizan la transferencia de unidades D-glucopiranosil de la sacarosa a moléculas aceptoras. Además de los α -glucanos pueden sintetizar oligosacáridos cuando se adicionan al medio de reacción aceptores eficientes como maltosa y son capaces de hidrolizar la sacarosa si el aceptor es el agua. La síntesis de los α -glucanos se ha observado sólo en BAL (Robyt y Walseth, 1979).

Las FTFs se han encontrado en hongos y plantas además de en bacterias. Las enzimas bacterianas catalizan la transferencia de una unidad fructosilo de la sacarosa a un polímero en crecimiento de fructana así como la transferencia de fructosa a otros aceptores como agua (hidrólisis de sacarosa) y sacarosa o rafinosa produciendo fructooligosacáridos. La síntesis de las fructanas se ha observado en bacterias Gram positivas y negativas (Newbrun y Baker 1968).

Los homopolisacáridos producidos por las glicosiltransferasas tienen importantes aplicaciones comerciales. Debido a su carácter no iónico, biocompatibilidad y biodegradabilidad los glucanos conocidos como dextranas se emplean en la industria farmacéutica en la producción de químicos finos, como sustitutos del plasma, transportadores de hierro y anticoagulantes y en la fabricación de geles para las bioseparaciones cromatográficas (geles de Sephadex®) (Naessens *et al*, 2005). También se usan para el mejoramiento de la textura en la industria alimentaria, como es el caso de

bebidas lácteas, yogures y helados. Las fructanas tienen aplicaciones en el campo de los cosméticos, los alimentos y en la industria farmacéutica como agente hipocolesterolémico y antitumoral (Kaur y Gupta, 2002).

En relación con la regulación de la expresión de las glicosiltransferasas, se ha descrito que en las cepas de *Leuconostoc* las enzimas son inducibles por sacarosa. En *L. mesenteroides* NRRL B-512F se observó, mediante análisis de transcrito, que la expresión de la dextranasa es relativamente baja en presencia de fuentes de carbono diferentes de la sacarosa y se incrementa cuando se añade sacarosa (Quirasco *et al*, 1999).

En *Streptococcus* la expresión de las glicosiltransferasas es constitutiva aunque aumenta en presencia de sacarosa. En *Streptococcus mutans*, las GTFs B, C y D son mucho menos susceptibles a la regulación por sacarosa en comparación con la única FTF presente en este microorganismo (Fujiwara *et al*, 2002).

La expresión de la levansacarasa en *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392 parece ser independiente de la presencia de sacarosa en el medio (Tieking *et al*, 2005).

El laboratorio de Biocatálisis y Tecnología Enzimática ha centrado su atención durante años en el estudio de varias cepas de *L. mesenteroides* y las glicosiltransferasas producidas por estos microorganismos. Se han caracterizado varias enzimas y expresado en sistemas heterólogos (Morales-Arrieta *et al*, 2006; Olvera *et al*, 2007).

En general se conoce muy poco acerca de los mecanismos de inducción por sacarosa de las glicosiltransferasas en las cepas de *Leuconostoc*. Por esta razón el interés de este proyecto fue contribuir al conocimiento en este tema a través de la búsqueda de genes relacionados con la inducción de estas enzimas. Como parte indispensable para contribuir con este objetivo fue necesario buscar y desarrollar herramientas de Biología Molecular efectivas en el género *Leuconostoc*.

3. Antecedentes

3.1 Fructosiltransferasas y fructanas

Las FTFs bacterianas pertenecen a la familia 68 de las glicosil hidrolasas. Son enzimas extracelulares que rompen el enlace glicosídico de la sacarosa (y en algunos casos de la rafinosa) y usan la energía liberada para acoplar una unidad de fructosa a diferentes aceptores. Entre éstos se encuentran la propia sacarosa, el polímero de fructosa en crecimiento (transfructosilación), el agua (hidrólisis) y otros azúcares como la rafinosa (reacción de aceptor). Las fructanas bacterianas contienen una unidad de glucosa no reductora al final de la cadena pues la sacarosa se usa como aceptor en la reacción inicial de cebado (French y Waterhouse, 1993). Las fructanas microbianas alcanzan un alto peso molecular y desde el punto de vista de la estructura de los enlaces se han descrito dos tipos: inulina, con enlaces β -2-1 y ramificaciones β -2-6 así como levana, con enlaces β -2-6 y ocasionalmente ramificaciones β -2-1 (Figura 1). Por esta razón las FTFs se clasifican como inulosacarasas (E.C 2.4.1.9) y levansacarasas (E.C 2.4.1.10).

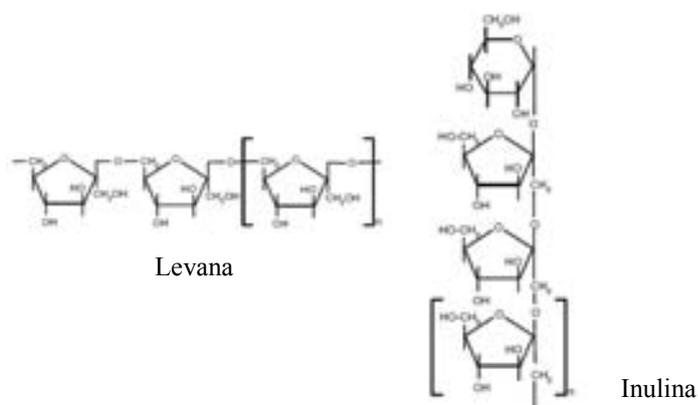


Figura 1. Estructura de los polímeros de fructosa.

Las inulosacarasas se han encontrado exclusivamente en BAL mientras que las levansacarasas están ampliamente distribuidas tanto en bacterias Gram negativas como positivas.

En el genoma de *L. mesenteroides* ATCC 8293, recientemente publicado (<http://genome.jgi-psf.org/leume/leume.home.html>), se identificaron tres levansacarasas demostrándose que dos de ellas, LevC y LevL, son funcionales en un sistema heterólogo (Olvera *et al.*, 2007).

En *Escherichia coli*, se han expresado heterológamente una gran diversidad de genes que codifican para las FTFs para su caracterización. Tal es el caso de las levansacarosas de *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus sanfranciscensis* y *L. mesenteroides* (van Hijum *et al*, 2004; Tieking *et al*, 2005; Olvera *et al*, 2007) y de las inulosacarosas de *L. reuteri* (van Hijum *et al*, 2002) y *Leuconostoc citreum* (Olivares Illana *et al*, 2003)

3.2 Glucosiltransferasas y glucanos

Las GTFs (EC 2.4.1.5) pertenecen a la familia 70 de las glicosil hidrolasas. Estas enzimas son extracelulares y con masas moleculares promedio de 160 kDa. Las GTFs escinden el enlace glicosídico de la sacarosa y utilizan la energía liberada para acoplar una unidad de glucosa a una cadena de glucano en crecimiento (transglucosilación), al agua (hidrólisis) o a otro sustrato aceptor (reacción de aceptor). De acuerdo al tipo de glucano sintetizado las GTFs se clasifican en dextransacarosas, productoras de dextranas, alternansacarosas (alternana), mutansacarosas (mutana) y reuteransacarosas (reuterana). Los glucanos microbianos son polímeros de alto peso molecular cuya producción se ha reportado en cuatro géneros de BAL: *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Weisella* y *Lactobacillus* spp. (Fujiwara *et al*, 2002; Naessens *et al*, 2005). En el genoma de *L. mesenteroides* ATCC 8293, se identificaron tres dextransacarosas potenciales con alta identidad de secuencia con dextransacarosas de otras cepas de *L. mesenteroides* (Olvera *et al*, 2007). La Figura 2 muestra los diferentes tipos de glucanos producidos en BAL.

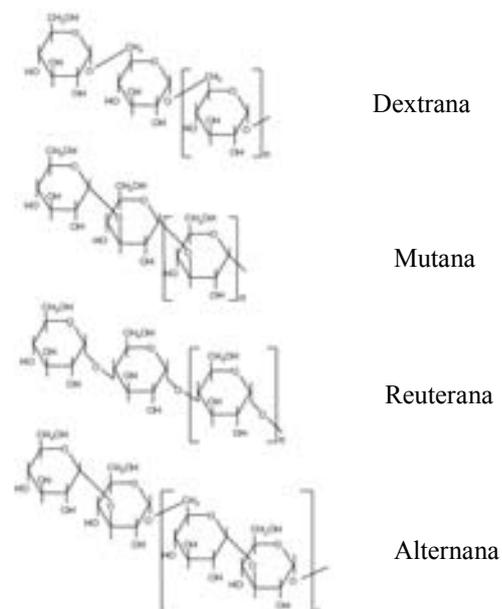


Figura 2. Estructura de los polímeros de glucosa.

La dextrana está formada por enlaces α -1-6 en la cadena principal y es sintetizada por varias BAL como *L. mesenteroides* y *Lactobacillus* spp. La mutana es un glucano lineal con más del 50% de los enlaces α -1-3 producido en *S. mutans* (y otras especies de *Streptococcus*) y en *Lactobacillus reuteri* ML1. La reuterana es un glucano compuesto mayoritariamente por enlaces glicosídicos α -1-4 producido por enzimas de cepas de *L. reuteri* (121 y ATCC 55730). La alternana tiene enlaces alternos α -1-6 y α -1-3 y la producen enzimas de cepas de *L. mesenteroides*. En la cepa de *L. mesenteroides* B-1299 se han caracterizado enzimas que producen un α -glucano que incluye en su estructura enlaces glicosídicos α -1-2 (Seymour *et al*, 1979).

3.3 *L. mesenteroides*. Aspectos metabólicos y genéticos

Las especies del género *Leuconostoc* son bacterias ampliamente distribuidas en el medio ambiente. Se caracterizan por ser cocos, Gram positivos, anaerobios facultativos, no móviles e incapaces de formar esporas. Estos microorganismos tienen complejos requerimientos nutricionales para su crecimiento como vitaminas y aminoácidos (Garvie, 1986). Probablemente es la especie de BAL más abundante en frutas, vegetales y vegetales fermentados. Recientemente se demostró que *L. mesenteroides* subp *cremoris* es un potente inductor de la expresión de citocinas del tipo th1: IL-12 y TNF- γ , por lo que estas bacterias también actúan como probióticos (Kekkonen *et al*, 2008).

L. mesenteroides es capaz de utilizar diversas fuentes de carbono como sacarosa, arabinosa, fructosa, galactosa, glucosa, maltosa y xilosa. Este microorganismo crece más rápido en presencia de sacarosa que en presencia de monosacáridos como glucosa y fructosa. En condiciones microaerofílicas lleva a cabo una fermentación heteroláctica por lo que la glucosa u otros azúcares se convierten en cantidades equimolares de D-lactato, etanol y CO₂ por una combinación de las vías de las hexosas monofosfato y las pentosas fosfato (Garvie, 1986) (Figura 3).

Dols y col. (1997) estudiaron las enzimas responsables de la captación y fosforilación de los azúcares en *L. mesenteroides* NRRL B-1299. Mediante ensayos enzimáticos encontraron alta actividad de la glucoquinasa y fructoquinasa así como una sacarosa fosforilasa inducible y una fosfoglucomutasa constitutiva. Sin embargo no detectaron actividad del sistema fosfotransferasa de azúcares (PTS) dependiente de fosfoenolpiruvato (PEP) en presencia de sacarosa, glucosa o fructosa. Se postuló entonces que la sacarosa, la glucosa y la fructosa son captadas por permeasas y que la sacarosa es

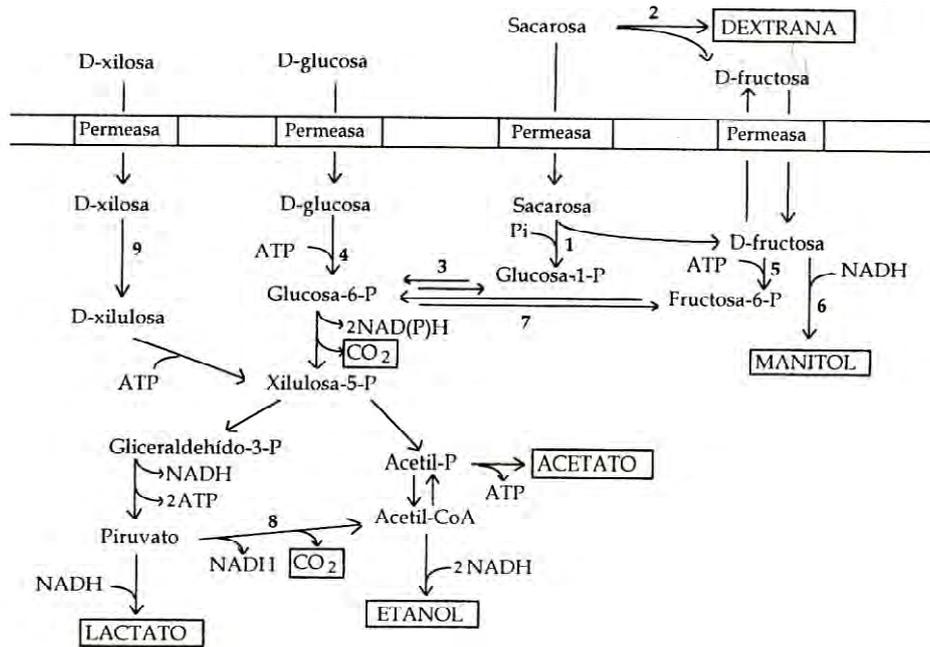


Figura 3. Algunas rutas catabólicas de carbohidratos en *Leuconostoc mesenteroides*. 1- sacarosa fosforilasa, 2- dextransacarasa, 3- fosfoglucomutasa, 4- glucoquinasa 5- fructoquinasa, 6- manitol deshidrogenasa, 7- glucosa 6P isomerasa, 8- piruvato deshidrogenasa, 9- cetol isomerasa. Tomado de: Quirasco, 2001.

fosforilada e hidrolizada concomitantemente por la sacarosa fosforilasa para generar glucosa 1-fosfato y fructosa intracelularmente. La glucosa 1-fosfato es convertida por la enzima fosfoglucomutasa a glucosa 6-fosfato la que entra en la vía de la fosfocetolasa (Dols *et al*, 1997) (Figura 3).

En ese mismo estudio se caracterizó el cultivo con sacarosa como fuente de carbono. En la primera etapa, sólo se consumió la porción glucosa de la sacarosa captada por la célula y se transformó en una mezcla equimolar de lactato y acetato sin producción de etanol o manitol. La porción fructosa se acumuló en el medio de cultivo junto con la asociada a la síntesis de dextrana lo que sugiere que *L. mesenteroides* posee un mecanismo de expulsión de la fructosa. Una vez que se consumió toda la sacarosa se empezó a metabolizar la fructosa y se produjo manitol (Dols *et al*, 1997).

3.4 Expresión de glicosiltransferasas

3.4.1 *L. mesenteroides*

La inducción de la expresión de las glicosiltransferasas por sacarosa se ha estudiado muy poco en el género *Leuconostoc*. Quirasco y col. (1999) estudiaron la expresión del gen *dsrS*, que codifica para la dextransacarasa de *L. mesenteroides* NRRL B-512F. El gen *dsrS* forma parte de un operón monocistrónico que se transcribe con alta eficiencia durante la fase exponencial. En esta cepa la sacarosa tiene un comportamiento atípico como inductor ya que la actividad dextransacarasa se detectó solo después de varias horas de contacto con la sacarosa y la concentración requerida para estimular la producción de la enzima fue muy alta (102 mM). En un fenómeno de inducción clásico se observa la expresión después de pocos minutos de contacto entre las células y el inductor. Se demostró que la regulación de *dsr-S* ocurre a nivel transcripcional y se propone que una molécula involucrada en la captación inicial de la sacarosa o en los pasos metabólicos iniciales podría ser el verdadero activador del gen (Quirasco *et al*, 1999).

En *L. mesenteroides* IBT-PQ se encontró, corriente arriba del gen dextransacarasa *dsrP* y en la cadena complementaria, un ORF cuya secuencia deducida de aminoácidos muestra un 21% de identidad con el regulador Rgg de *Streptococcus gordonii*. Cabe mencionar que el ORF no fue totalmente secuenciado (Fernández, 2003). En *S. gordonii*, Rgg es un regulador positivo del gen adyacente *gtfG*, que codifica para la GTF. Los reguladores tipo Rgg se han encontrado en los genomas de bacterias Gram positivas con bajo contenido G+C como *Streptococcus pyogenes*, *S. mutans*, *Lactococcus lactis*, *lactobacilli* entre otras. Estas proteínas tienen dominios de unión a DNA e influyen en la expresión de genes proximales que codifican para proteínas con función heterogénea (Vickerman y Minick, 2002).

En *L. mesenteroides* se han obtenido cepas que expresan las glicosiltransferasas de forma constitutiva mediante mutagénesis al azar (Kim *et al*, 1997; Kitaoka y Robyt, 1998). Esta característica es deseable en la industria ya que los cultivos crecidos en sacarosa contienen polímero por lo que se vuelven muy viscosos dificultando la agitación, la eliminación de las células del medio y la posterior purificación de las enzimas. El conocimiento de los mecanismos de inducción de las dextransacarasas por sacarosa podría facilitar el diseño racional de cepas constitutivas e incluso superproductoras de enzimas.

3.4.2 *Streptococcus mutans*

Existe un gran interés en identificar genes relacionados con la expresión de las glicosiltransferasas en *S. mutans* por su importancia clínica. *S. mutans* es uno de los principales patógenos involucrado en el desarrollo de caries dentales en humanos (Marsh y Bradshaw, 1999). Este microorganismo produce tres GTFs codificadas por los genes *gtfB*, *gtfC* y *gtfD* y una FTF codificada por el gen *ftf*. Los genes *gtfB* y *gtfC* están organizados en tándem aunque se expresan de forma independiente (Googman y Gao, 2000). Las enzimas GTFB y C sintetizan glucanos insolubles mientras que GTFD produce un polímero soluble. Los glucanos insolubles son los principales constituyentes de las biopelículas de la placa dental y junto con las proteínas de unión a glucano facilitan la adherencia y acumulación de biopelículas estables. La fructana sintetizada por la FTF podría también servir como reserva de energía cuando la disponibilidad de nutrientes es baja. Se ha observado que la expresión de los genes de las glicosiltransferasas en *S. mutans* depende de condiciones nutricionales y ambientales como la velocidad de crecimiento, el pH, la fuente de carbono y el crecimiento en condiciones de biopelículas (Li y Burne, 2001).

3.4.2.1 PTS de clase manosa

En la cepa de *S. mutans* JAM9, deficiente en la proteína EIIAB^{Man} (codificada por el gen *manL*) la expresión de *gtfB* y *gtfC* disminuyó con respecto a la cepa silvestre mientras que la expresión de *gtfD* y *ftf* no se afectó significativamente (Abranches *et al*, 2003).

EIIAB^{Man} es uno de los componentes del PTS de la clase manosa. El PTS es uno de los sistemas de transporte de azúcares en bacterias formado por dos proteínas generales: enzima I (EI) y la proteína fosfotransportadora termoestable (HPr) además de transportadores específicos de los azúcares. En conjunto forman una cascada de fosforilación como la que se muestra en la Figura 4.

La cascada comienza con la autofosforilación de EI por PEP en un residuo de histidina. P~His-EI transfiere el grupo fosforil a HPr que también se fosforila en un residuo de histidina. P~His-HPr funciona como donador del grupo fosfato a los transportadores del PTS que son diferentes proteínas o dominios (IIA, IIB y IIC). Los PTSs de clase manosa, a diferencia de los otros transportadores PTS, están formados por cuatro proteínas o dominios independientes: dos dominios citoplasmáticos (IIA y IIB) y un dominio adicional de membrana (IID) que forma la permeasa junto a IIC (Postma *et al*, 1993). Dentro de los

PTSs de clase manosa, los transportadores de manosa/glucosa (PTS^{Man}) forman un grupo distinto que de manera característica tienen fusionado los dominios IIA y IIB. Estos transportadores tienen especificidad de sustrato una relativa amplia ya que pueden transportar manosa, glucosa, N-acetilglucosamina, fructosa y 2-deoxiglucosa (Zúñiga *et al*, 2005).

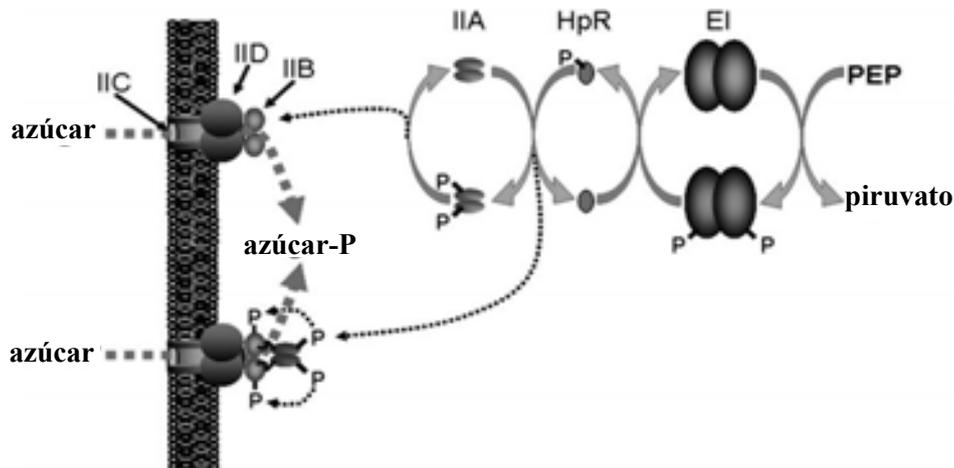


Figura 4. Cascada de fosforilación del sistema fosfotransferasa de azúcares (PTS). PEP: fosfoenolpiruvato, azúcar-P: azúcar fosforilado. Tomado de Zúñiga y col. (2005).

El PTS, además de su papel en el transporte de azúcares, está implicado en varios procesos reguladores. P_{His}-HPr también puede transferir el grupo fosfato a otras proteínas que no son del PTS, controlando sus funciones (Deustscher *et al*, 2002). Adicionalmente, HPr puede ser fosforilada en el residuo de serina 46 por una proteína quinasa dependiente de ATP, activada por metabolito. P_{Ser}-HPr participa en el mecanismo de regulación de la captación de azúcares conocido como exclusión del inductor y en la represión por catabolito carbonado (RCC) donde actúa como cofactor del regulador transcripcional CcpA (Schumacher *et al*, 2004).

3.4.2.2 CcpA

Browngardt y col. (2004) obtuvieron una cepa de *S. mutans* deficiente en el regulador RegM en la que observaron menor expresión de *gtfBC* y *ftf* en diferentes condiciones de disponibilidad de carbohidrato y pH del medio. RegM tiene un alto porcentaje de identidad con CcpA (del inglés, catabolite control protein A), un miembro de la familia LacI de reguladores transcripcionales. En bacterias Gram positivas con bajo contenido de G+C,

CcpA controla la glicólisis, el metabolismo fermentativo, la fijación de amonio y es efector primario de la RCC (Stülke y Hillen, 2000). La regulación por CcpA se ejerce al menos por dos mecanismos: la unión directa a la región promotora de los genes regulados en las secuencias *cre* (elemento de respuesta a catabolito) o la alteración del estado de fosforilación de la proteína HPr (Bruckner y Titgemeyer 2002). En las regiones promotoras de los genes *gtfBC* y *ftf* se identificaron posibles secuencias consenso *cre* lo que sugiere que RegM se une a estos promotores para el control de la expresión de *gtfBC* y *ftf*. No obstante no puede descartarse que RegM altere el estado de fosforilación de HPr lo que a su vez afecte la expresión de estos genes (Brownhardt *et al*, 2004).

3.4.2.3 CovR

El regulador de respuesta CovR, del sistema de dos componentes CovRS, participa en la regulación de la expresión de las glicosiltransferasas en *S. mutans* (Lee *et al*, 2004). Los sistemas de dos componentes juegan un papel importante en la virulencia, adaptación y supervivencia de las bacterias. Un sistema típico consiste en un detector con actividad quinasa que responde a señales específicas modificando el estado de fosforilación de un regulador de respuesta (el segundo componente). Los detectores quinasa usualmente son proteínas integrales de membrana que se autofosforilan a partir de ATP en un residuo conservado de histidina y luego transfieren el grupo fosforil a un residuo conservado de aspártico en el regulador de respuesta. La fosforilación del regulador de respuesta cambia las propiedades bioquímicas de su dominio efector que puede entonces participar en la unión al DNA y el control transcripcional, realizar actividades enzimáticas, unir RNA o involucrarse en interacciones proteína-proteína. Los sistemas de dos componentes pueden funcionar como reguladores globales iniciando una cascada de fosforilación en la cual se apagan o prenden un gran número de genes (Mitrophanov y Groisman, 2008).

En *S. mutans* NG8 la inactivación del operón *covRSX* que codifica para el detector CovS, el efector CovR y CovX (función desconocida), resulta en una sobreexpresión constitutiva de *ftf*. El operón *covRSX* parece regular negativamente la expresión de la FTF a nivel transcripcional. Lee y col. (2004) proponen la hipótesis de que *S. mutans* detecta el nivel de sacarosa en el ambiente lo que conduce a la desrepresión de la transcripción de *ftf*. Este proceso se lleva a cabo probablemente a través de la transferencia de fosfato entre el detector y el regulador de respuesta (CovR). La proteína puede ser CovS pero se requiere mayor respaldo experimental para demostrar esta hipótesis. La proteína CovR fosforilada

provoca entonces un incremento en la transcripción del gen *ftf* ya sea directa o indirectamente. Este mecanismo de regulación aparentemente no es responsable de la expresión inducida por sacarosa de las GTFs porque el nivel de GTFs en la mutante *covR* se mantuvo igual que en la cepa silvestre (Lee *et al*, 2004).

Otro regulador de respuesta, también denominado CovR, se ha relacionado con la represión de la transcripción de los genes *gtfBCD* en *S. mutans* UA159. Se trata de un ortólogo del CovR del sistema de dos componentes CovRS de *S. pyogenes*. Sin embargo para este regulador todavía no se ha identificado el correspondiente ortólogo CovS en el genoma de *S. mutans* UA159. CovR regula negativamente la expresión de *gtfD* (Idone *et al*, 2003), *gtfB* y *gtfC*, en estos dos últimos casos, por unión directa a la región promotora (Biswas y Biswas, 2006).

3.4.3 *Bacillus subtilis*

La síntesis de la levansacarasa de *B. subtilis* (SacB) se induce por la presencia de sacarosa en el medio. El gen *sacB* está ubicado en un operón tricistrónico junto a *levB* y *yveA*, con una región de control cis corriente arriba que se denomina *sacR*. En *sacR* está el promotor del operón y entre éste y la secuencia codificadora de *sacB* hay una región palindrómica (*sacRt*) que forma un terminador transcripcional. La expresión constitutiva de *sacB* se observó como consecuencia de mutaciones en tres loci: *sacR*, *ptsI* y *sacX-sacY* (Lepesant *et al*, 1972). El gen *ptsI* codifica para la enzima EI del PTS, la secuencia deducida de aminoácidos de *sacX* tiene alta identidad con tres enzimas II del sistema PTS de sacarosa y SacY funciona como un antiterminador de la transcripción. Crutz y col. (1990) propusieron un modelo de regulación a partir del análisis del efecto en la expresión de *sacB* de diferentes mutaciones en los genes antes mencionados. En ausencia de sacarosa, el componente EII del PTS de sacarosa, SacX se encuentra fosforilado por EI vía HPr y en esta forma inhibe el antiterminador SacY. La transcripción de *sacB* se inicia constitutivamente pero la elongación del transcrito aborta prematuramente en el terminador intrínseco. Por el contrario, cuando la sacarosa está presente es internalizada y fosforilada por SacX que, a su vez, se desfosforila liberando a SacY de la inhibición que evita la formación del terminador y permite la transcripción del operón de *sacB* (Crutz *et al*, 1990). El sitio específico al que se une SacY en el mRNA naciente se ha designado como RAT (antiterminador ribonucleótido). RAT es una secuencia palindrómica de 29 nucleótidos que se pliega en una estructura de tallo-asa y que sobrelapa parcialmente la quinta parte del

terminador. La estructura del terminador es intrínsecamente más estable que la estructura de RAT por tanto en ausencia del antiterminador se favorece su formación. Por el contrario la unión de SacY estabiliza la estructura RAT lo que evita la formación del terminador y propicia la transcripción de los genes corriente abajo (Aymerich *et al*, 1992). La actividad antiterminadora de SacY es modulada por un mecanismo de fosforilación/desfosforilación en su dominio regulador e involucra varias proteínas del sistema PTS (Tortosa *et al*, 1997). Con respecto a la inducción de SacB adicionalmente se ha propuesto que la expresión del operón de la levansacarasa es modulado por un mecanismo de regulación autógeno positivo. Este lazo de retroalimentación requiere el transcrito de *levB*, el segundo gen del operón, que codifica para una endolevanasa extracelular anclada a la membrana. El transcrito de *levB*, a través de su interacción con SacY, modula positivamente la transcripción del operón a altas concentraciones de sacarosa (Daguer *et al*, 2004).

3.5 Caracterización de genes que codifican para componentes del PTS en *L. mesenteroides*

Lorca y col. (2007) encontraron que *L. mesenteroides* ATCC 8293 posee veinte proteínas en el genoma que tienen identidad con componentes de PTSs según un estudio de genómica comparativa de las capacidades de transporte en bacterias Gram positivas. Siete de estas proteínas tienen identidad con componentes del PTS específico de manosa. También encontraron dos genes que posiblemente codifiquen para las proteínas generales del PTS: HPr y EI. Park y col. (2006) caracterizaron el operón *ptsHI* que codifica para HPr y EI en *L. mesenteroides* SY1. El operón se transcribe de forma constitutiva independientemente de la fuente de carbono. Las proteínas codificadas por estos genes resultaron muy similares a las codificadas por otros *ptsH* y *ptsI* conocidos de bacterias Gram positivas. HPr tiene 80%, 78% y 77% de identidad de secuencia de aminoácidos con HPrs de *S. pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus pneumoniae*, respectivamente. Los puntajes de identidad de secuencia de aminoácidos para EI fueron de 68%, 67% y 66% para *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* y *Oenococcus oeni*, respectivamente. Al igual que en otras bacterias Gram positivas, la proteína HPr quinasa/fosforilasa (HPr K/P), purificada también de *L. mesenteroides* SY1, fosforiló a HPr en su residuo de serina (Park *et al*, 2006). Es probable que este operón sea funcional *in vivo* en *L. mesenteroides* SY1 así como en otras cepas de *L. mesenteroides*.

3.6 Caracterización del gen *ccpA* en *L. mesenteroides*

Por primera vez para *L. mesenteroides* se aisló el gen *ccpA* de la cepa SY1, encontrándose que codifica una proteína con un peso molecular de 36,7 kDa (Park *et al*, 2005). El gen es monocistrónico y está localizado en dirección opuesta al gen *pepQ* (dipeptidasa), una organización genética común en todos los genes *ccpA* de BAL. El promotor de *ccpA* se sobrepone parcialmente con un sitio *cre* por lo que se infiere que, en esta cepa, la transcripción de *ccpA* está reprimida por la unión de CcpA a *cre* cuando la glucosa está presente en el medio. El papel regulador de la proteína CcpA purificada se demostró por su unión al sitio *cre* del gen *aga* (α -galactosidasa) de *L. mesenteroides* SY1, que está sujeto a RCC (Park *et al*, 2005).

Con estos antecedentes resulta interesante conocer las moléculas involucradas y los posibles mecanismos de inducción de las glicosiltransferasas en *Leuconostoc*. En primera instancia, se pueden buscar genes que codifiquen para reguladores transcripcionales y componentes del PTS en el genoma de *L. mesenteroides* ATCC 8293. Este estudio puede aportar información útil en la búsqueda de cepas mutantes constitutivas y/o superproductoras manipulando los genes involucrados en la inducción. Adicionalmente, aunque la expresión heteróloga de las glicosiltransferasas se ha logrado exitosamente (Morales-Arrieta *et al*, 2006; Olvera *et al*, 2007), la actividad enzimática no es tan alta como la que se alcanza mediante la expresión homóloga. Por tanto sería beneficioso desarrollar procesos en los que se obtengan las glicosiltransferasas directamente de este microorganismo bajo condiciones controladas y favorables y además en ausencia de sacarosa.

4. Hipótesis

El estudio de los elementos de regulación de las glicosiltransferasas generará información básica que permitirá diseñar estrategias para su sobreproducción con fines biotecnológicos

5. Objetivo general

Identificar genes que influyen en la expresión de las glicosiltransferasas en *L. mesenteroides* ATCC 8293

5.1 Objetivos específicos

- Determinación de la actividad glicosiltransferasa de *L. mesenteroides* ATCC 8293 en presencia de sacarosa y otras fuentes de carbono empleadas como inductores
- Selección de genes potencialmente relacionados con la expresión de las glicosiltransferasas
- Estudio del transporte de azúcares en cultivos crecidos en diferentes fuentes de carbono
- Generación y evaluación de mutantes en los genes anteriormente seleccionados

6. Materiales y Métodos

6.1 Cepas y medios de cultivo

La cepa *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293 se adquirió de la American Type Culture Collection. La actividad glicosiltransferasa se midió en medio de cultivo para *L. mesenteroides* (LM) (Tabla 1). Para los ensayos de Biología Molecular se empleó el medio MRS (DIFCO) líquido y LM sólido (LM-agar) suplementado con 2% de glucosa.

Como bacteria hospedera de los vectores se empleó la cepa DH5 α de *Escherichia coli* crecida en medio de cultivo Luria Bertani (LB) líquido y sólido (LB-agar) (Tabla 2). Para la preparación de células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α se empleó el medio YENB (Tabla 3) y para su recuperación después de la transformación el medio SOC (Tabla 4).

Las cepas se preservaron en una solución de glicerol al 40% (v/v) a -20°C.

Tabla 1. Composición del medio de cultivo de *L. mesenteroides* (LM)

Componente	Concentración (g/L)
sacarosa	20
extracto de levadura	20
K ₂ HPO ₄	20
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.02
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01
MnSO ₄ · 7H ₂ O	0.01
NaCl	0.01

Tabla 2. Composición del medio de cultivo LB

Componente	Concentración
triptona	20 (g/L)
extracto de levadura	5 (g/L)
NaCl	0.5 (g/L)
KCl	2.5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
glucosa	20 mM

Tabla 3. Composición del medio YENB.

Componente	Concentración (g/L)
medio nutritivo	8
extracto de levadura	7,5

Tabla 4. Composición del medio SOC.

Componente	Concentración (g/L)
bactotripton	10
extracto de levadura	5
NaCl	10

6.2 Actividad glicosiltransferasa en *L. mesenteroides* ATCC 8293 en presencia de diferentes fuentes de carbono

6.2.1 Fermentaciones

Se realizaron fermentaciones de *L. mesenteroides* ATCC 8293 empleando sacarosa ó D-fructosa como fuentes de carbono. Se utilizaron como preinóculos cultivos con tres pases en medio LM con el azúcar (2%) correspondiente. Las fermentaciones se llevaron a cabo en matraces de 250 ml en un volumen de 100 ml de medio LM, 2% de azúcar, 30 °C y agitación orbital de 250 rpm. Los cultivos se detuvieron al final de la fase exponencial que se determinó por absorbancia a 600 nm de acuerdo a los resultados obtenidos en curvas de crecimiento ($D.O_{600nm}$ vs tiempo (horas)) para cada azúcar. Adicionalmente se registró el pH final, en pHmetro (Metrohm), de cada cultivo y se centrifugaron a 12000 r.p.m, 10 minutos. Las células se lavaron dos veces con buffer fosfatos 50 mM, pH 6 y resuspendieron en el mismo buffer. Los sobrenadantes se concentraron por diálisis en glicerol 100% con membranas de 12 kDa de punto de corte.

6.2.2 Medición de la actividad glicosiltransferasa

La actividad glicosiltransferasa en los sobrenadantes y la fracción insoluble se registró monitoreando la liberación de azúcares reductores por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Summer y Howell, 1935). El ensayo de actividad enzimática se realizó en ambas fracciones en un volumen final de 600 μ l, en buffer fosfatos 50 mM, pH 6, a 30 °C, con 100 μ l de sacarosa 1.75 M o rafinosa 11.9 mM y 6 μ l de $CaCl_2$ 100 mM. Se

tomaron muestras de 50 μ l cada 3 minutos a las que se añadió 50 μ l de DNS y se calentaron 5 min a 100 °C. Luego se incubaron 10 minutos en hielo y se adicionaron 0.5 ml de agua destilada para diluir las muestras antes de determinar la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro DU 650 (Beckman). Se utilizó una curva patrón de glucosa con concentraciones entre 0.5-2 mg/ml y la actividad enzimática se reportó en μ Mol/ml.min.

6.2.3 Cuantificación de proteínas

La determinación de proteína se realizó por el método de Bradford utilizando el kit Bio-Rad “protein assay” y el método de Lowry (Bradford M.M, 1976). Se utilizó como patrón albúmina sérica bovina (SIGMA).

6.2.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las proteínas presentes en las fracción insoluble y los sobrenadantes se separaron en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) en una cámara Mighty small II (Amershan Biosciences) con 20mA de corriente. Como gel concentrador se utilizó poliacrilamida al 4%, pH 6.4 y como gel separador poliacrilamida al 8%, pH 8.8. Para visualizar las proteínas, los geles se tiñeron con solución de Azul Coomassie (ácido acético 10%, metanol 30% y azul de Coomassie al 0.2%) durante 30 minutos, seguido de solución desteñidora I (metanol al 50%, ácido acético al 10%) 20 minutos (x2) y solución desteñidora II (metanol al 5%, ácido acético al 1%) hasta visualización deseada.

6.2.5 Geles de Actividad *in situ*

Después de la migración de las proteínas en geles de SDS-PAGE, los geles se lavaron con solución amortiguadora con Tween (buffer fosfatos 50mMm pH 6.5 y Tween 80 al 2%) durante 20 minutos (x3) para eliminar el SDS y permitir la renaturalización de las proteínas. Posteriormente, los geles se incubaron con sacarosa o rafinosa al 10% hasta la visualización de polímero.

6.3 Ensayos de transporte de azúcares

Se midió el transporte de [¹⁴C] sacarosa, D-[¹⁴C] glucosa, D-[¹⁴C] fructosa y D-[¹⁴C] manosa en células enteras de *L. mesenteroides* ATCC 8293, según la metodología de Veyrat y col. (1994). Las células se cultivaron en 20 ml de medio LM en matraces de 250 ml, en presencia de sacarosa ó D-glucosa ó D-fructosa ó D-manosa 1%, 30 °C y agitación orbital de 200 rpm. Cuando los cultivos alcanzaron la mitad de la fase exponencial las células se centrifugaron y lavaron dos veces con PMB frío (buffer fosfato de potasio 10 mM pH 7.4 y MgCl₂ 1mM). Posteriormente las células se resuspendieron en 0.2 mL del mismo buffer. Para la determinación del transporte de cada azúcar se hicieron cuatro ensayos. En uno de ellos se añadió el ionóforo carbonil cianida m-cloro fenil hidrazona (CCCP) 0.1 mM (concentración final en el ensayo). Se utilizó una cantidad de células equivalente a 0.8 mg según la curva de calibración de peso seco de *Lactobacillus casei* BL23. Las células se incubaron a 30 °C y se añadieron mezclas de los azúcares no marcados y marcados: [¹⁴C] sacarosa (0.006 µCi) ó D-[¹⁴C] glucosa (0.006 µCi) ó D-[¹⁴C] fructosa (0.006 µCi) ó D-[¹⁴C] manosa (0.006 µCi), a una concentración final en el ensayo de 125 µM. Se tomaron muestras de 1 ml a los 15 y 30 segundos y 1, 2, 4, 8 y 12 minutos que se filtraron por membranas de 0.45 µm (HAWP 02500, Millipore). Los filtros se lavaron con 16 ml de PMB frío y se disolvieron en líquido de centelleo (Hisafe3, LKB). Se cuantificó la radioactividad en un contador de centelleo (Perkin Elmer, TRICARB 2800 TR).

6.4 Obtención de mutantes

6.4.1 Análisis del genoma de *L. mesenteroides* ATCC 8293

Se obtuvieron las secuencias de los genes *manL*, *regM* y *covRS* de *S. mutans* y *sacX* de *B. subtilis* en el Genbank del National Center For Biotechnology Information (NCBI). Con el programa Genomic-BLAST del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast>) se localizaron en el genoma de *L. mesenteroides* ATCC 8293 (<http://genome.jgi-psf.org/leume/leume.home.html>) las secuencias de aminoácidos que tienen identidad con estos genes. Se empleó el programa MEME (Bailey *et al*, 2006) para identificar secuencias estadísticamente significativas en el genoma de *L. mesenteroides* ATCC 8293. Se utilizó el programa MAST (Bailey *et al*, 2006) para identificar genes que contienen secuencias

reguladoras o potencialmente reguladoras. Con el programa GeConT II (Martínez-Guerrero *et al.*, 2008) se identificaron los genes que pueden estar formando parte de operones.

6.4.2 Manipulación del DNA

Para la extracción del DNA genómico de *L. mesenteroides* ATCC 8293, se empleó el kit Microbial Genomic DNA Isolation Ultra Clean (MO BIO Laboratories Inc). El DNA plasmídico de *E. coli* DH5 α y de *L. mesenteroides* ATCC 8293 se purificó utilizando el kit High Pure Plasmid Isolation (Roche Diagnostics GmbH). En el caso de la purificación del DNA plasmídico de *L. mesenteroides* ATCC 8293 se realizaron modificaciones previas al desarrollo del protocolo del kit según Leathers y col. (2004). Brevemente, las células se resuspendieron en el buffer de suspensión 1 del kit High Pure Plasmid Isolation con lisozima 10 mg/ml y se incubaron 30 minutos a 37 °C. Después se añadió proteinasa K a concentración final 0.2 mg/ml y se incubó 30 min a 55 °C.

6.4.3 Amplificación de fragmentos por PCR

Los oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR se listan en la Tabla 5. Se amplificaron regiones de homología para cada gen a mutagenizar, de aproximadamente 400 nucleótidos, a partir del DNA genómico de *L. mesenteroides* ATCC 8293. Para los genes Leum 0544 y Leum 1950 se amplificaron regiones de homología de la región codificadora del gen (Figura 5A) mientras que para Leum 0288 y Leum 1768 se amplificaron regiones adyacentes a la zona codificadora (Figura 5B). El gen de la resistencia a kanamicina (Km), que codifica para la enzima 3'5'-aminoglicósido fosfotransferasa tipo III (secuencia del GenBank V01547) se amplificó del plásmido PDG780 (Guérot-Fleury *et al.*, 1995). Se utilizaron las enzimas: Taq Platinum DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad CA), ELONGASE enzyme mix (Invitrogen) y Expand High fidelity PCR system (ROCHE) según las instrucciones de los proveedores. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Touchgene Gradient (TECHNE). Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se visualizaron con bromuro de etidio 10 μ g/mL.

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados en el estudio.

La secuencia de corte de la enzima de restricción está subrayada. Km: gen de resistencia a kanamicina.

#	oligonucleótido	secuencia 5'-3'	enzima de restricción	región a amplificar
1	CovR fw	<u>cgg gat cca</u> tga gta aag tat tag ttg tgg	<i>Bam</i> HI	homología 5' de Leum 1950
2	CovR-Km rv	aat ggt tgc ctg ggt tta tcc aaa tta gcc tta act cg		
3	CovR-Km fw	cac gag tta agg cta att tg gat aaa ccc agc gaa cc		Km
4	Km- CovR rv	cga aac aga ctt tgc act tgc atc gat aca aat tcc tgc		
5	Km-CovR fw	cga gga att tgt atc gat cga agt cga aag tct gtt tgc		homología 3' de Leum 1950
6	CovR rv	<u>gga att ctt</u> att ctt ctg atg ggc g	<i>Eco</i> RI	
7	CcpA fw	<u>cgg gat cca</u> tgc aaa aaa agc aaa cgg c	<i>Bam</i> HI	homología 5' de Leum 0544
8	CcpA -Km rv	aat ggt tgc ctg ggt tta tca cca gct aaa aca acc gg		
9	iCcpA -Km fw	cac cgg ttg ttt tag ctg gtg ata aac cca gcg aac c		Km
10	Km- CcpA rv	agc ttc tag acc tgc ttg gta tgc ata caa att cct cg		
11	Km- CcpA fw	tac gag gaa ttt gta tgc ata cca agc agg tct aga agc		homología 3' de Leum 0544
12	CcpA rv	<u>gga att cat</u> taa ttg ttg ttc ctc gtt ttt c	<i>Eco</i> RI	
13	iPTS sac fw	<u>cgg gat ccc</u> gga gca ttt caa ctt ggg c	<i>Bam</i> HI	homología 5' de Leum 0288
14	iPTSSac-Km rv	caa atg gtt cgc tgg gtt tat cgc tgc tcc tct aaa ttt c		
15	iPTSSac -Km fw	<u>gaa att tag</u> agg agc agc gat aaa ccc agc gaa cc		Km
16	Km- iPTSSac rv	cgt ttt ccc ctt ttt tgt atc taa aac aat tca tcc		
17	Km- iPTSSac fw	tac tgg atg aat tgt ttt aga tac aaa aaa ggg gaa aac g		homología 3' de Leum 0288
18	iPTSSac rv	<u>gga att cgc</u> cca cat ttg atg aga cgc c	<i>Eco</i> RI	
19	iPTS man fw	<u>cgg gat cct</u> gtt tac ggt gat cga agg g	<i>Bam</i> HI	homología 5' de Leum 1768
20	iPTSman-Km rv	caa atg gtt cgc tgg gtt tat cac tat atg att ata acg g		
21	iPTSman -Km fw	gtt ceg tta taa tca tat agt gat aaa ccc agc gaa cc		Km
22	Km- iPTSman rv	cct ttc tta att aaa cat ttc taa aac aat tca tcc ag		
23	Km- iPTSman fw	tac tgg atg aat tgt ttt aga aat gtt taa tta aga aag		homología 3' de Leum 1768
24	iPTSman rv	<u>gga att ccc</u> gtg agt caa tcc aac cgc	<i>Eco</i> RI	
25	pSET5s fw	aag ggg gat gtg ctg caa ggc g		inserto en pSET5S
26	pSET5s rv	tgt tgt gtg gaa ttg tga gcg g		
27	intCcpAfw	gtc agc cag cta gtt aat gcg c		Leum 0544 más flancos
28	intCcpArv	tgg cac gcc aaa cca gcc acc g		
29	intCovRfw	gct caa tgg cga gca ttc ttc c		Leum 1950 más flancos
30	intCovRrv	aat cgc ttc tac cga cgt gg		
31	intSacfw	gca gcg agc tca cgt tta gtc g		Leum 0288 más flancos
32	intSacRrv	atc gcc cgt ttc tcc cct gcc		

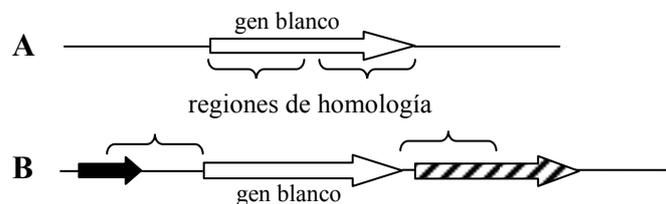


Figura 5. Representación esquemática de las regiones de homología seleccionadas para: **A.** Leum 0544 y Leum 1950 y **B.** Leum 0288 y Leum 1768

6.4.4 Fusión de fragmentos por PCR

En la Figura 6 se esquematiza el procedimiento utilizado para la fusión de las regiones de homología con el casete de resistencia a kanamicina, para cada gen.

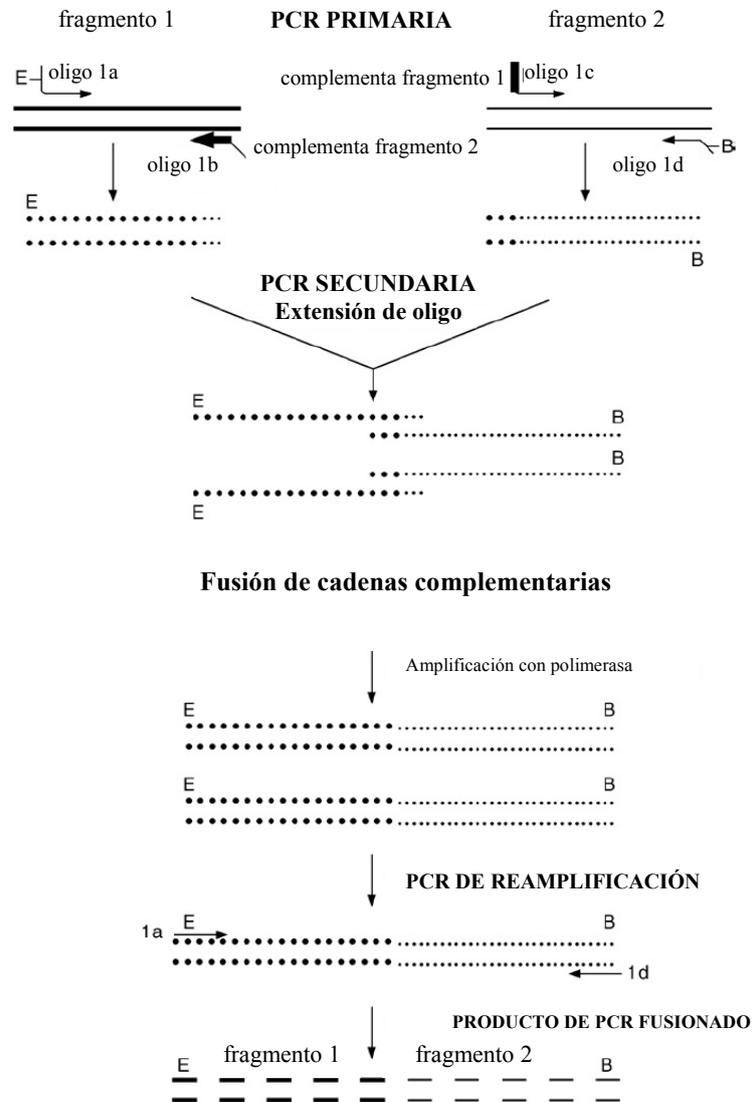


Figura 6. Esquema de la estrategia para la fusión de fragmentos mediante reacciones de PCR sucesivas. El oligonucleótido 1b tiene una región de homología con el fragmento 2; el oligonucleótido 1c tiene una región de homología con el fragmento 1. Adaptado de Elion y col. (2007)

Los oligonucleótidos empleados en la PCR primaria, para la amplificación de cada fragmento, se diseñaron de forma tal que contienen, en el (los) extremo(s), la(s) secuencia(s) complementaria(s) al (los) fragmento(s) con el (los) que se van a fusionar. En la PCR secundaria, los productos de la PCR primaria, actúan como mega oligonucleótidos de secuencias complementarias entre sí. Se realizó una tercera reacción de PCR con los

productos de fusión utilizando los oligonucleótidos de los extremos 5' y 3' de cada construcción. Después de cada PCR los fragmentos se purificaron con el kit High Pure PCR Product Purification (ROCHE) siguiendo las instrucciones del proveedor. Las fusiones se obtuvieron con una relación equimolar de los fragmentos a fusionar.

6.4.5 Vectores

Para el subclonaje de los fragmentos fusionados provenientes de las PCRs y transformación en *E. coli* DH5 α , se empleó el vector pBAD/TOPO (Invitrogen). Para la transformación en *L. mesenteroides* ATCC 8293, se empleó el vector termosensible pSET5s (Takamatsu *et al.*, 2001).

6.4.6 Ligación

La ligación en pBAD/TOPO (Invitrogen) se realizó según las instrucciones del proveedor. Para la ligación en pSET5s el vector se digirió con *Bam*HI/*Eco*RI (*BioLabs*), se incubó 1h con fosfatasa alcalina (*BioLabs*) y se purificó con el kit High Pure PCR Product Purification (ROCHE). Los insertos y el vector purificados se mezclaron en una relación molar 3:1 y se emplearon las ligasas: Quick T4 DNA ligasa (*BioLabs*) o T4 DNA ligasa (Fermentas) según las instrucciones del proveedor.

6.4.7 Transformación en *E. coli* DH5 α

Se prepararon células de *E. coli* DH5 α electrocompetentes según el método de Seidman y col. (2003). Se cultivaron células DH5 α en 1L de medio YENB a 37°C, 200 r.p.m hasta D.O. 600 nm entre 0.5-0.9. Las células se centrifugaron a 4000 r.p.m, 15 min, a 4 °C y se lavaron dos veces con 100 ml de agua fría, estéril y una vez con 20 ml de glicerol 10% frío, estéril. Finalmente, se resuspendieron en 2 ml de glicerol 10% estéril, se alicuotaron y almacenaron a -70 °C. Para la electroporación se tomó hasta 1 μ g de la reacción de clonación y se mezcló con un vial de células electrocompetentes. Estas mezclas se transfirieron a cubetas de electroporación (Bio-Rad) frías de 0.1 cm de distancia interelectrodo y se transformaron en una unidad Micro-Pulser (Bio-Rad) con un voltaje de 1.8 kV. Inmediatamente, las mezclas en las celdas de electroporación se diluyeron en 1 ml

de medio SOC y se incubaron 1h a 37°C. Finalmente se dispersaron en placas de LB-agar-ampicilina 200 µg/ml y Km 25 µg/ml e incubaron a 37°C durante 12 h para el aislamiento de colonias.

6.4.8 Transformación de *L. mesenteroides* ATCC 8293

Para la preparación de las células electrocompetentes y la transformación en *L. mesenteroides* ATCC 8293 se empleó el método descrito por Jeong y col. (2005). Se puso a crecer un cultivo de *L. mesenteroides* ATCC 8293 en 100 ml de MRS suplementado con LD-treonina 40 mM a 30 °C hasta una D.O. a 600 nm entre 0.4-0.6. Una vez alcanzado este punto, las células se lavaron dos veces con 10 ml de MgCl₂, 10 mM frío y una vez con 10 ml de sacarosa 0.5M / glicerol 10 %. Finalmente las células se resuspendieron en 0.5 ml de sacarosa 0.5M / glicerol 10 %, se hicieron alícuotas de 50µl y se almacenaron a -70 °C. Para la electroporación se mezclaron hasta 8 µg de DNA plasmídico en un vial de células electrocompetentes y se transfirieron a cubetas de electroporación (Bio-Rad) frías con 0.1 cm de distancia interelectrodo. Se electroporó a un voltaje de 1.8 kV en una unidad Micro-Pulser (Bio-Rad) e inmediatamente se añadieron 0.5 ml de medio MRS suplementado con MgCl₂ 80 mM. Se incubó 2h para recuperar las células y se dispersaron en LM-agar-glucosa 2%, cloranfenicol (clor) 8 µg/ml y Km 2 mg/ml.

6.4.9 Ensayo de reemplazamiento genético

Las células recombinantes, transformadas con pSET5s se crecieron en MRS, a 30 °C, con Km 0.5 mg/ml y Clor 8 µg/ml hasta una D.O_{600nm} de 0.5. A partir de este cultivo se realizaron diferentes diluciones en MRS con Km 0.5 mg/ml y se crecieron a 30 °C hasta una D.O_{600 nm} entre 0.2 y 0.3. Posteriormente, los cultivos se incubaron a 37 °C durante 4h seguido de dispersión en cajas de LM-agar-Km 2mg/ml e incubación a 37°C. Las colonias fueron contraseleccionadas en cajas de LM-agar-Km 2 mg/ml y LM-agar-Clor 8 µg/ml. Las colonias obtenidas se evaluaron por PCR e Hibridación Southern.

6.5 Hibridación Southern

Se purificó el DNA genómico de las colonias a evaluar, empleando el método anteriormente descrito y se digirió con *EcoRI* ó *PstI* (*Biolabs*) según las instrucciones del proveedor. Las bandas resultantes se separaron en electroforesis de agarosa 1% y se transfirieron por capilaridad a membranas de nylon Hybond-N+ (*Amershan Biosciences*). Las membranas se hibridaron con una sonda del gen de resistencia a Km marcada con [³²P]dCTP (3000Ci/mmol) empleando el kit Rediprime II Random Prime Labelling System. Finalmente, las membranas hibridadas fueron expuestas en una pantalla y las imágenes se obtuvieron en el PhosphorImager (*Molecular Dynamics*).

6.6 Secuenciación

Las secuencias se obtuvieron en un secuenciador automático Applied Biosystem 3100 en la Unidad de Secuenciación Automática de DNA del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

7. Resultados y Discusión

7.1 Actividad glicosiltransferasa en *L. mesenteroides* ATCC 8293 en presencia de diferentes fuentes de carbono

Con el objetivo de comparar la expresión enzimática en diferentes fuentes de carbono, se midió la actividad glicosiltransferasa (GT) en cultivos de *L. mesenteroides* ATCC 8293 crecidos en medio LM con 2% de sacarosa, glucosa, fructosa o xilosa. Para registrar la actividad se empleó el método del DNS que mide la liberación de azúcares reductores (Summer y Howell, 1935). Se detectó actividad GT tanto en la fracción soluble como insoluble de todos los cultivos con excepción del cultivo en xilosa. En la literatura está ampliamente documentada la actividad GT en *L. mesenteroides* inducida por sacarosa, siendo muy baja la que logran inducir otras fuentes de carbono como glucosa, fructosa y xilosa (Quirasco *et al*, 1999). La mayor actividad GT en *L. mesenteroides* ATCC 8293 se observó en los cultivos crecidos con sacarosa o fructosa. En la Tabla 6 se muestran los resultados de la actividad GT con sacarosa como sustrato, expresados como actividades específicas (unidades de actividad en cada fracción por mg de proteínas en sobrenadante y células).

Tabla 6. Actividad específica (U/mg de proteína total) de glicosiltransferasas (actividad GT) en cultivos de *L. mesenteroides* ATCC 8293 empleando sacarosa como sustrato.

Fuente de carbono	Actividad GT en sobrenadante	Actividad GT asociada a células
sacarosa	0.48	0.09
fructosa	0.19	0.06

Los resultados obtenidos indican que, en ambos cultivos, tanto en el sobrenadante como en las células hay actividad GT, siendo mayor en el sobrenadante. Es importante aclarar que la actividad GT en presencia de xilosa es aproximadamente cero lo cual nos permite afirmar que está ocurriendo la inducción de glicosiltransferasas en presencia de sacarosa y fructosa. Las glicosiltransferasas se excretan al medio extracelular y también pueden estar asociadas a la pared de la célula o incluso a polímeros insolubles en el caso del cultivo con sacarosa. Castillo y col. (1992) también encontraron, en doce cepas de *L. mesenteroides*, actividad en presencia de sacarosa en ambas fracciones aunque en algunos casos fue mayor la asociada a células. En la propia cepa ATCC 8293, Olvera y col. (2007) observaron bandas asociadas a la síntesis de polímero (tres en el sobrenadante y cuatro en la fracción

insoluble provenientes de un cultivo crecido con sacarosa) en un gel de actividad *in situ* incubado con sacarosa.

La mayor actividad específica se observa en el cultivo crecido en sacarosa en ambas fracciones lo que confirma que la sacarosa es el principal inductor de las glicosiltransferasas. La diferencia en actividad específica entre los cultivos crecidos en sacarosa y fructosa es más importante en la fracción soluble siendo 2.5 veces más alta en el cultivo en sacarosa. No obstante, en *L. mesenteroides* NRRL B-512F, la actividad dextransacarasa en el sobrenadante del cultivo en fructosa fue sólo el 2.1% con respecto al de sacarosa (Quirasco *et al*, 1999). En *L. mesenteroides* ATCC 8293 observamos un comportamiento diferente con respecto a la expresión de las glicosiltransferasas en cultivos crecidos en otras fuentes de carbono lo que quizás implique la existencia de mecanismos de regulación diversos o alternos. La posibilidad de contar con una cepa productora de las enzimas en ausencia de sacarosa y por tanto que no sintetizen polímero en el cultivo puede representar una ventaja tanto en la investigación como en la industria.

Con el fin de medir la actividad de las FTFs, el ensayo enzimático en ambas fracciones, para cada cultivo también se realizó empleando rafinosa como sustrato ya que éste azúcar es un sustrato exclusivo de las FTFs (Tabla 7).

Tabla 7. Actividad específica (U/mg de proteína total) de fructosiltransferasas en cultivos de *L. mesenteroides* ATCC 8293 empleando rafinosa como sustrato.

Fuente de carbono	Actividad en sobrenadante	Actividad asociada a células
sacarosa	0.22	0.05
fructosa	0.05	0.04

Como puede constatarse, las FTFs se expresan en ambas fracciones en cultivos crecidos en presencia de sacarosa o fructosa habiendo una mayor inducción en el sobrenadante. Este resultado concuerda con lo reportado por Olvera y col. (2007), quienes detectaron bandas asociadas a polímero en un gel de actividad *in situ* incubado con rafinosa, tanto en el sobrenadante como en la fracción asociada a células, en cultivos de *L. mesenteroides* ATCC 8293 crecidos con sacarosa. La fructosa no es tan buen inductor de las FTFs en esta cepa, ya que la actividad específica en el sobrenadante fue tan sólo del 20 % con respecto a la obtenida en la inducción con sacarosa.

Para visualizar las enzimas capaces de sintetizar polímero se hicieron geles de SDS-PAGE y ensayos de actividad *in situ* de los sobrenadantes y de la fracción insoluble de los cultivos crecidos en presencia de sacarosa o fructosa. Los geles de electroforesis de

proteína se incubaron *in situ* con los sustratos sacarosa o rafinosa para identificar las bandas de proteína correspondientes a glicosiltransferasas (Figura 7).

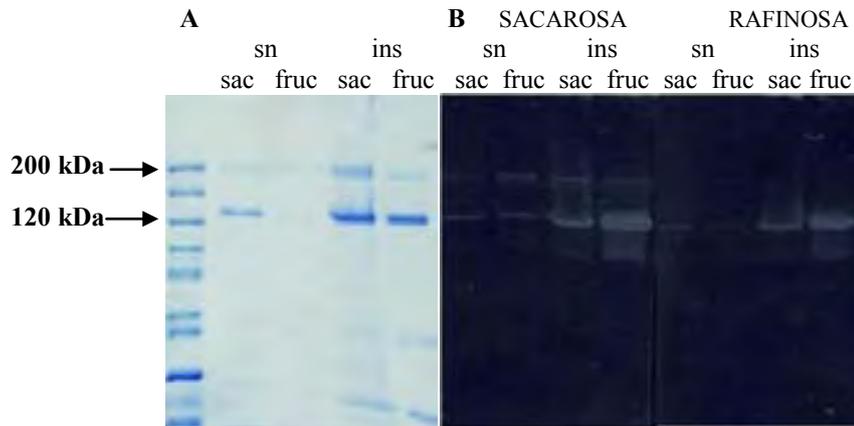


Figura 7. *A* Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% en condiciones desnaturalizantes del sobrenadante (*sn*) y la fracción insoluble (*ins*) de cultivos crecidos en sacarosa (*sac*) o fructosa (*fruc*). *B* Gel de actividad *in situ* incubado con sacarosa o rafinosa como sustrato.

En el gel de SDS-PAGE teñido con azul coomassie se observa una banda alrededor de los 120 kDa, también presente en los geles de actividad *in situ* incubados tanto con sacarosa como con rafinosa y tanto en el sobrenadante como en la fracción insoluble de ambos cultivos. Esta banda corresponde a las FTFs, de las cuales existen tres posibles proteínas, según se predice en el genoma de *L.mesenteroides* ATCC 8293, con un peso molecular teórico muy semejante (Leum 1409 (112 kDa), Leum 1410 (113 kDa) y Leum 1411(112kDa). Estos genes tienen alta identidad de secuencia con el gen de la levansacarasa de *L. mesenteroides* NRRL B-512F (Olvera *et al*, 2007).

En el gel de SDS-PAGE también se observa una doble banda a la altura de los 200 kDa en ambos cultivos y en ambas fracciones. Estas bandas corresponden a GTFs pues no aparecen en el gel de actividad *in situ* incubado con rafinosa. En el genoma de *L. mesenteroides* ATCC 8293 se identificaron tres genes con alta identidad con dextranacarasas de otras cepas de *L. mesenteroides*. Dos de ellos, los genes Leum 1747 y 1752 con pesos moleculares teóricos de 170 y 168 kDa, tienen 100 % y 91 % de identidad, con la DsrS de *L. mesenteroides* NRRL B-512F y la DsrP de *L. mesenteroides* IBT-PQ respectivamente. Sin embargo no podemos asegurar que las bandas de polímero que observamos alrededor de los 200 kDa se deban a las proteínas producto de la expresión de estos dos genes. Se ha observado que estas enzimas sufren proteólisis con facilidad (Sánchez-González *et al*, 1999) por lo que otra posibilidad es que estemos observando los

productos de proteólisis de una enzima y no las proteínas que resultan de la expresión directa de dos genes diferentes.

El tercer gen, que posiblemente codifique para una dextransacarasa, identificado en el genoma de *L. mesenteroides* ATCC 8293 es Leum 0857, con un peso molecular teórico de 313kDa (Olvera *et al*, 2007). En el gel de actividad *in situ* incubado con sacarosa no se observa una banda que pueda asociarse a una proteína producto de la expresión de un gen de este tamaño.

En conclusión, si bien no podemos afirmar con exactitud que genes se están expresando, si podemos confirmar la presencia de GTFs y FTFs, en esta cepa, en los cultivos crecidos en sacarosa y en fructosa.

7.2 Análisis del genoma de *L. mesenteroides* ATCC 8293

7.2.1 Identificación de posibles reguladores de las glicosiltransferasas

Existen muy pocos antecedentes relacionados con la regulación de la expresión de las glicosiltransferasas en el género *Leuconostoc*. Por esta razón, para seleccionar los genes a estudiar en *L. mesenteroides* ATCC 8293 y evaluar su efecto sobre la expresión de estas enzimas, se recurrió a la información disponible para otras bacterias Gram positivas. En *S. mutans* y *B. subtilis* se demostró la influencia sobre la expresión de las glicosiltransferasas de genes que codifican para reguladores transcripcionales y componentes del PTS. Tomando como referencia la secuencia de los genes señalados y empleando el programa Genomic-BLAST del NCBI se encontraron genes con identidad de secuencia de aminoácidos en el genoma de *L. mesenteroides* ATCC 8293 (Tabla 8).

Tabla 8. Genes identificados en el genoma de *L. mesenteroides* ATCC 8293 como posibles reguladores de las glicosiltransferasas.

organismo de referencia	Nombre / # de a.as de la proteína	Genes en <i>L.mesenteroides</i> ATCC 8293	Tamaño de la proteína codificada (a.as)	Identidad (# de residuos comparados)
<i>S. mutans</i>	RegM / 333	Leum 0544	335	52 % (333)
<i>S. mutans</i>	CovR / 235	Leum 1950	235	67% (232)
<i>B. subtilis</i>	SacX / 459	Leum 0288	653	36 % (470)
<i>S. mutans</i>	EIIAB ^{Man} / 330	Leum 1768	314	60 % (331)

A partir de la secuencia de RegM, cuya ausencia disminuyó la expresión de *gtfBC* y *ftf* en *S. mutans* (Browngardt *et al*, 2004), se encontró un gen anotado como CcpA (del inglés,

control catabolite protein). El gen Leum 0544 de *L.mesenteroides* ATCC 8293 tiene 98 % de identidad de secuencia con el gen *ccpA* de *L. mesenteroides* SY1 que fue caracterizado por Park y col. (2005). Estos autores demostraron el papel regulador de CcpA *in vitro* al comprobar su unión al sitio *cre* del gen *aga* (α -galactosidasa) de *L. mesenteroides* SY1. Este constituye el primer reporte de CcpA en *Leuconostoc*.

El segundo gen seleccionado para mutación fue Leum 1950 cuyo producto tiene alta identidad de secuencia con el regulador de respuesta CovR del sistema de dos componentes CovRS de *S. mutans* (Tabla 8). La cepa deficiente en este regulador tiene la capacidad de sobreexpresar constitutivamente la Ftf, por lo que CovR funciona como un regulador negativo (Lee *et al*, 2004). La sobreexpresión constitutiva de las enzimas es una característica deseable tanto en la industria como en el laboratorio por lo que sería interesante saber si la ausencia de Leum 1950 tiene el mismo efecto en *L. mesenteroides* ATCC 8293.

En el genoma de *L. mesenteroides* ATCC 8293 también se encontraron genes cuyos productos tienen identidad con proteínas específicas del PTS de sacarosa y el PTS de manosa/fructosa (Tabla 8). El PTS de sacarosa en *B. subtilis* participa en el mecanismo de regulación negativa de la levansacarasa SacB (Lepesant *et al*, 1972). En *L. mesenteroides* ATCC 8293 se encontró un gen que codifica una proteína con 35% de identidad con SacX denominado Leum 0288 y anotado como componente EII BCA del PTS de sacarosa (Tabla 8). La presencia de un posible PTS para sacarosa resulta interesante pues los transportadores de sacarosa pudieran participar en la inducción de las glicosiltransferasas en *Leuconostoc*. Como ya se señaló, en *L. mesenteroides* NRRL B-512F, la sacarosa no se comporta como un inductor clásico por lo que las señales para la inducción podrían venir de los transportadores de sacarosa y/o los pasos iniciales del metabolismo del disacárido (Quirasco *et al* 1999).

Se analizaron varios *loci* de transporte y catabolismo de sacarosa, descritos en bacterias Gram positivas, para conocer si Leum 0288 se encuentra en un contexto genético semejante (Figura 8). En general los *loci* que contienen componentes del PTS de sacarosa se asocian con el gen de la enzima sacarosa 6-fosfato hidrolasa responsable de la escisión de la sacarosa 6-fosfato, internalizada por el PTS, en glucosa 6-fosfato y fructosa para su posterior metabolismo. También se encuentran genes que codifican para reguladores transcripcionales de la familia LacI, que en algunos casos se han podido relacionar con la regulación de los sistemas de utilización de sacarosa y genes que codifican para la enzima

fructoquinasa que cataliza la fosforilación de la fructosa liberada por acción de las hidrolasas (Reid y Abratt, 2005) (Figura 8).

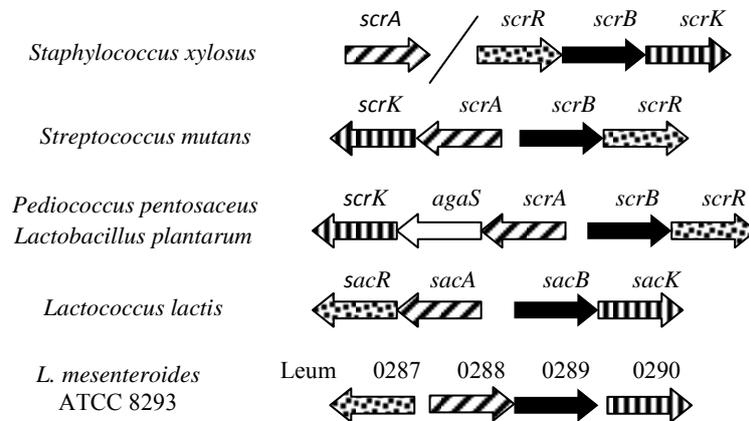


Figura 8. Comparación del arreglo genético de los loci de transporte y catabolismo de sacarosa que contienen sacarosa hidrolasas de diferentes bacterias. Las identidades de los genes se asignaron con base en los nombres de los genes o a los probables productos del gen: *scrA*, *sacA* o Leum_0288: proteína de transporte PTS EII; *scrR*, *sacR* o Leum_0287: regulador de la familia LacI; *scrB*, *sacB* o Leum_0289: sacarosa 6-fosfato hidrolasa; *scrK* o *sacK* o Leum_0290: fructoquinasa. Los patrones de las flechas representan genes similares. Adaptado de (Reid y Abratt, 2005)

En *L. mesenteroides* ATCC 8293, el gen Leum 0288 tiene un arreglo en tándem con el gen Leum 0289 que sugiere que podría estar formando parte de un operón. Leum 0289 está anotado como β fructosidasa y tiene un 45% de identidad a nivel de aminoácidos con sacarosa 6-fosfato hidrolasas de *Bacillus clausii*, *Carnobacterium* y *Bacillus cereus*. Corriente abajo del posible operón se ubica el gen Leum 0290 cuya secuencia deducida de aminoácidos tiene 72% y 58% de identidad con fructoquinasas de *Weissella paramesenteroides* y *Lactobacillus salivarius* respectivamente. Finalmente el gen Leum 0287, que está corriente arriba y divergente del posible operón, está anotado como regulador transcripcional de la familia LacI. El producto de este gen tiene 98% de identidad con el represor del operón de sacarosa de *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* y un 36 % de identidad en promedio con represores de operones de sacarosa de diferentes especies de *Bacillus* (Figura 8). En *L. mesenteroides* ATCC 8293 se conserva el contexto genético de los loci que contienen componentes del PTS de sacarosa por lo que es posible que el sistema de transporte sea funcional.

El otro gen encontrado en *L. mesenteroides* ATCC 8293 es Leum 1768 que codifica una proteína que tiene 60 % de identidad con EIIAB^{Man} de *S. mutans* (Tabla 8). Este

componente del PTS es un regulador positivo de la expresión de *gtfBC* (Abranches *et al*, 2003).

Los transportadores de manosa/glucosa, dentro de los PTS de clase manosa, están codificados en los operones *man* y tienen algunas características distintivas. Los dominios citoplasmáticos IIA y IIB (codificados en *manL*) están fusionados, tienen un componente adicional de membrana IID (*manN*) que forma la permeasa junto a IIC (*manM*) y corriente abajo de *manN* se localiza el gen *manO* de función desconocida (Zúñiga *et al*, 2005). Los agrupamientos *man* se han descrito en algunas bacterias Gram positivas por lo que investigamos si Leum 1768 está formando parte de un agrupamiento tipo *man* (Figura 9).

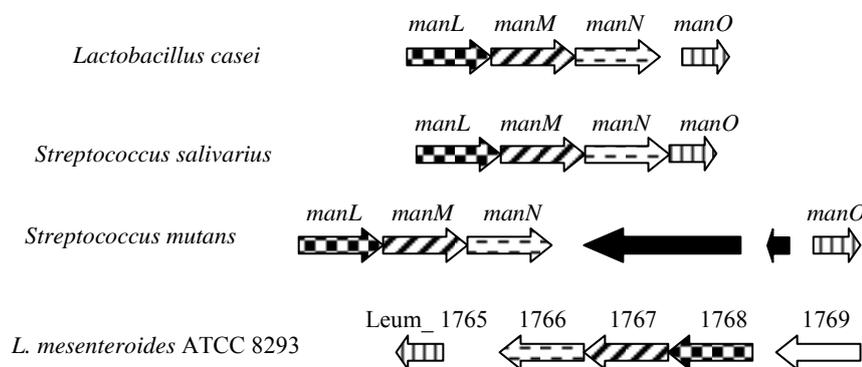


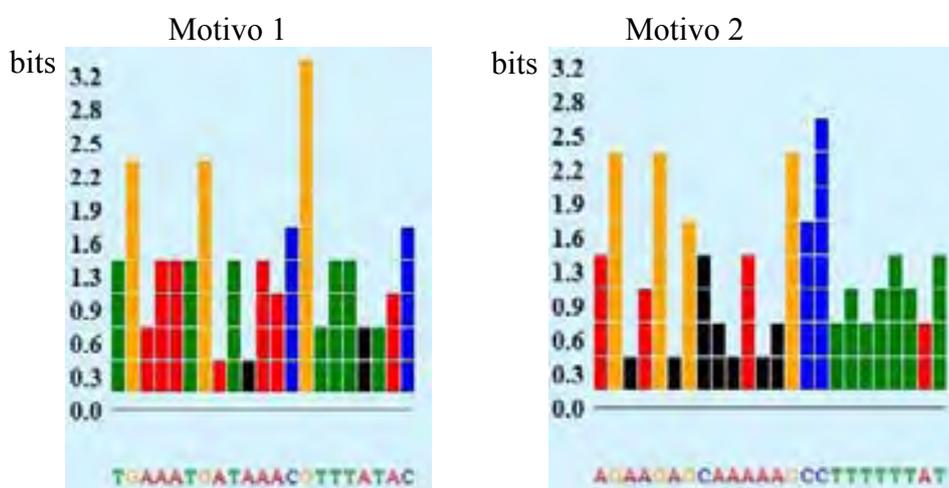
Figura 9. Comparación del arreglo genético de los genes *man* y las zonas adyacentes de diferentes bacterias Gram positivas. Los patrones de las flechas representan genes similares.

El gen Leum 1768 está anotado como componente IIA del PTS de manosa/fructosa aunque tiene un dominio de la superfamilia PTS_IIA_man y otro de la superfamilia PTS_IIB_man y 64%, 63% y 62 % de identidad de aminoácidos con componentes IIAB del PTS de manosa de *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus salivarius* y *S. gordonii*, respectivamente. Leum 1768 tiene un arreglo en tándem con los genes Leum 1767 y Leum 1766 lo que sugiere que puede estar formando parte de un operón. Los productos de estos dos últimos genes tienen alta identidad con componentes EIIC y EIID del PTS de manosa de otras bacterias Gram positivas. Corriente abajo de este grupo de genes aparece el gen Leum 1765 cuya secuencia deducida de aminoácidos tiene 62% y 52% de identidad con los productos de los genes *manO* de *L. citreum* y *S. mutans*, respectivamente. Adicionalmente, en la región 5' del operón *man* predicho, se encuentra el gen Leum 1769 anotado como fosfomanosa isomerasa, una enzima que cataliza la isomerización reversible de la manosa 6-fosfato a fructosa 6-fosfato. Es común encontrar genes catabólicos asociados con los operones que codifican transportadores de azúcares, por lo que la presencia de este gen

sugiere el transporte de manosa por el sistema descrito. En resumen, la presencia del dominio adicional IID, del gen *manO* y los dominios fusionados IIA y IIB apuntan a que el locus predicho puede codificar un PTS específico de manosa/glucosa en esta cepa. Este sistema podría ser responsable no solo del transporte de manosa sino de otros azúcares como glucosa y fructosa debido a su amplia especificidad de sustrato (Zúñiga *et al*, 2005).

7.2.2 Análisis de las secuencias intergénicas de las posibles glicosiltransferasas

La cepa ATCC 8293 es la única de *Leuconostoc mesenteroides* cuyo genoma está completamente secuenciado. Por esta razón se dispone de un gran volumen de información que puede complementar y enriquecer los ensayos experimentales en la búsqueda de elementos reguladores de las glicosiltransferasas en esta cepa. Con el objetivo de conocer si existen secuencias que sean posibles blancos de reguladores transcripcionales, se estudiaron las regiones intergénicas 5' de las seis posibles glicosiltransferasas utilizando el programa MEME (Bailey *et al*, 2006). Se encontraron dos motivos estadísticamente significativos que se representan en la Figura 10 como diagramas de contenido de información.



valor de E: 8.0×10^{-4}

1.6×10^{-2}

Figura 10. Diagramas de contenido de información y valor de expectancia (E) de los motivos detectados en las regiones 5' de las seis posibles glicosiltransferasas de *L. mesenteroides* ATCC 8293.

El valor de expectancia (E) nos habla de la significación estadística del motivo, que es mayor en la medida que E es menor. El motivo 1 tiene un valor de E menor, por tanto, está

mejor conservado que el motivo 2, en las regiones 5' de los genes de las posibles enzimas. El valor de E depende, entre otros parámetros, del número de secuencias analizadas. En este caso, el tamaño de la muestra es pequeño lo que influye en los valores de E obtenidos. En base a los diagramas de contenido de información (Figura 10) podemos ver que, en el motivo 1, las posiciones que ocupan las guaninas son las más conservadas porque son las que brindan mayor información (medida en bits). En el motivo 2, las posiciones más conservadas son las ocupadas por las guaninas y las citocinas.

En el caso de que estas secuencias sean el blanco de reguladores transcripcionales, su presencia en las regiones 5' de otros genes, podría indicar que tienen mecanismos comunes de regulación y aportar información acerca de los posibles reguladores. Así, se buscaron los motivos 1 y 2 en todas las regiones 5' el genoma de *L. mesenteroides* ATCC 8293 utilizando el programa MAST (Bailey *et al*, 2006). Se obtuvo una lista de genes con secuencias en la zona reguladora parecidas a las buscadas. Sin embargo, sólo las detectadas en las zonas reguladoras de las seis posibles enzimas, tuvieron valores de E estadísticamente significativos (Tabla 9). Las secuencias encontradas en la region corriente arriba de los genes que codifican levansacarasa predichas tienen los valores más bajos de E, o sea son muy conservadas con respecto a las secuencias consenso. Esto pudiera influir en el reconocimiento y la unión de los potenciales reguladores transcripcionales e implicar diferencias en la regulación entre FTFs y GTFs.

Tabla 9. Valores de Expectancia (E) para las secuencias encontradas en las regiones 5' de los genes de las seis posibles enzimas.

gen	función probable	valor de E
Leum 1410	levansacarasa	1.9×10^{-12}
Leum 1411	levansacarasa	5.2×10^{-11}
Leum 1409	levansacarasa	2.1×10^{-10}
Leum 1752	dextransacarasa	1.2×10^{-6}
Leum 0857	dextransacarasa	1.4×10^{-6}
Leum 1747	dextransacarasa	1.2×10^{-5}

En conclusión, la presencia de los posibles motivos reguladores sólo en las regiones 5' de los genes de las glicosiltransferasas predichas indica que, de existir algún mecanismo de regulación que implique su reconocimiento, sería específico de estos genes.

7.2.2.1 Elementos de respuesta a catabolito (*cre*)

El regulador transcripcional CcpA se une al DNA en secuencias específicas conocidas como *cre*. Quisimos averiguar si las posibles enzimas de *L. mesenteroides* ATCC 8293 tienen esta secuencia en su región 5' reguladora. En primer lugar, se diseñó una estrategia, basada en los programas MAST y MEME, para encontrar los genes potencialmente regulados por CcpA en *L. mesenteroides* ATCC 8293 (Figura 11).

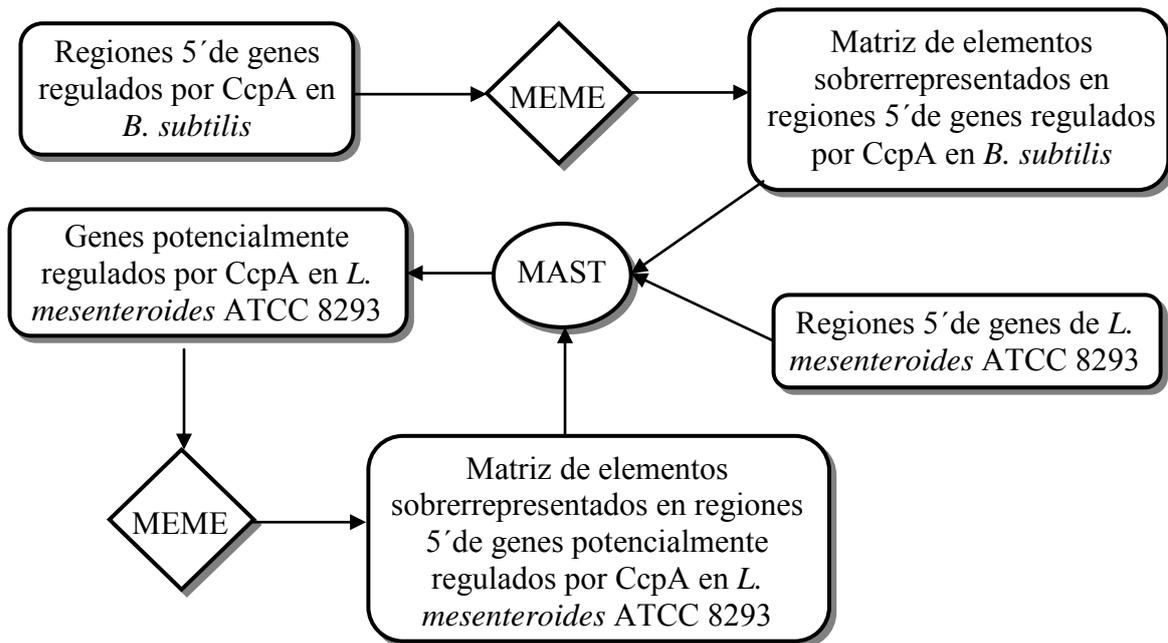


Figura 11. Estrategia para encontrar genes potencialmente regulados por CcpA en *L. mesenteroides* ATCC 8293.

No se ha reportado una secuencia *cre* para *Leuconostoc* por lo que utilizamos como punto de partida una secuencia *cre* de *B. subtilis*. El regulador CcpA de *B. subtilis* (334 a.as) tiene un 48% de identidad global (328 a.as comparados) con la secuencia deducida de aminoácidos del gen Leum 0544 (335 a.as), que posiblemente codifique para el ortólogo correspondiente en *L. mesenteroides* ATCC 8293. Miwa y col. (2000) reportaron la presencia de secuencias *cre* funcionales en las regiones intergénicas de seis genes de *B. subtilis*. Mediante el programa MEME, identificamos una secuencia sobrerrepresentada en las regiones 5' de estos genes, cuyo diagrama de contenido de información se muestra en la Figura 12 A. Seguidamente exploramos la presencia de secuencias parecidas a la *cre* de *B. subtilis* en las regiones 5' del genoma de *L. mesenteroides* ATCC 8293 con el programa

MAST. Como resultado obtuvimos una lista de genes de los cuales mostramos los que tuvieron secuencias con valores de E menores que 1 (Figura 12 B).

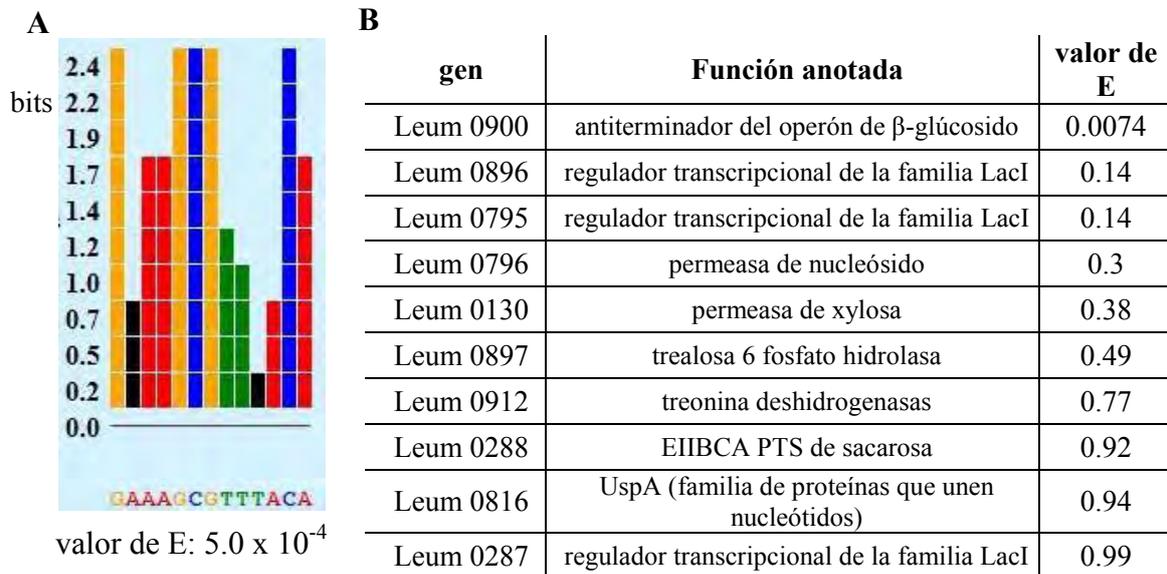
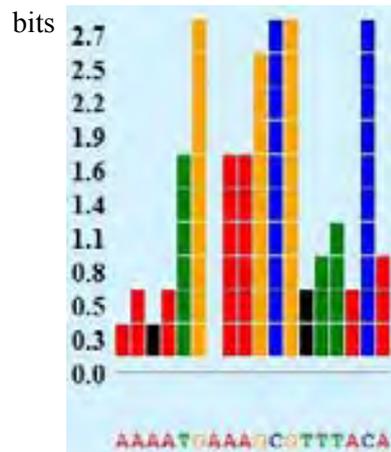


Figura 12. A. Diagrama de contenido de información y valor de expectancia (E) de la secuencia cre encontrada en *B. subtilis*. B. Genes localizados *L. mesenteroides* ATCC 8293 con secuencias parecidas a la cre de *B. subtilis*.

Como puede observarse, la mayoría de los genes con secuencias tipo cre codifican potenciales reguladores transcripcionales y proteínas de transporte de azúcares. Sin embargo, CcpA es un regulador pleiotrópico, relacionado con múltiples procesos celulares (glicólisis, metabolismo fermentativo, fijación de amonio) así como efector primario de la RCC (Stülke y Hillen, 2000), por lo que podemos esperar que un número mayor de genes estén bajo su regulación directa. Por otra parte, si bien hay un alto grado de identidad entre la secuencia de los reguladores de *B. subtilis* y *L. mesenteroides*, es probable que, diferencias en las secuencias cre, impidan la identificación de todos los genes potencialmente regulados por CcpA en *L. mesenteroides* ATCC 8293. Por esta razón, a partir de las regiones 5' de los genes enlistados en la Figura 12 B, obtuvimos una matriz de frecuencias empleando el programa MEME (Figura 13). La secuencia cre definida por esta matriz tiene un valor de E mucho menor que la de de *B. subtilis* por lo tanto tiene mayor significación estadística. Con respecto a la composición de nucleótidos, la secuencia definida por la matriz de frecuencias de *L. mesenteroides* ATCC 8293, en comparación con la de *B. subtilis*, está extendida en su porción 5' con 5 nucleótidos, cuatro adeninas y una timina. La posición que ocupa la timina está más conservada que las que ocupan las

adeninas. En ambos casos, las posiciones más conservadas son las que ocupan las guaninas y las citosinas.



valor de E: $3.5e \times 10^{-55}$

Figura 13. Diagrama de contenido de información y valor de expectancia (E) de la secuencia cre encontrada para *L. mesenteroides* ATCC 8293.

Finalmente, la secuencia cre definida por la matriz de frecuencias para *L. mesenteroides* ATCC 8293, fue utilizada para realizar una nueva búsqueda con el programa MAST en las regiones 5' del genoma. Se detectaron 53 genes cuyas secuencias tienen valores de E menores que 1, cinco veces más que con la secuencia cre de *B. subtilis* (Tabla 10)

Tabla 10. Valores de Expectancia (E) para las secuencias encontradas en las regiones 5' de los genes detectados con la secuencia cre de *L. mesenteroides* ATCC 8293. MFS (del inglés: Major Superfamily Facilitator)

#	gen	Función anotada	valor de E
1	Leum 1064	β-galactosidasa	0.00032
2	Leum 1063	regulador transcripcional de la familia LacI	0.00032
3	Leum 0128	simporte H ⁺ /xilosa	0.00032
4	Leum 0897	trealosa 6 fosfato hidrolasa	0.0007
5	Leum 0896	regulador transcripcional de la familia LacI	0.0007
6	Leum 0977	piruvato oxidasa	0.002
7	Leum 0500	azúcar fosfato isomerasa/epimerasa	0.003
8	Leum 0499	proteína hipotética	0.003
9	Leum 0498	regulador transcripcional de la familia LacI	0.003
10	Leum 0900	antiterminador del operón de β-glucósido	0.0042
11	Leum 2013	fosfo-ribosil-antranilato isomerasa	0.0085
12	Leum 0816	UspA (familia de proteínas que unen nucleótidos)	0.012
13	Leum 0994	permeasa (MFS)	0.013

Resultados y Discusión

14	Leum 1273	EIIA PTS manosa/fructosa	0.013
15	Leum 0795	regulador transcripcional de la familia LacI	0.017
16	Leum 0796	permeasa de nucleósido	0.017
17	Leum 1998	L-ascorbato 6-fosfato lactonasa	0.021
18	Leum 1999	antiterminador de la transcripción	0.021
19	Leum 1692	proteína hipotética	0.026
20	Leum 1961	proteína hipotética	0.026
21	Leum 1245	transportador relacionado con simporte Na ⁺ /xilosa	0.029
22	Leum 0880	transportador relacionado con simporte Na ⁺ /xilosa	0.041
23	Leum 0881	regulador transcripcional de la familia LacI	0.041
24	Leum 1768	EIIA PTS manosa/fructosa	0.05
25	Leum 1769	fosfomanosa isomerasa	0.06
26	Leum 0912	treonina deshidrogenasa	0.06
27	Leum 0130	interconversión de D-xilosa en xilulosa	0.06
28	Leum 0888	regulador transcripcional de la familia AraC	0.066
29	Leum 0890	α -L-arabinofuranosidasa	0.066
30	Leum 0288	EIIBCA PTS sacarosa	0.066
31	Leum 0287	regulador transcripcional de la familia LacI	0.066
32	Leum 0893	permeasa (MFS)	0.1
33	Leum 0852	formación de L-ribulosa a partir de L-arabinosa	0.11
34	Leum 0543	peptidasa	0.15
35	Leum 0544	regulador transcripcional de la familia LacI	0.15
36	Leum 0898	permeasa (MFS)	0.16
37	Leum 1314	transportador relacionado con simporte Na ⁺ /xilosa	0.18
38	Leum 0872	regulador transcripcional del gene de la β -galactosidasa	0.21
39	Leum 0873	proteína hipotética	0.21
40	Leum 0743	nucleasa	0.27
41	Leum 0471	glucosa permeasa	0.27
42	Leum 0845	β -galactosidasa	0.39
43	Leum 0844	regulador transcripcional de la familia AraC	0.39
44	Leum 1224	proteína hipotética	0.39
45	Leum 0507	EIIA PTS	0.49
46	Leum 1875	ATP sintasa FOF1 subunidad a	0.52
47	Leum 0718	fosforibosilcarboxiaminoimidazol	0.55
48	Leum 1280	acetato quinasa	0.66
49	Leum 1281	N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa	0.66
50	Leum 0505	antígeno crosreactivo con miosina	0.66
51	Leum 0697	fosforibosilfosfato sintetasa	0.78
52	Leum 0595	transportador de acidos di y tricarbóxico	0.81
53	Leum 0597	serin quinasa de la proteína HPr	0.81

En el caso de que la secuencia aparezca entre dos genes que se transcriben divergentemente, ambos se incluyeron en la Tabla 10 pues no se sabe cual es el blanco del posible regulador. La mayor parte de los genes codifica para proteínas de transporte y catabolismo de carbohidratos o participan en el metabolismo fermentativo, de acuerdo a su función anotada. Entre los genes que codifican para transportadores de azúcares están los componentes del PTS: Leum 0288 y Leum 1768 mencionados anteriormente (Tabla 8). También aparecen varios genes que posiblemente codifican para reguladores transcripcionales y en menor cantidad genes relacionados con el metabolismo de aminoácidos. Entre los genes de posibles reguladores transcripcionales está Leum 0544 que codifica para la proteína CcpA predicha. Esto quiere decir que CcpA podría estar regulando la transcripción de su propio gen. Los genes que se encontraron con la secuencia *cre* de *B. subtilis* (Tabla 9) volvieron a aparecer con menor valor de E en esta segunda búsqueda con la matriz *cre* construida con las regiones de regulación de *L. mesenteroides* ATCC 8293. Por tanto, a pesar de que existe un gran parecido entre los consensos de los sitios *cre* de *L. mesenteroides* y *B. subtilis*, existen cambios organismo-específicos. La secuencia *cre* definida con la matriz de frecuencias para *L. mesenteroides* ATCC 8293 no se encontró en la región reguladora de los genes de las posibles glicosiltransferasas por lo que no parecen estar reguladas directamente por la unión de CcpA. Sin embargo, no se descarta que la regulación de CcpA sobre estos genes sea de manera indirecta.

7.3 Transporte de azúcares en *L. mesenteroides* ATCC 8293

Teniendo en cuenta que algunos de los genes a investigar son potenciales transportadores del PTS y considerando además el conocido papel regulador de estos sistemas, decidimos estudiar el transporte de varios azúcares en cultivos crecidos en diferentes fuentes de carbono. Se estudió, en primer lugar, el transporte de sacarosa por ser el sustrato de las glicosiltransferasas y principal inductor en el género *Leuconostoc*. En segundo lugar, el de glucosa y fructosa, que en esta cepa, inducen la expresión de las glicosiltransferasas. Finalmente, se incluyó el transporte de manosa por la presencia de genes que tienen identidad con componentes del PTS de manosa en el genoma de *L. mesenteroides* ATCC 8293. Adicionalmente, este sistema podría también ser responsable del transporte de glucosa y fructosa.

Los ensayos de transporte se hicieron en células completas, crecidas en las diferentes fuentes de carbono y azúcares marcados con ^{14}C . En algunos experimentos se incorporó el

ionóforo carbonil cianida m-cloro fenil hidrazona (CCCP), un desacoplador del gradiente de protones. De esta forma podemos obtener información adicional sobre la naturaleza del transportador, específicamente, si requiere de una fuerza protón motriz para llevar a cabo el transporte.

En la Figura 14 A, se muestra el transporte de sacarosa en células crecidas con sacarosa (con y sin CCCP), glucosa o fructosa como fuentes de carbono. El máximo transporte de sacarosa ocurre en células crecidas en presencia de sacarosa. Las células crecidas con fructosa también transportan sacarosa pero sólo con un tercio de la capacidad de transporte observada en las células crecidas con sacarosa. Es posible que la sacarosa entre a la célula a través de algún transportador de fructosa o bien que la fructosa induzca alguno de los transportadores de sacarosa. La presencia de CCCP disminuyó más de la mitad del transporte de sacarosa en células crecidas en sacarosa. Esto indica que la mayor parte del transporte depende de la fuerza protón motriz y por tanto no se trata de un transportador PTS. Estamos en presencia de al menos dos transportadores de sacarosa uno de los cuales no es PTS y dependiente del gradiente de protones.

La entrada de la sacarosa a la célula, mediante una permeasa no-PTS, no implica su modificación química, es decir su fosforilación. En este caso el catabolismo intracelular de la sacarosa se lleva a cabo por la enzima sacarosa fosforilasa responsable de fosforilar la sacarosa en presencia de fosfato inorgánico rindiendo glucosa 1-fosfato y fructosa. En *L. mesenteroides* se ha descrito ampliamente la presencia de sacarosa fosforilasas (Kawasaki *et al*, 1996; Dols *et al*, 1997; Lee *et al*, 2008). En el genoma de *L. mesenteroides* ATCC 8293 se encontró un gen que tiene alta identidad con sacarosa fosforilasas presentes en *Leuconostoc* (99 % con sacarosa fosforilasa de *L. mesenteroides* subp. *cremoris*, *L. mesenteroides* B-1335 y *L. mesenteroides* NRRL B-1149 y 90 % con la de *L. mesenteroides* ATCC 12291). Corriente arriba aparece un gen anotado como permeasa del MFS (Major Facilitator Superfamily). Los *loci* de sacarosa fosforilasas que se han caracterizado en *Bifidobacterium lactis* y *Bifidobacterium longum* también contienen permeasas de sacarosa (Reid y Abratt, 2005). La sacarosa fosforilasa es probablemente la enzima responsable del catabolismo de la sacarosa internalizada vía permeasa no-PTS.

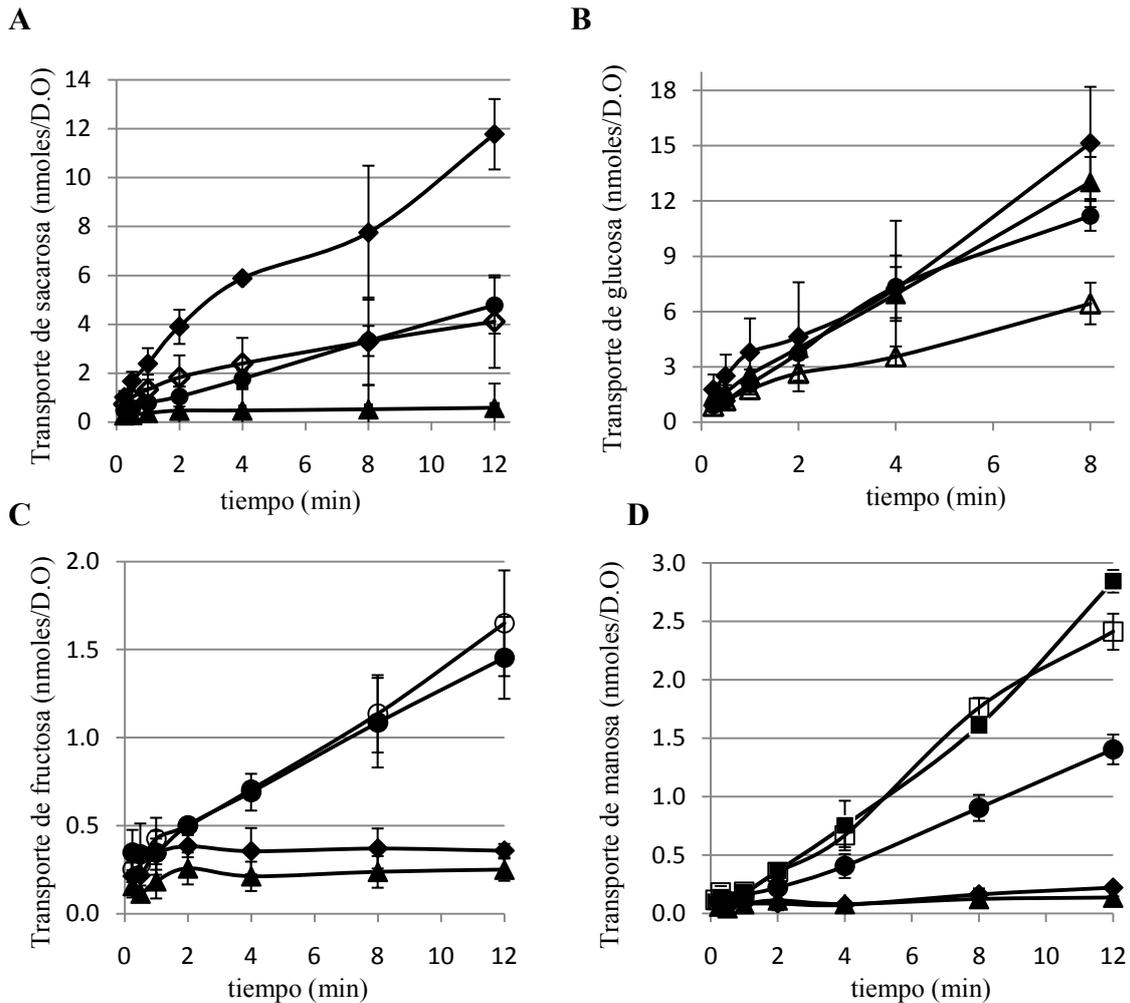


Figura 14. Transporte de ^{14}C sacarosa (A), ^{14}C glucosa (B), ^{14}C fructosa (C) y ^{14}C manosa (D) en *L.m* ATCC 8293 sin CCCP (símbolos cerrados) ó con CCCP (símbolos abiertos). Las células se crecieron en medio LM con 1% de \blacklozenge -sacarosa \blacktriangle -glucosa \bullet -fructosa \blacksquare -manosa.

El transporte de sacarosa, que no es inhibido por CCCP, pudiera llevarse a cabo a través de un PTS de sacarosa, que no es inhibido por CCCP, pudiera llevarse a cabo a través de un PTS de sacarosa como el que identificamos en el genoma de *L. mesenteroides* ATCC 8293. Para confirmar esta hipótesis, medimos actividad PTS en presencia de ^{14}C sacarosa para observar la fosforilación *in vitro* dependiente de PEP según el método de Bettenbrock y col. (1999). Con este ensayo no fue posible detectar actividad PTS específica para sacarosa en extractos celulares crecidos con sacarosa y glucosa como fuentes de carbono. Dols y col. (1997) tampoco detectaron actividad PTS específica para sacarosa y glucosa en *L. mesenteroides* NRRL B-1299 medida por el método de células permeabilizadas. Es posible que la forma y/o condiciones en que se llevan a cabo los ensayos esté enmascarando la actividad PTS o que alguno de los componentes de la cascada de fosforilación (por ejemplo las proteínas generales EI y HPr) no se encuentren en concentración suficiente para detectar la reacción *in vitro*.

En la Figura 14 B, se muestra el transporte de glucosa en células crecidas con glucosa (con y sin CCCP), sacarosa o fructosa como fuentes de carbono. El transporte de glucosa parece ser constitutivo ya que ocurre en igual extensión en cultivos crecidos en presencia de sacarosa y fructosa además de glucosa. Al menos dos tipos de transportadores están involucrados, uno de ellos dependiente del gradiente de protones. Es posible que el transporte de glucosa dependiente del gradiente de protones se deba a un gen detectado en *L. mesenteroides* ATCC 8293 que tiene identidad con miembros de la familia GRP (del inglés, Glucose/Ribose Uptake Porter). Estas proteínas son responsables de la captación de glucosa por un mecanismo protón-simporte (Lorca *et al*, 2007). En el genoma de *L. mesenteroides* ATCC 8293 se identificaron cuatro genes que tienen identidad con componentes del PTS de la familia glucosa/glucósidos (Lorca *et al*, 2007). Sin embargo, tampoco logramos detectar actividad PTS específica para glucosa.

El transporte de fructosa se midió en células crecidas con fructosa (con y sin CCCP), glucosa o sacarosa como fuentes de carbono (Figura 14 C). Sólo se observó transporte en células crecidas en presencia de fructosa. La adición del ionóforo CCCP no modificó el transporte por tanto no es dependiente del gradiente de protones. Los PTS parecen ser los sistemas más frecuentes de utilización de fructosa en bacterias (Loo *et al*, 2003; Barriere *et al*, 2005). Sin embargo, en *L. mesenteroides* ATCC 8293, no se detectaron genes que tengan identidad con componentes del PTS específico de fructosa (Lorca *et al*, 2007), ni actividad PTS específica para fructosa.

El transporte de manosa en células crecidas con manosa (con y sin CCCP), sacarosa, glucosa o fructosa como fuentes de carbono se presenta en la Figura 14 D. La manosa se transporta en mayor extensión en células crecidas en presencia de manosa y en menor medida en células crecidas en presencia de fructosa. La fructosa podría inducir alguno de los transportadores de manosa o la manosa podría entrar a la célula por alguno de los transportadores de fructosa. El transporte de manosa no depende del gradiente de protones. La participación del PTS no se descarta ya que, en el genoma de *L. mesenteroides* ATCC 8293, se encontró un operón que tiene la estructura típica de los transportadores del PTS^{Man}. No obstante, tampoco detectamos actividad PTS específica para manosa.

En general no observamos transporte de sacarosa (Figura 14 A), fructosa (Figura 14 C) o manosa (Figura 14 D) cuando el cultivo se creció con glucosa como fuente de carbono. Esto indica que los sistemas de transporte están reprimidos por la glucosa. Es posible que, en este caso, se esté manifestando el fenómeno de RCC descrito para muchos operones de utilización de azúcares y cuya finalidad es la utilización preferencial de azúcares de rápida

metabolización. La cantidad de glucosa transportada a los ocho minutos es mayor que la transportada por cualquiera de los otros azúcares al mismo tiempo. A partir de ese tiempo el transporte de glucosa se mantuvo estable (resultados no mostrados). Al final del ensayo (12 minutos), se transportaron más nmoles de sacarosa y glucosa que de fructosa y manosa. La sacarosa y la glucosa podrían tener mayor número de transportadores y/o ser de mayor afinidad que los de fructosa y manosa.

En resumen, en *L. mesenteroides* ATCC 8293, el transporte de glucosa parece ser constitutivo y el de fructosa es inducible. La fructosa es capaz de inducir parcialmente el transporte de sacarosa y manosa. Al menos uno de los transportadores de sacarosa y uno de los de glucosa utiliza el gradiente de protones como fuente de energía para el transporte. No podemos concluir en relación con la funcionalidad del PTS en *L. mesenteroides* ATCC 8293, para lo cual deben hacerse estudios transcripcionales y/u obtener mutantes de los posibles genes del PTS.

7.4 Obtención de mutantes

7.4.1 Construcción de fragmentos y clonación

Una vez seleccionados los genes a mutagenizar en *L. mesenteroides* ATCC 8293 (Tabla 8), se procedió a la clonación de fragmentos de DNA correspondientes a regiones de homología de los genes elegidos flanqueando un gen de resistencia a Km, en el vector termosuicida pSET5s. Las regiones de homología de los genes Leum 0544 (CcpA) y Leum 1950 (CovR) se seleccionaron de la parte codificadora, mientras que para los genes Leum 0288 (PTS sacarosa) y Leum 1768 (PTS manosa) se tomaron de las regiones adyacentes al gen (Figura 5). Estos dos últimos genes podrían estar formando parte de operones; la interrupción de un gen que forma parte de un operón impide la expresión de los genes que están corriente abajo. En el evento de doble recombinación homóloga se sustituye el fragmento con las regiones de homología que porta el plásmido por la secuencia que está en el genoma. Al seleccionar regiones de homología adyacentes a la zona codificadora el resultado de la doble recombinación sería la sustitución del gen blanco por el gen de resistencia (sin terminador de la transcripción en estos casos). El objetivo es minimizar el efecto polar de la mutación ya que, los genes que están corriente abajo del gen sustituido no son silenciados, sino que se transcriben bajo el promotor del gen de resistencia a Km.

Se diseñaron oligos para amplificar las regiones de homología de cada gen, con una longitud promedio de 400 nucleótidos cada región. Estas regiones se fusionaron al gen de resistencia a Km mediante PCR sucesivas, como se describe en Materiales y Métodos (oligos 1-24, Tabla 5). Los fragmentos resultantes de la fusión se subclonaron en pBAD/TOPO y se verificó la presencia del inserto producto de la fusión de los tres fragmentos: las dos regiones de homología y el gen de resistencia a Km. La verificación se hizo mediante PCRs con oligos específicos y digestiones *Bam*HI/*Eco*RI. En el caso de la construcción para interrumpir el gen *Leum* 1768 (PTS manosa), se clonó un producto más pequeño de lo esperado en el vector pBAD/TOPO por lo que la mutagénesis de este gen fue descartada en este punto. Seguidamente, se subclonaron en pSET5s, mediante digestiones *Bam*HI/*Eco*RI, los fragmentos de fusión de los genes a mutagenizar. Estas construcciones fueron transformadas en células de *E. coli* DH5 α para la propagación del vector. De esta manera se generaron los plásmidos recombinantes: pSET5s-CcpA-Km (6.8 kb), pSET5s-PTSsac-Km (6.6 kb) y pSET5s-CovR-Km (6.6 kb) y se verificó la presencia de los insertos mediante digestiones *Bam*HI/*Eco*RI (Figura 15).

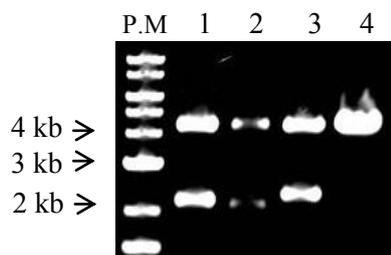


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio de digestiones *Bam*HI/*Eco*RI de pSET5s recombinantes. 1: CovR-Km (2.238 kb) 2: PTSsac-Km (2.174 kb) 3: CcpA-Km (2.377 kb) 4: pSET5s (4.438 kb)

7.4.2 Transformación de *L. mesenteroides* ATCC 8293

L. mesenteroides ATCC 8293 se transformó por electroporación con los plásmidos recombinantes según la metodología de Jeong y col. (2005). Las eficiencias de transformación fueron de 100, 23 y 11 transformantes/ μ g de DNA para pSET5s-CcpA-Km, pSET5s-PTSsac-Km y pSET5s-CovR-Km respectivamente. Estas eficiencias son comparables con las reportadas por Jeong y col. (2006) en *L. mesenteroides* SY1 donde obtuvieron 100 transformantes/ μ g de DNA. Sin embargo, son muy bajas si las comparamos con los resultados de Wyckoff y col. (1991) que obtuvieron en la transformación de *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* 44-4 eficiencias de 2×10^6 y 7×10^5

transformantes/ μg de DNA con plásmidos de 5.7 y 5 Kb respectivamente. Leathers y col. (2004) se basó en la metodología general de Wyckoff y col. (1991) y obtuvo en *L. mesenteroides* NRRL B-21214 una eficiencia de 3.4×10^4 transformantes/ μg de DNA con un plásmido de 4.9 kb. En general se ha observado que la eficiencia de transformación en BAL es dependiente del microorganismo, la cepa y el vector, entre otros factores.

El uso de un vector termosuicida como pSET5s que puede replicarse en BAL, no requiere de altas eficiencias de transformación puesto que el siguiente evento de inserción en el genoma está condicionado por el cambio de temperatura. Sin embargo, se probaron otras metodologías de transformación, buscando mayores eficiencias en futuras aplicaciones con otros sistemas de inactivación como el uso de plásmidos no replicativos. Se probó la metodología de Leathers y col. (2004), que difiere de la usada por nosotros en varios aspectos como las soluciones para la preparación de las células electrocompetentes, parámetros eléctricos como la resistencia, la fuerza del campo eléctrico y la distancia interelectrodo de las celdas de electroporación y el tiempo de recuperación de las células. Sin embargo, las eficiencias de electroporación no fueron mejores que las obtenidas previamente. También se probó la técnica descrita por Helmark y col. (2004) en *Leuconostoc carnosum* 4010, que introduce la glicina en el cultivo celular como debilitador de la pared celular y la de Rodríguez y col. (2007) en *Pediococcus acidilactili* P60, que adiciona un paso de tratamiento con lizozima entre otros cambios. No se obtuvieron transformantes con estas dos últimas metodologías. Consideramos que es necesario hacer un estudio detallado de cada paso del protocolo de electroporación de Jeong y col. (2006) para determinar las condiciones óptimas de electroporación en *L. mesenteroides* ATCC 8293.

7.4.3 Ensayo de reemplazamiento genético y análisis de posibles mutantes.

El empleo de vectores termosensibles (Ts) ha permitido superar el requerimiento de una alta eficiencia de transformación en los sistemas de inactivación en BAL. El replicón Ts puede establecerse y propagarse en una amplia población bacteriana para posteriormente inhibir su replicación a elevada temperatura permitiendo la selección de eventos de baja frecuencia como la recombinación. El vector pSET5s, empleado en este estudio, es un vector termosuicida que se construyó para el reemplazamiento genético en *Streptococcus suis* (Takamatsu *et al*, 2001). Este plásmido, que se replica por el mecanismo del círculo rodante, contiene el origen de replicación Ts del plásmido pG+host3 del linaje de pWV01

y un gen de resistencia a Clor (cloranfenicol acetil transferasa: *cat*). La causa del carácter Ts del origen se atribuye a cuatro mutaciones en la secuencia de la proteína de replicación RepA, responsable del corte de una cadena de DNA en el origen de replicación positivo (Maguin *et al*, 1992).

Con el fin de bloquear la replicación del vector, la temperatura de los cultivos transformados con los plásmidos pSET5s-CcpA-Km, pSET5s-PTSsac-Km y pSET5s-CovR-Km se elevó a 37°C, como se describe en Materiales y Métodos. En la Figura 16, se muestran las estructuras cromosomales esperadas, en el caso de ocurrir el evento de doble o simple recombinación homóloga, entre el vector y el cromosoma. Se realizó un tamizaje masivo, dispersando las células en medio selectivo con Km ó Clor, obteniendo sólo colonias Km^r Clor^r. De haber ocurrido doble recombinación, las células serían Km^rClor^s, por tanto esta variante quedó descartada.

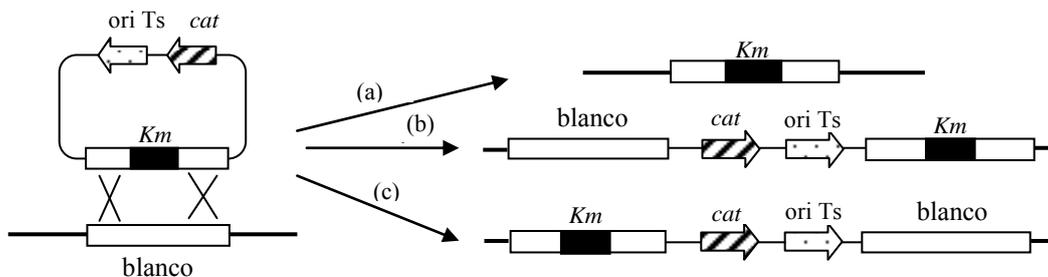


Figura 16. Representación esquemática de las estructuras cromosomales antes (izquierda) y después (derecha) de los eventos de recombinación doble (a) y recombinación simple (b y c) entre el vector pSET5s recombinante y el cromosoma de *L.m* ATCC 8293. *ori Ts*: origen de replicación termosensible, *cat*: gen de resistencia a cloranfenicol, *Km*: gen de resistencia a kanamicina.

Para saber si el vector se está integrando en el genoma mediante un evento de recombinación simple, se diseñaron oligos (Tabla 5, oligos 27-32) que hibridan corriente arriba y corriente abajo de las regiones de homología seleccionadas para cada gen.

En la Figura 17, se pueden ver los fragmentos amplificados a partir del DNA genómico de una muestra de las colonias. El tamaño de los fragmentos obtenidos (1.550 Kb para Leum 0544; 0.9 Kb para Leum 1950 y 2.959 para Leum 0288) y la comparación con el control de células no transformadas, evidencia que no está ocurriendo inserción simple del vector en el genoma a través de las regiones de homología en las colonias analizadas.

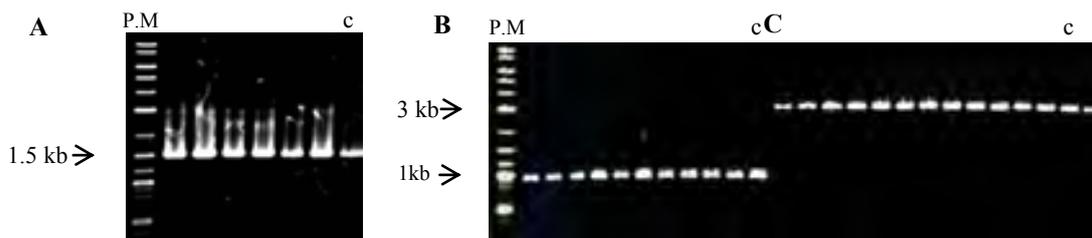


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Fragmentos amplificados de DNA genómico de colonias transformadas con pSET5s-CcpA-Km (A), pSET5s-CovR-Km (B) y pSET5s-PTSsac-Km (C) después de intentar el ensayo de reemplazamiento genético. c: control, células no transformadas.

En todos los casos se amplificó además, el gen de resistencia a Km (resultados no mostrados). Una posibilidad es que el vector se esté integrando inespecíficamente en regiones del genoma con alta frecuencia de recombinación. Por otro lado, podría ser que el vector no se está integrando en el genoma, sino que sigue replicándose en las células aún a la temperatura no-permisiva. Para dar respuesta a estas interrogantes, se analizó el DNA genómico de las muestras anteriores mediante hibridación tipo Southern. El DNA genómico se digirió con dos enzimas de restricción diferentes: *EcoRI* ó *PstI* y posteriormente se hibridó con una sonda del gen de resistencia a Km marcada radiactivamente con P³² (Figura 18).

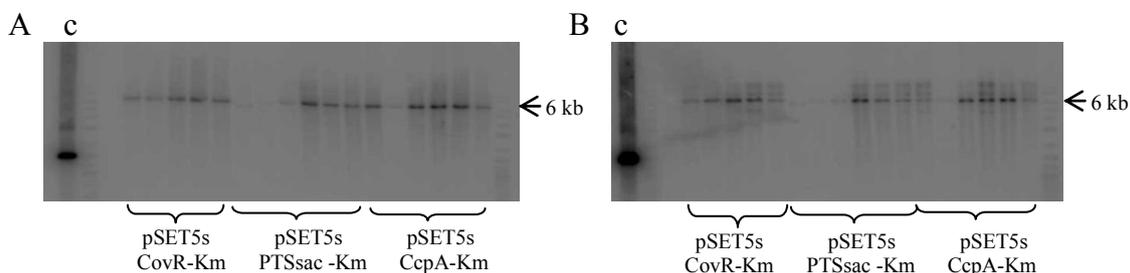


Figura 18. Hibridación Southern de DNA genómico con sonda del gen de resistencia a Km marcado con P³². A. Digestión con *EcoRI* B. Digestión con *PstI*. c: control de la sonda de Km. Se indican los plásmidos que portan las muestras analizadas.

El resultado obtenido fue una única banda a la altura de 6 Kb que es el peso molecular aproximado de los vectores pSET5s recombinantes linearizados. No se observan bandas marcadas con otros pesos moleculares ni hubo diferencias en el peso molecular de las bandas detectadas entre las digestiones con diferentes enzimas. Este resultado nos sugiere que los vectores no se están integrando en el genoma. En vista de que 37°C no es una temperatura no permisiva para el plásmido, al menos en las condiciones de nuestro ensayo, decidimos probar si era posible eliminar el plásmido incrementando la temperatura. Para ello, las cepas de *Leuconostoc* transformadas con las construcciones en pSET5s se

crecieron a 40°C. Aún cuando la viabilidad celular disminuye considerablemente a esta temperatura, el análisis de las colonias reveló que el plásmido sigue replicándose en las células recombinantes.

El origen de replicación Ts se probó anteriormente en otras bacterias como *L. lactis* subsp. *cremoris*, *B. subtilis* y *E. coli*, reteniendo sus propiedad Ts en estos hospederos (Maguin *et al*, 1992). En *L. lactis* se determinó que la temperatura mínima no permisible para la replicación del plásmido portador del origen Ts era de 35°C. Después de 8 horas de crecimiento en medio no selectivo a 37.5°C, sólo el 0.1 % de las células retuvo la resistencia al antibiótico (Maguin *et al*, 1992). El mismo resultado se obtuvo para pSET5s en *Streptococcus suis* después de 4 horas de cultivo a 37°C (Takamatsu *et al*, 2001). En *L.mesenteroides* ATCC 8293, sin embargo, las células retienen el vector a la temperatura no permisible, incluso después de varias horas de incubación, lo que va en detrimento de la selección de colonias donde ocurran eventos de tan baja frecuencia como la recombinación con el genoma.

El desarrollo de técnicas de Biología Molecular en BAL es de vital importancia para el estudio de su fisiología y posterior manipulación. En este trabajo se logró, por primera vez, el aislamiento de plásmidos y la transformación de *L.mesenteroides* ATCC 8293. El empleo del vector termosuicida pSET5s como método de inactivación para la obtención de mutantes no funcionó en esta cepa por lo que deben buscarse otras variantes para interrumpir o eliminar genes de interés.

8. Conclusiones

- En *L. mesenteroides* ATCC 8293 la sacarosa, la fructosa y la glucosa inducen la expresión de las glicosiltransferasas. Aunque la fructosa no es tan buen inductor de las FTFs como la sacarosa, resulta mejor inductor que en otras cepas de *Leuconostoc*.
- Mediante estudios bioinformáticos, se seleccionaron cuatro genes con posibilidad de estar implicados en la expresión de las glicosiltransferasas en *L. mesenteroides* ATCC 8293.
- En las regiones 5' de las posibles GTFs y FTFs, detectadas en el genoma de *L. mesenteroides* ATCC 8293, se encontraron dos posibles secuencias de regulación no compartidas con otros genes de la cepa.
- En las regiones 5' de las seis posibles glicosiltransferasas, no se encontraron secuencias *cre* por lo que es probable que los genes que codifican estas enzimas no estén reguladas directamente por CcpA
- En el estudio del transporte de varios azúcares en cultivos de *L. mesenteroides* ATCC 8293, se observó que el transporte de glucosa se induce en todas las fuentes de carbono estudiadas.
- El transporte de sacarosa y manosa se induce parcialmente en células crecidas con fructosa como fuente de carbono.
- La sacarosa y la glucosa tienen al menos dos sistemas de transporte, uno de ellos dependiente del gradiente de protones mientras que el transporte de la fructosa y la manosa no dependen del gradiente de protones
- Se estandarizaron las técnicas básicas de Biología Molecular en *L. mesenteroides* ATCC 8293 (aislamiento de plásmidos, electroporación)
- A pesar de numerosos intentos no fue posible obtener las mutantes de los genes seleccionados debido a que el sistema de mutagénesis, con el vector termosensible pSET5s, no es funcional en *L. mesenteroides* ATCC 8293. Al analizar las posibles causas de esta situación se encontró que el plásmido sigue replicándose en esta cepa a las temperaturas no-permisibles.

9. Perspectivas

- Se demostró que en los cultivos de *L. mesenteroides* ATCC 8293, las glicosiltransferasas se expresan en presencia de sacarosa, fructosa y glucosa. Sería conveniente detectar y cuantificar la expresión de las enzimas a nivel transcripcional, en cultivos crecidos en las diferentes fuentes de carbono para determinar cuáles genes se expresan en cada condición y el nivel de expresión. Esto pudiera hacerse mediante Hibridación Northern o PCR en tiempo real.
- Los estudios bioinformáticos permitieron detectar dos motivos ubicados exclusivamente en las regiones 5' de los genes que codifican para las glicosiltransferasas predichas en esta cepa. Estas secuencias pueden ser blancos de reguladores transcripcionales por lo que la determinación de su posición con respecto a los promotores permitirá saber si son reconocidas por activadores o represores. También podrían buscarse estos motivos en los genomas de bacterias relacionadas para saber si aparecen en las zonas reguladoras de otros genes y si hay información disponible sobre su regulación.
- En este trabajo no se observó actividad PTS para sacarosa, glucosa, fructosa y manosa. Sin embargo en el genoma se encontraron dos genes con identidad con componentes del PTS de sacarosa y manosa en un contexto genético similar al de otras bacterias cercanas, con PTSs funcionales. Para arribar a conclusiones con respecto a la funcionalidad de este sistema en *L. mesenteroides* ATCC 8293 se hace necesario llevar a cabo un estudio de estos genes a nivel transcripcional mediante Hibridación Northern o PCR en tiempo real. Por otro lado se podrían construir cepas mutantes en los genes de los PTS predichos para determinar su participación en el transporte de azúcares en esta cepa.
- La baja eficiencia de electroporación de *L. mesenteroides* ATCC 8293 es una limitante para los estudios de Biología Molecular, por lo que podría hacerse un tamizaje entre las diferentes cepas de *Leuconostoc* más estudiadas, incluyendo las de interés industrial, con el fin de identificar una cepa con mayor susceptibilidad a la electroporación. Esto permitirá el uso de otros sistemas de inactivación como los que involucran vectores que no se replican en BAL.

- El vector termosuicida pSET5s no resultó funcional en *L. mesenteroides* ATCC 8293 por lo que podrían probarse otros vectores suicidas utilizados en bacterias gram positivas para obtener mutantes en los genes seleccionados en este estudio y evaluar su efecto sobre la expresión de las glicosiltransferasas.

10. Bibliografía

- Abranches J., Chen Y. M., Burne R. A. 2003. Characterization of *Streptococcus mutans* strains deficient in EIIABMan of the sugar phosphotransferase system. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4760–4769.
- Aymerich, S., Steinmetz, M. 1992. Specificity determinants and structural features in the RNA target of the bacterial antiterminator proteins of the BglG/SacY family. *Proc. Natl Acad. Sci.* 89:10410–414.
- Bailey T. L., Williams N., Misleh Ch., Li W. W. 2006. MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. *Nucleic Acids Res.* 152:131–139.
- Barriere Ch., Veiga-da-Cunha M., Ehrlich D. S., Renault P. 2005. Fructose utilization in *Lactococcus lactis* as a model for low-GC Gram-positive bacteria: Its regulator, signal, and DNA-binding site. *J. Bacteriol.* 187:3752–3761.
- Berthier F., Zagorec M., Champomier-Verges M., Ehrlich S. D., Morel-Deville F. 1996. Efficient transformation of *Lactobacillus sake* by electroporation. *Microbiology.* 142:1273–1279.
- Bettenbrock, K., Siebers, U., Ehrenreich, P., Alpert, C.A., 1999. *Lactobacillus casei* 64H contains a phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system for uptake of galactose, as confirmed by analysis of ptsH and different gal mutants. *J. Bacteriol.* 181:225–230.
- Biswas S., Biswas I. 2006. Regulation of the glucosyltransferase (gtfBC) operon by CovR in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* 188: 988–998.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–254.
- Browningardt C. M., Wen Z. T., Burne R. A. 2004. RegM is required for optimal fructosyltransferase and glucosyltransferase gene expression in *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 240: 75–79.
- Bruckner, R., Titgemeyer F. 2002. Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiol. Lett.* 209:141–148.
- Caplice E., Fitzgerald G. F. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 50:131–149.
- Castillo E., Iturbe F., López-Munguía A., Pelenc V., Paul F., Monsan P. 1992. Dextran and oligosaccharide production with glucosyltransferases from different strains of *Leuconostoc mesenteroides*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 672:425–429.
- Cerning, J. 1990. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 87:113–130.
- Chellapandian M., Larios C., Sanchez-Gonzalez M., López-Munguía A. 1998. Production and properties of a dextransucrose from *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ isolated from “pulque”, a traditional Aztec alcoholic beverage. *J. Ind. Microbiol.* 21:51–56.
- Crutz, A. M., Steinmetz, M., Aymerich, S., Richter, R., Le Coq, D. 1990. Induction of levansucrase in *Bacillus subtilis*: an antitermination mechanism negatively controlled by the phosphotransferase system. *J. Bacteriol.* 172:1043–1050.
- Daguer J.P., Geissmann T., Petit-Glatron M. F., Chambert R. 2004. Autogenous modulation of the *Bacillus subtilis* sacB–levB–yveA levansucrase operon by the levB transcript. *Microbiology.* 150:3669–3679.
- Deutscher, J., Galinier, A. & Martin-Verstraete, I. 2002. Carbohydrate uptake and metabolism. In *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells, pp.

Bibliografía

- 129–150. Edited by L. Sonenshein, J. Hoch & R. Losick. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- DOE Joint Genome Institute. US Department of Energy. 2007 <http://genome.jgi-psf.org/leume/leume.home.html>. 3 de diciembre 2007.
- Dols M., Chraïbi W., Remaud-Simeon M., Monsan P. F. 1997 Growth and energetics of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 during metabolism of various sugars and their consequences for dextransucrase production. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2159–2165.
- Elion E.A., Marina P., Yu L. 2007. Constructing Recombinant DNA Molecules by PCR. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 78:3.17.1-3.17.12.
- Fernández J. L. 2003. Aislamiento y expresión del gen que codifica para la dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ. Tesis para obtener el título de Maestro en Ciencias. IBT. UNAM.
- French, A. D., and A. L. Waterhouse. 1993. Chemical structure and characteristics, p. 41-82. In M. Suzuki and N. J. Chatterton (ed.), Science and technology of fructans. CRC Press Inc., Boca Raton, Fla.
- Fujiwara T., Hashino T., Oshima T., Hamada S. 2002. Differential and quantitative analysis of mRNA expression of glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* MT8148. *J. Dent. Res.* 81:109–113.
- Garvie, H. 1986. Genus *Leuconostoc*. En: Bergey's manual of systematic bacteriology. Pp 1071-1075. Peter H.A. (Ed). Sneath Willams & Wilkins. USA.
- Goodman S. D., Gao Q. 2000. Characterization of the *gtfB* and *gtfC* promoters from *Streptococcus mutans* GS-5. *Plasmid.* 43:85–98.
- Guérot-Fleury A.M., Kamran S., Frandsen N., Stragier P. 1995. Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. *Gene.* 167: 335–336.
- Helmark S., Hansen M. E., Jelle B., sorenson K. I. 2004. Transformation of *Leuconostoc carnosum* 4010 and evidence for natural competence of the organism. *ppl. Environ. Microbiol.* 70: 3695-3699.
- Henrissat B, Bairoch A. 1996. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem J.* 316:695–696.
- Idone, V., Brendtro S., Gillespie R., Kocaj S., Peterson E., Rendi M., Warren W., Michalek S., Krastel K., Cvitkovitch D., Spatafora G. 2003. Effect of an orphan response regulator on *Streptococcus mutans* sucrose dependent adherence and cariogenesis. *Infect. Immun.* 71:4351–4360.
- Jeong, S., Park J., Kim J. H., Kim G., Chun J. 2006. Transformation of *Leuconostoc mesenteroides* SY1, a Strain Isolated from Kimchi. *J. Microbiol. Biotechnol.* 16:149–152.
- Kaur, N., Gupta A. K. 2002. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *J. Biosci.* 27:703-714.
- Kawasaki H., Nakamura N., Ohmori M., Sakai T. 1996. Cloning and expression in *Escherichia coli* of sucrose phosphorylase gene from *Leuconostoc mesenteroides* No. 165. *Biosci Biotechnol Biochem* 60:322–324.
- Kekkonen R. A, Kajasto E., Miettinen M., Veckman V., Korpela R., Julkunen I. 2008 Probiotic *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* and *Streptococcus thermophilus* induce IL-12 and IFN- γ production. *World J Gastroenterol.* 14: 1192-1203.
- Kim D., Kim D.W., Lee J.H., Park K.H., Day L.M., Day D.F. 1997. Development of constitutive dextransucrase hyper-producing mutants of *Leuconostoc mesenteroides* using the synchrotron radiation in the 70–1000 eV region. *Biotechnol. Tech.* 11: 319–321.

- Kitaoka M., Robyt J. F. 1998. Use of a microtiter plate screening method for obtaining *Leuconostoc mesenteroides* mutants constitutive for glucansucrase. *ppl. Environ. Microbiol.* 22:527–531.
- Leathers T. D., Jones J. D., Wyckoff H. A. 2004. Transformation of alternan-producing strains of *Leuconostoc* by electroporation. *Biotechnol. Lett.* 26: 1119–1124.
- Lee J., Moon Y., Kim N., Kim Y., Kang H., Jung J., Abada E., Kang S., Kim D. 2008. Cloning and expression of the sucrose phosphorylase gene from *Leuconostoc mesenteroides* in *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett.* 30:749–754.
- Lee S. F., Delaney G. D., Elkhateeb M. 2004. A two-component covRS regulatory system regulates expression of fructosyltransferase and a novel extracellular carbohydrate in *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* 72:3968–3973.
- Lepesant, J. A., Kunst F., Lepesant-Kejzlarova J., Dedonder R. 1972. Chromosomal location of mutations affecting sucrose metabolism in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 118:135-160.
- Li, Y., Burne R. A. 2001. Regulation of the *gtfBC* and *ftf* genes of *Streptococcus mutans* in biofilms in response to pH and carbohydrate. *Microbiology.* 147:2841–2848.
- Loo, C. Y., Mitrakul K., Voss I. B., Hughes C. V., N. Ganeshkumar. 2003. Involvement of an inducible fructose phosphotransferase operon in *Streptococcus gordonii* biofilm formation. *J. Bacteriol.* 185:6241–6254.
- López-Munguía A., Pelenc V., Remaud M., Biton J., Michel J.M., Lang C., Paul F., Monsan P. 1993. Production and purification of alternansucrase, a glucosyltransferase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355, for the synthesis of oligoalternans. *Enzyme Microb. Technol.* 15:77-85.
- Lorca G. L., Barabote R. D., Zlotopolski V., Saier M. H. Jr. 2007. Transport capabilities of eleven gram-positive bacteria: Comparative genomic analyses. *Biochim. Biophys. Acta* 1768:1342–1366.
- Maguin E., Duwat P., Hege T., Ehrlich D., Gruss A. (1992) New thermosensitive plasmid for Gram-Positive bacteria. *J. Bacteriol.* 174:5633-5638
- Marsh, P. D., Bradshaw, D. J. 1999. Microbial community aspects of dental plaque. In *Dental Plaque Revisited-Oral biofilms in health and disease*; Newman, H. N., Wilson, M., Eds; Bionline press. UK: 237-253.
- Martínez-Guerrero C. E., Ciria R., Abreu-Goodger C., Moreno-Hagelsieb G., Merino E. 2008. GeConT 2: gene context analysis for orthologous proteins, conserved domains and metabolic pathways. *Nucleic Acids Res.* 36:176 -180.
- Mitrophanov A. Y., Groisman E. A. 2008. Signal integration in bacteria two component regulatory system. *Genes Dev.* 22:2601-2611.
- Miwa Y., Nakata A., Ogiwara A., Yamamoto M., Fujita Y. 2000. Evaluation and characterization of catabolite-responsive elements (*cre*) of *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res* 28:1206-1210.
- Monedero V., Mazé A., G. Boël, Zúñiga M., Beaufils S., Hartke A., Deutscher J. 2007. The phosphotransferase system of *Lactobacillus casei*: regulation of carbon metabolism and connection to cold shock response. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 12:20–32.
- Morales-Arrieta S, Rodríguez ME, Segovia L, López-Munguía A, Olvera C. 2006 Identification and functional characterization of *levS*, a gene encoding for a levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F. *Gene.* 376:59–67
- Naessens M., Cerdobbel A., Soetaert W. and Vandamme E. J. 2005. *Leuconostoc* dextranucrase and dextran: production, properties and applications. *J Chem Technol Biotechnol.* 80:845–860.

- Newbrun, E., Baker S. 1968. Physico-chemical characteristics of the levan produced by *Streptococcus salivarius*. *Carbohydr. Res.* 6:165–170.
- Olivares-Illana V, Lopez-Munguia A, Olvera C. 2003. Molecular characterization of inulosucrase from *Leuconostoc citreum*: a fructosyltransferase with a glucosyltransferase. *J Bacteriol.* 185:3606–3612.
- Olvera C., Centeno-Leija S., López-Munguía A. 2007. Structural and functional features of fructansucrases present in *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293. *Antonie Leeuwenhoek.*92:11–20.
- Park, J., Park J.S., Kim J.H., Jeong S. J., Jiyeon Ch., Lee J.H., Kim J. H. 2005. Characterization of the Catabolite Control Protein (CcpA) gene from *Leuconostoc mesenteroides* SY1. *J. Microbiol. Biotechnol.* 15:749–755.
- Park, J., Seon-ju J., Jiyeon Ch., Jong-Hoon L., Dae K. Ch., Jeong H. K. 2006. Characterization of *ptsHI* operon from *Leuconostoc mesenteroides* SY1, a strain isolated from kimchi. *J. Microbiol. Biotechnol.* 16:988–992.
- Paul F., Oriol E., Auriol D., Monsan P. 1986. Acceptors reactions of a highly purified dextransucrase with maltose and oligosaccharides. Application to the synthesis of controlled molecular weight dextrans. *Carbohydr. Res.* 149:433-441.
- Postma, P. W., Lengeler, J. W. & Jacobson, G. R. 1993. Phosphoenolpyruvate: carbohydratephosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev.* 57:543–594.
- Quirasco M., Lopez-Munguia A., Remaud-Simeon M., Monsan P., Farres A. 1999 Induction and transcription studies of the dextransucrase gene in *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512-F. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:5504–5509.
- Reid S. J., Abratt V.R. 2005. Sucrose utilisation in bacteria: genetic organisation and regulation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 67:312–321.
- Robyt, J. F., Walseth T. F. 1979. Production, purification, and properties of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Carbohydr. Res.* 68:95–111.
- Rodríguez M. C., Alegre M. T., Mesas J. M. 2007. Optimization of technical conditions for the transformation of *Pediococcus acidilactici* P60 by electroporation. *Plasmid* 58: 44–50.
- Schumacher, M. A., Allen, G. S., Diel, M., Seidel, G., Hillen, W. & Brennan, R. G. 2004. Structural basis for allosteric control of the transcription regulator CcpA by the phosphoprotein HPr-Ser46-P. *Cell.* 118:731–741.
- Saier M.H, Chauvaux S., Deutscher J., Reizer J., Ye J-J. 1995. Protein phosphorylation and regulation of carbon metabolism in Gram-negative versus Gram-positive bacteria. *Trends Biochem Sci.* 20:267–271.
- Saier, M.H. 1996. Regulation of carbon metabolism in bacteria. En 14th Forum in Microbiology. *Res. Microbiol.* 147:439-587.
- Sánchez-González M., Alagón A., Rodríguez-Sotrés R., López-Munguia A. 1999. Proteolytic processing of dextransucrose of *Leuconostoc mesenteroides*. *FEMS Microbiol. Lett.* 181:25-30.
- Seidman Ch. E., Struhl K., Sheen J., Jessen T. 2003. Current Protocols in Molecular Biology. Unit 1.8: Introduction of Plasmid DNA into Cells. Ed. John Wiley & Sons, Inc.
- Seymour F.R, Knapp R.D, Chen E.C.M, Jeanes A., Bishop S. H.1979. Structural analysis of dextrans containing 2-O- α -D-glucosylated α -D-glucopyranosyl residues at the branch points, by use of ¹³C-nuclear magnetic resonance spectroscopy and gas liquid chromatography-mass spectrometry. *Carbohydr. Res.*71:231–250.
- Stülke, J. y Hillen W. 2000. Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:195-201.

Bibliografía

- Sumner J.B., Howell S.F. 1935. A method for determination of saccharase activity. *J Biol Chem.* 108:51–54
- Takamatsu D., Osaki M., Sekizaki T. 2001. Thermosensitive suicide vectors for gene replacement in *Streptococcus suis*. *Plasmid* 46:140–148.
- Tieking M., Ehrmann M.A., Vogel R.F., Ganzle M.G. 2005. Molecular and functional characterization of a levansucrase from the sourdough isolate *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66:655–663.
- Tortosa, P., Aymerich, S., Lindner, C., Saier, M. H., Jr, Reizer, J. & Le Coq, D. 1997. Multiple phosphorylation of SacY, a *Bacillus subtilis* transcriptional antiterminator negatively controlled by the phosphotransferase system. *J. Biol. Chem.* 272: 17230–17237.
- van Hijum S. A. F. T., Kralj S., Ozimek L. K., Dijkhuizen, L. and van Geel-Schutten I. G. H. 2006. Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70: 157-176.
- van Hijum S.A.F.T., Szalowska E, van der Maarel MJ, Dijkhuizen L. 2004. Biochemical and molecular characterization of a levansucrase from *Lactobacillus reuteri*. *Microbiology.* 150:621–630.
- van Hijum S.A.F.T., van Geel-Schutten GH, Rahaoui H, van der Maarel MJ, Dijkhuizen L 2002. Characterization of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* that synthesizes high molecular-weight inulin and inulin oligosaccharides. *Appl Environ Microbiol.* 68:4390–4398.
- Veyrat, A., Monedero, V., Pérez-Martínez, G. 1994. Glucose transport by the phosphoenolpyruvate:mannose phosphotransferase system in *Lactobacillus casei* ATCC 393 and its role in carbon catabolite repression. *Microbiology.* 140:1141–1149.
- Vickerman M.M, Minick P.E. 2002. Genetic analysis of the rgg-gtfG junctional region and its role in *Streptococcus gordonii* glucosyltransferase activity. *Infect Immun.* 70: 1703-14.
- Wyckoff H.A., Sandine W.E., Kondo J.K. 1991. Transformation of dairy *Leuconostoc* using plasmid vectors from *Bacillus*, *Escherichia*, and *Lactococcus* hosts. *J. Dairy Sci.* 74:1454–1460.
- Zúñiga, M., Comas, I., Linaje, R., Monedero, V., Yebra, M. J., Esteban, C. D., Deutscher, J., Pérez-Martínez, G. & González-Candelas, F. 2005. Horizontal gene transfer in the molecular evolution of mannose PTS transporters. *Mol. Biol. Evol.* 22:1673–1685.