



00551

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Maestría en Ciencias Bioquímicas

Degradación proteolítica de la dextranasa de
Leuconostoc mesenteroides NRRL B 512F

TESIS

que para obtener el título de:

Maestra en Ciencias

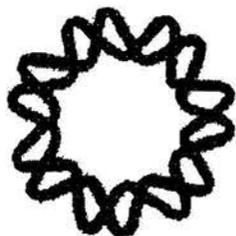
Presenta:

IBQ. Sandra Trinidad del Moral Ventura

Tutor:

Dra. Martha A. Argüello Morales

Cuernavaca, Mor., mayo de 2004





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 se realizó en el **Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología-UNAM** bajo la dirección de la **Dra. Martha A. Argüello Morales** y con la supervisión del Dr. **Agustín López-Munguía Canales**.

A **Dios** por nunca dejarme sola y porque cada vez más me
fascina tu creación.

A mis **padres**, Efrén y Olivia por ser un ejemplo de vida, por
dejarme ser libre, por creer en mí y porque a pesar de la
distancia siempre estamos juntos.

A mi **hermano** Ernesto por compartir el idealismo, el mismo
entusiasmo de nunca dejar de aprender y por esas pláticas
tontas en las que solemos reír mucho.

A **Sofía** por ser más que mi hermanita, siempre serás una razón
importante para tratar de hacer un mundo mejor.

A mis **abues**, principalmente a mi Abuelita Trini por los
muchos gratos momentos que compartimos, por hacer de mi
niñez una etapa inolvidable y por el amor que me dieron. Donde
quieran que estén....gracias.

A la numerosa **familia Arellano**, por adoptarme y hacerme
sentir una más del clan.

A **César**.....por ser mi pilar desde el "Tec", por no permitirme
caer y por ser mi compañero durante todos estos años. TQM.

A **Kukoch** por ser el hijo que aún no tengo.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Martha A. Argüello Morales por su amistad, por su paciencia y por enseñarme que la tenacidad es la mejor manera de obtener las cosas.

Al Dr. Agustín López por sus enseñanzas, por darme la oportunidad de colaborar en su grupo de trabajo y por soportar mi manera peculiar de ser.

Al jurado revisor de tesis por sus muy acertados comentarios, críticas y sugerencias:

Dr. Agustín López-Munguía Canales.

Dra. Martha A. Argüello Morales

Dra. Maricarmen Quirasco Baruch.

Dra. Brenda M. Valderrama Blanco.

Dr. Sandino Estrada Mondaca.

Al T. L. Fernando González por el extraordinario apoyo técnico y por su amistad.

A la Dra. Calrita Olvera por darme ánimo cuando las cosas no marchaban tan bien.

A la T.L. Aurelia Ocampo por toda la ayuda brindada.

Al M. en C. Leopoldo Guereca por sus “clases” de electroforesis.

A Verónica Aldama por la ayuda administrativa que siempre me brindó de la mejor manera.

A las (os) López: Chelo, Fer, Alex (el peque), Xoch, María, Alina, Sandra, Arlette, Edmundo Angela, Male, Rebeca, Rubén y a los que ya no están Lolita, Gina, Vanesa, Martha Marcela y José Luis; gracias por su amistad, por las tardes de palomitas y por la “música divertida”.

Al club de Las Brujas, por los jueves en el Rincón.

A mis amigos Tere, Juan Carlos, Melchy, Argel, Yagul, Pável y Liliana, por compartir desde el examen de admisión, los exámenes (principalmente de Biología Molecular), por los chistes, por las risas interminables y por las reuniones amenas y aquí integro a "Aldo" (el de Melchy), porque nada hubiera sido igual sin él.

A Tere y Juan Carlos por la compañía excelente no sólo a la hora de la comida.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (169929) por los apoyos económicos otorgados.

ÍNDICE

Índice de tablas.....	I
Índice de figuras.....	II
Resumen	IV
Introducción	V
1. Antecedentes	1
1.1. Las glicosiltransferasas	1
1.1.1. Clasificación de las glicosiltransferasas.....	1
1.2. Estructura de las glicosiltransferasas.	3
1.3. Mecanismo de acción de las glicosiltransferasas.	8
1.3.1. Mecanismo de síntesis de glucano.....	9
1.3.2. Transferencia hacia una molécula aceptora.....	12
1.4. Peso molecular de la DSRS de <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F.	13
1.5. Sistema proteolítico en Bacterias Ácido Lácticas.	14
1.6. Proteasas en el genoma de <i>L. mesenteroides</i> spp. <i>mesenteroides</i> ATCC 8293.....	17
1.7. Proteasas en <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F.....	18
1.7.1. Producción de proteasas en <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F.....	20
1.8. Forma enzimáticas obtenidas de la DSRS de <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512FMC.	20
1.8.1. Secuenciamiento del N-terminal de las formas de 155 y 129 kDa de la DSRS de <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512FMC.....	20
2. Objetivos	24
2.1. Objetivo general	24

2.2. Objetivos específicos	24
3. Materiales y Métodos	25
3.1. Material Biológico.	25
3.1.1. Cepas y plásmidos utilizados.....	25
3.2. Medios y condiciones de cultivo.	26
3.3. Técnicas enzimáticas y bioquímicas	28
3.3.1. Producción de glicosiltransferasas de <i>L.mesenteroides</i> NRRL B512F.....	28
3.3.2. Producción de proteasas de <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F.....	29
3.3.3. Determinación de la actividad enzimática dextransacarasa.....	29
3.3.4. Determinación de la actividad proteolítica.	30
3.3.5. Cuantificación de proteína.....	31
3.3.6. Electroforesis de proteínas.....	31
3.3.7. Ensayos proteolíticos.....	33
3.3.8. Síntesis de oligosacáridos.	34
3.3.9. Producción de glucano.....	34
3.4. Técnicas de Biología Molecular.	35
3.4.1. Extracción de ADN de <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F.....	35
3.4.2. Purificación de ADN plasmídico.	36
3.4.3. Amplificación de fragmentos de ADN (PCR).....	36
3.4.4. Preparación de células electrocompetentes.....	38
3.4.5. Transformación de <i>Escherichia coli</i>	39
3.4.6. Secuenciación.....	39
3.4.7. Sobreexpresión de enzimas glicosiltransferasas en <i>E. coli</i>	40
3.4.8. Análisis de las secuencias de ADN.....	40
4. Resultados	41
4.1. Diseño de proteínas mutantes a partir de los datos de secuenciamiento de las formas proteolizadas.	41
4.1.1. Diseño de las proteínas mutantes.....	41
4.1.2. Expresión heteróloga en <i>E.coli</i>	42
4.1.3. Discusión	46
4.1.4. Conclusiones.....	46

4.2. Producción de la DSRS de <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F y <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512FMC	47
4.2.1. Cultivo de <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F.....	47
4.2.2. Cultivo de <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512FMC.....	47
4.3. Producción de proteasas de <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F y <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512FMC	48
4.3.1. Proteasas de <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F y B512FMC.....	48
4.4. Proteólisis de la DSRS de <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F	50
4.4.1. Proteólisis de la DSRS nativa.....	50
4.4.2. Proteólisis de la DSRS nativa con adición de proteasas endógenas.....	51
4.5. Expresión heteróloga de la DSRS de <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F	54
4.5.1. Clonación del gen <i>dsrS</i>	54
4.5.2. Expresión heteróloga en <i>E.coli</i> DH5 α	54
4.6. Proteólisis de la DSRS heteróloga	57
4.6.1. Proteólisis de la DSRS heteróloga con adición de proteasas de <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F.....	57
4.6.2. Utilización de diversas cepas de <i>E. coli</i>	58
4.6.3. Caracterización parcial de las formas proteolizadas.....	61
4.6.3.1. Determinación del peso molecular de las formas proteolizadas.....	61
4.6.3.2. Síntesis de oligosacáridos.....	63
5. Conclusiones generales	68
6. Perspectivas	69
Bibliografía	70

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Genes que codifican para glicosiltransferasas de <i>L. mesenteroides</i> , <i>Streptococcus</i> spp. <i>Lactobacillus</i> spp. y <i>Neiseria</i> spp.....	3
Tabla 1.2. Secuencias repetidas en el dominio C-terminal de las glicosiltransferasas	7
Tabla 1.3. Pesos moleculares reportados en diversas GTFs.....	13
Tabla 1.4. Probables proteasas de <i>L. mesenteroides</i> spp. <i>mesenteroides</i> ATCC 8293.....	18
Tabla 1.5. Pesos moleculares de la DSRS	22
Tabla 3.1. Cepas de <i>E. coli</i> utilizadas en este trabajo	25
Tabla 3.2. Plásmidos utilizados y generados durante este trabajo	25
Tabla 3.3. Composición del medio de cultivo para la producción de glicosiltransferasas de <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F y FMC.....	27
Tabla 3.4. Medio Luria Bertani.....	27
Tabla 3.5. Medio SOC	27
Tabla 3.6. Composición de la solución desnaturizante para la electroforesis de proteínas.....	32
Tabla 3.7. Condiciones de amplificación de los fragmentos de ADN.....	37
Tabla 3.8. Oligonucleótidos utilizados.....	37
Tabla 4.1. Pesos moleculares de las proteínas recombinantes	43
Tabla 4.2. Actividad proteolítica en cultivos de <i>L. mesenteroides</i> B512F y FMC variando la fuente de nitrógeno y de carbono.....	48
Tabla 4.3. Actividad residual de la DSRS recombinante.	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1.1. Esquema de la estructura general de las glicosiltransferasas de <i>L. mesenteroides</i> y de <i>Streptococcus</i>	5
Fig. 1.2. Esquema general del péptido señal.....	5
Fig. 1.3. Mecanismo de formación del complejo glicosil-enzima.....	8
Fig. 1.4. Reacciones catalizadas por las glicosiltransferasas.....	9
Fig. 1.5. Mecanismo de síntesis de dextrana por la DSRS de <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F.....	11
Fig. 1.6. Posible vía de degradación de la caseína por Bacterias Ácido Lácticas.....	17
Fig. 1.7. Gel de actividad de las formas proteolizadas de la DSRS nativa: 155, 129 y 48 kDa.....	21
Fig. 1.8. Sitios probables de escisión en la DSRS por la proteasa dando origen a formas enzimáticas de diferente tamaño.....	22
Fig. 3.1. Esquema de propagación de <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F para la producción de la DSRS.....	28
Fig. 4.1. Construcciones y proteínas recombinantes a partir del gen que codifica para la DSRS de <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F.....	41
Fig 4.2. Esquema de las proteínas recombinantes que se obtienen de la clonación en el sistema pBAD/TOPO.....	43
Fig. 4.3. Gel SDS-PAGE 10% con la proteína recombinante DSRS4.....	44
Fig. 4.4 Gel SDS-PAGE 10% con la proteína recombinante DSRS8.....	44
Fig. 4.5. SDS-PAGE 6% en condiciones desnaturalizantes de la DSRS heteróloga.....	44
Fig. 4.6. Gel de actividad que muestra a la DSRS recombinante activa.....	45
Fig. 4.7. Gel de actividad proteolítica, extractos enzimáticos.....	49
Fig. 4.8. Degradación proteolítica de la DSRS de <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F a pH 5.2 y 30°C.....	50
Fig. 4.9. Efecto del pH y del tiempo en la degradación de la DSRS de <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F sin adición de proteasas endógenas a pH 7 y 30°C.....	51
Fig. 4.10. Efecto del pH y del tiempo en la degradación de la DSRS de <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F con proteasas endógenas.....	52

Fig. 4.11. Geles de actividad SDS-PAGE 6% de la DSRS recombinante.....	57
Fig. 4.12. Geles de actividad, muestra la DSRS expresada en diferentes cepas de <i>E. coli</i> ...	59
Fig. 4.13. Extracto de la DSRS que se le suministró en el cultivo inhibidor de proteasas....	60
Fig. 4.14. Gel de actividad de la DSRS recombinante.....	61
Fig. 4.15. Esquema de la estructura primaria de DSRS recombinante.....	62
Fig. 4.16. Análisis de los productos de reacción sintetizados por las formas enzimáticas activas de la DSRS recombinante.....	65
Fig. 4.17. Comparación de los productos de reacción de la proteína de 218 kDa y la DSRS nativa.....	66

Resumen

En este trabajo analizamos el efecto de la fuente de nitrógeno y de carbono sobre la producción de las proteasas y de la dextransacarasa (DSRS) de *L. mesenteroides* NRRL B512F y B512FMC. La mayor producción de proteasas libre de DSRS se logró suministrando extracto de levadura y glucosa.

Se observó que es posible modular la proteólisis de la DSRS de *L. mesenteroides* NRRL B512F mediante la regulación del pH y de la temperatura. La adición de proteasas endógenas de *L. mesenteroides* NRRL B512F producidas en condiciones de no-inducción de la DSRS no aceleró el proceso de proteólisis.

Detectamos en los extractos enzimáticos provenientes de *L. mesenteroides* NRRL B512F una levansacarasa (LV) que sufre degradación parcial a pH 5.2, y que a diferencia de la DSRS no se proteoliza totalmente a pH 7, revelando la existencia de más de una proteasa involucrada en la proteólisis de la DSRS y de la LVS.

El gen que codifica para la DSRS fue expresado como proteína de fusión (tioredoxina de 16 kDa) en *E. coli* y se determinaron las condiciones de mayor producción. El perfil proteolítico de la DSRS recombinante no fue el mismo que el de la DSRS nativa. La degradación ocurre desde su producción durante el cultivo en *E. coli*, dando lugar a tres formas proteolizadas que conservan actividad DSRS. Se utilizaron diversas cepas hospederas y en todas se observó el mismo patrón degradativo, por lo que se concluye que este proceso es independiente del fondo genético. El tamaño de las formas activas detectadas es de 218, 176 y 154 kDa.

Introducción

Las glicosiltransferasas (GTFs) son enzimas extracelulares producidas principalmente por las cepas de *Leuconostoc mesenteroides* y por algunas cepas de *Streptococcus* (Mooser, 1992). Catalizan a partir de sacarosa la síntesis de un polímero de glucosa de peso molecular elevado, liberando simultáneamente fructosa. Estas enzimas se clasifican de acuerdo al polímero que sintetizan, encontrado así dextransacarasa, que catalizan un polímero compuesto principalmente por enlaces α -(1-6), con ramificaciones en α -(1-2), α -(1-3) o α -(1-4), mutansacarasa producen un polímero constituido principalmente de uniones glicosídicas α -(1-3) y alternansacarasa que sintetizan un polímero con uniones α -(1-3) y α -(1-6) de manera alternada, de lo que deriva su nombre. La dextransacarasa de *L. mesenteroides* NRRL B512F es una de las más importantes a nivel industrial por su aplicación en la producción de una dextrana empleada como sustituto de plasma sanguíneo y soporte cromatográfico.

En presencia de moléculas aceptoras estas enzimas pueden desviar la síntesis de polímero, transfiriendo la glucosa de la sacarosa sobre dichas moléculas y producir oligosacáridos de diferentes tamaños. Estas reacciones son denominadas “reacciones de aceptor”. Algunos oligosacáridos derivados de este tipo de reacciones son importantes por sus aplicaciones en algunos sectores industriales, tales como: el alimentario, el farmacéutico, el cosmético y el químico.

Las glicosiltransferasas de *L. mesenteroides* y de *Streptococcus* son enzimas robustas que tienen en promedio 1500 aminoácidos y presentan pesos moleculares entre 150 y 200 kDa. El peso molecular de la dextransacarasa (DSRS) de *L. mesenteroides* NRRL B512F ha sido motivo de controversia. En la literatura se encuentran reportes que lo ubican desde 65 hasta 175 kDa. Inicialmente se propuso que la enzima era un monómero de 65 kDa, y que la dextrana (polímero que produce en presencia de sacarosa) provocaba la asociación de la proteína, dando lugar a una proteína de alto peso molecular (cerca de 180 kDa). Posteriormente, con la obtención de una cepa constitutiva (*L. mesenteroides*

NRRL B512FMC) se eliminó el efecto generado por la dextrana, pero se continuó observando variabilidad en el peso molecular.

En nuestro laboratorio por primera vez se detectó en los extractos de *L. mesenteroides* NRRL B512F y B512FMC una proteasa responsable del cambio en el peso molecular de la DSRS (Sánchez-González y col., 1999). La proteasa fue parcialmente caracterizada, encontrando que es activa a pH 7 y a 50°C.

En este trabajo exploramos diversas condiciones en las que se presenta una de proteólisis parcial (proteólisis limitada) y total de la DSRS nativa así como de la recombinante, utilizando las propias proteasas producidas en los cultivos de *L. mesenteroides* NRRL B512F y extractos proteolíticos generados mediante la modificación de la fuente de carbono y de nitrógeno.

En el primer capítulo se describe la estructura primaria así como el mecanismo de síntesis de polímero y de oligosacáridos de las glicosiltransferasas. Se discute el proceso proteolítico que llevan a cabo las bacterias ácido lácticas (LABs, por sus siglas en inglés) así como de la identificación de proteasas en los genomas secuenciados de LABs. Igualmente, se describen las condiciones en las que la DSRS sufre proteólisis limitada, secuenciando el N-terminal de formas activas de menor peso molecular provenientes de la DSRS de *L. mesenteroides* NRRL B512FMC. Estos datos dan lugar a la propuesta de un modelo de proteólisis que efectuaría la proteasa de *L. mesenteroides* NRRL B512F.

En la segunda sección de la tesis se describen los materiales y métodos empleados, así como sus principios, y finalmente en el capítulo cuarto se presentan los resultados obtenidos en este trabajo, iniciando con la producción de la DSRS nativa y de las proteasas. Posteriormente se describe la proteólisis de la DSRS nativa que se complementa con la expresión y proteólisis de la DSRS recombinante, así como la caracterización parcial de las formas proteolizadas.

Antecedentes

1. ANTECEDENTES

1.1. Las glicosiltransferasas

Las glicosiltransferasas (GTFs) son enzimas que catalizan, a partir de la sacarosa, la síntesis de un polímero de glucosa con enlaces α -(1-6) principalmente, y ramificaciones en α -(1-2), α -(1-3), α -(1-4). Durante la formación del polímero se libera fructosa, según la reacción siguiente:



En presencia de moléculas aceptoras, como es el caso de la maltosa, las GTFs catalizan la transferencia de la glucosa proveniente de la sacarosa al aceptor, sintetizando oligosacáridos que conservan el mismo tipo de enlace. En este caso la reacción procede de la manera siguiente:



Las GTFs no requieren de cofactores activados ni de intermediarios fosforilados para realizar la catálisis. La estructura del polímero depende de la cepa y particularmente de la enzima productora (Sidebotham, 1974).

1.1.1. Clasificación de las glicosiltransferasas.

Las GTFs fueron clasificadas primeramente de acuerdo al polímero que producen. Las estructuras de los polímeros fueron dilucidadas utilizando diversas técnicas que se basan en sus propiedades físicas y químicas, entre las que se encuentran: la metilación del polímero, hidrólisis enzimática, análisis de fragmentos metilados y solubilidad (Jeanes y col., 1954). Estos trabajos fueron posteriormente complementados por análisis de resonancia magnética nuclear (Côté y Robyt, 1982).

Estos análisis mostraron que existe una gran variabilidad en la estructura de los glucanos sintetizados por las diferentes enzimas. Además, es frecuente encontrar cepas capaces de sintetizar glucanos de diferentes estructuras, indicando la presencia de más de una glicosiltransferasa (Côté y Robyt, 1982).

A partir de la estructura del polímero, las GTFs pueden ser clasificadas de la siguiente manera:

- a. Dextran-sacarosas. Elaboran un polímero denominado dextrana que contiene al menos 50% de enlaces α -(1,6) en la cadena principal y ramificaciones en α -(1,2), α -(1,3) o α -(1,4). El porcentaje y la longitud de las ramificaciones varían de acuerdo a la enzima productora. Las dextranas más utilizadas en el área alimentaria y farmacéutica son las producidas por *L. mesenteroides* NRRL B512F, B742F y B1299.
- b. Mutan-sacarosas. El polímero formado por estas enzimas se denomina mutana, está constituido principalmente por enlaces α -(1,3) consecutivos. Este polímero no es soluble en agua. Es elaborado por enzimas de *L. mesenteroides* NRRL B523, B-1149 y algunas cepas de *Streptococcus* (Mooser, 1992).
- c. Alternan-sacarosas. Producen un polímero llamado alternana, presenta en la cadena principal enlaces α -(1,6) y α -(1,3), de manera alternada. Estas enzimas son producidas por *L. mesenteroides* NRRL B1355, B1501 y B 1498 (Jeanes y col, 1954).
- d. Amilosa-sacarosas. Catalizan la síntesis de un polímero de tipo amilosa, compuesto principalmente por uniones α -(1,4). Una cepa productora es *Neisseria polysaccharea*.

La dextran-sacarasa más importante a nivel industrial es la sintetizada por *L. mesenteroides* NRRL B512F. El polímero asociado con su actividad se utiliza desde la segunda guerra mundial como sustituto de plasma sanguíneo (Groenwall e Ingelman, 1948). También se utiliza como anticoagulante y soporte cromatográfico (gel Sephadex®) y la elaboración del complejo Fe-dextrana (Soetaert y col., 1995).

1.2. Estructura de las glicosiltransferasas

En la actualidad se conocen 12 genes que codifican para glicosiltransferasas de *Streptococcus* spp., 11 genes de *L. mesenteroides*, 1 gen de *Lactobacillus reuteri* y 1 gen de *Neisseria polysaccharea*. En la tabla 1.1 se muestran sus principales características.

Tabla 1.1. Genes que codifican para glicosiltransferasas de *L. mesenteroides*, *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp y *Neisseria* spp. (modificado de Argüello-Morales, 2000).

Cepa	Gen	Glucano	Referencia
<i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F	<i>dsr-S</i>	95% α -(1,6) 5% α -(1,3)	Wilke-Douglas y col., 1989
	<i>dsr-T</i>	Nd	Funane y col., 2000
	<i>dsr-T5</i>	50% α -(1,6) 40% α -(1,3) 10% otros	Funane y col., 2001
<i>L. mesenteroides</i> NRRL B742	<i>dsrB742</i>	95% α -(1,6) 5% α -(1,3)	Kim y col., 2000
<i>L. mesenteroides</i> NRRL B1299	<i>dsr-A</i>	85% α -(1,6) 15% α -(1,3)	Monchois y col., 1996
	<i>dsr-B</i>	95% α -(1,6) 5% α -(1,3)	Monchois y col., 1998
	<i>dsr-E</i>	65% α -(1,6) 35% α -(1,2)	Bozonnet y col., 2002
<i>L. mesenteroides</i> NRRL B1355	<i>ars</i>	50% α -(1,6) 50% α -(1,3)	Argüello-Morales y col., 2000
	<i>dsr-C</i>	96.5% α -(1,6) 3.5% α -(1,3)	Argüello-Morales, 2000
<i>L. mesenteroides</i> IBT-PQ	<i>dsr-P</i>	Nd	Fernández, 2003
<i>L. mesenteroides</i> Lcc4	<i>dsr-D</i>	Nd	Neubauer y col., 2003
<i>S. mutans</i> GS5	<i>gtf-B</i>	13% α -(1,6) 87% α -(1,3)	Aoki y col., 1986

	<i>gtf-C</i>	15% α -(1,6) 85% α -(1,3)	Hanada y Kuramitsu, 1988
	<i>gtf-D</i>	70% α -(1,6) 30% α -(1,3)	Hanada y Kuramitsu, 1989
<i>S. downei</i> Mfe28	<i>gtf-I</i>	12% α -(1,6) 88% α -(1,3)	Russell y col., 1987
	<i>gtf-S</i>	90% α -(1,6) 10% α -(1,3)	Gilmore y col., 1990
<i>S. sobrinus</i> OMZ176	<i>gtf-T</i>	76% α -(1,6) 27% α -(1,3)	Hanada y col., 1991
	<i>gtf-Is</i>	nd	Sato y col., 1993
<i>S. salivarius</i> ATCC 25975	<i>gtf-J</i>	10% α -(1,6) 90% α -(1,3)	Giffard y col., 1991
	<i>gtf-K</i>	100% α -(1,6)	Giffard y col., 1993
	<i>gtf-L</i>	50% α -(1,6) 50% α -(1,3)	Banas y col., 1994
	<i>gtf-M</i>	95% α -(1,6) 5% α -(1,3)	Simpson y col., 1995
<i>S. gordonii</i>	<i>gtf-G</i>	60% α -(1,6) 40% α -(1,3)	Vickerman y col., 1997
<i>Neisseria polysaccharea</i>	<i>as</i>	100% α -(1,6)	Potocki de Montalk y col., 1999
<i>Lactobacillus reuteri</i> 121	<i>gft-A</i>	46% α -(1,6)	Kralj y col., 2002
		54% α -(1,4)	

Nd: no determinado

Las glicosiltransferasas de *L. mesenteroides* y de *Streptococcus* son enzimas de gran tamaño, tienen en promedio 1500 aminoácidos y presentan pesos moleculares entre 150 y 200 kDa.

A partir del análisis de su estructura primaria se observó que las GTFs están organizadas en dominios (fig. 1.1). Se han identificado dos dominios funcionales: el dominio N-terminal, en el se encuentra el péptido señal seguido de una región variable y del dominio catalítico; terminando

con el dominio de unión al glucano (GBD, por sus siglas en inglés) en el C-terminal (Vickerman y col., 1997).

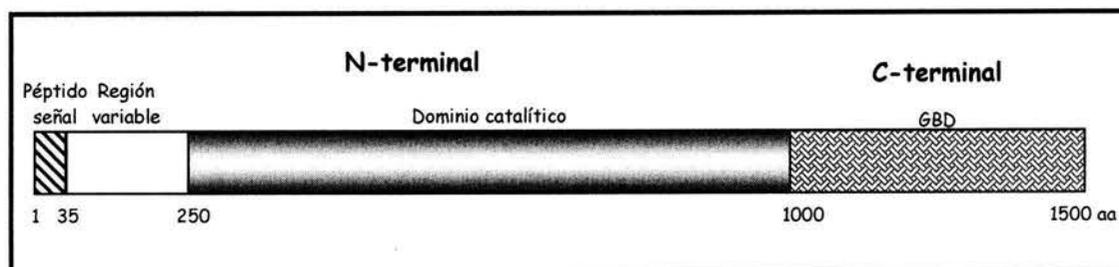


Fig. 1.1. Esquema de la estructura general de las glicosiltransferasas de *L. mesenteroides* y de *Streptococcus spp.*

A continuación se describen estas regiones y dominios.

- a. *Péptido señal*. Esta región contiene entre 35 y 39 aminoácidos y está organizada en tres motivos: una región básica seguida de una hidrofóbica y de una polar (fig. 1.2). Es considerada como una extensión transitoria del N-terminal de la proteína (von Heijne, 1990). El péptido señal está muy conservado entre las GTFs de *L. mesenteroides* y *Streptococcus*, presentando alrededor del 50% de identidad entre ellas. Hasta el momento solo se ha encontrado una GTF que no presenta péptido señal y es activa; la DSR-A de *L. mesenteroides* NRRL B1299, por lo que se sugiere que sea intracelular (Monchois y col., 1996).

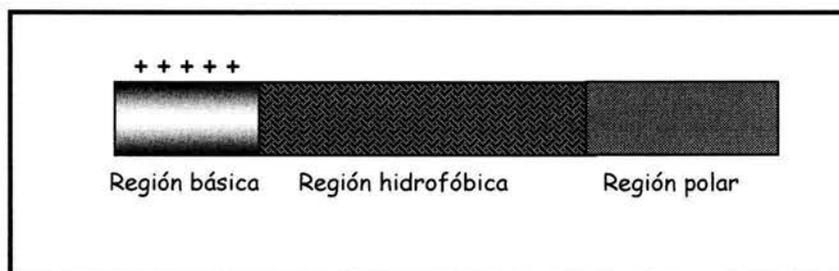


Fig. 1.2. Esquema general del péptido señal.

- b. *Región variable*. Posee cerca de 200 aminoácidos y como su nombre lo indica tiene un bajo porcentaje de identidad con otras glicosiltransferasas. Existen muy pocos estudios concernientes a su papel, aunque su alta variabilidad indica que no interviene en la catálisis (Abo y col., 1991).

- c. *Dominio catalítico.* En este dominio se encuentra la triada encargada de la catálisis y está altamente conservado entre las glicosiltransferasas. Para la dextrantransferasa (DSRS) de *L. mesenteroides* NRRL B512F los aminoácidos implicados en la catálisis son D551, E589 y D662 (Devulapalle y col., 1997). De acuerdo al análisis de predicción de estructura tridimensional, se ha determinado que el dominio catalítico de las glicosiltransferasas presenta un plegamiento tipo barril (α/β)₈ similar al de las glicosidasas, incluyendo a las α -amilasas. Sin embargo, las glicosiltransferasas presentan una permutación circular con respecto a las glicosidasas. Esta estructura está caracterizada por la presencia de 8 β -plegadas (E1-E8) localizadas en el dominio catalítico de la proteína, alternadas con 8 α -hélices (H1-H8). Sin embargo, en las glicosiltransferasas los elementos van de la siguiente manera: H₃, E₄H₄, E₅H₅, E₆H₆, E₇H₇, E₈H₈, E₁H₁, E₂H₂, E₃, es decir presentan una permutación circular. Se piensa que este arreglo particular en las glicosiltransferasas de *Leuconostoc* probablemente esté relacionado con el mecanismo de transferencia de glucosa, después de la hidrólisis (MacGregor y col., 1996).
- d. *Dominio de unión a glucano.* Este dominio tiene en promedio 500 aminoácidos. El C-terminal es el responsable de interaccionar con los glucanos. Está compuesto por una serie de unidades repetidas que han sido designadas como A, B, C, D y N (tabla 1.2). Con excepción del motivo N, todos están presentes en las secuencias C-terminales de las glicosiltransferasas secuenciadas a la fecha (Ferretti y col., 1987). El motivo N se ha identificado únicamente en la DSRS de *L. mesenteroides* B512F (Monchois, 1997). Estos motivos son comparables con los encontrados en el C-terminal de toxinas A y B de *Clostridium difficile* cuyo papel es el de interaccionar con oligosacáridos (von Eichel-Streiber y col., 1992). Por otro lado, diversos estudios se han llevado a cabo con el fin de identificar si el C-terminal de la GTFs interviene en la catálisis. Monchois y col. (1998); mostraron que con la eliminación de algunas secuencias repetidas del C-terminal de la DSRS de *L. mesenteroides* B512F se presenta una disminución de la actividad que va del 30 al 95%. La Km de las proteínas mutantes no fue afectada, lo que indica que la afinidad de las enzimas por el sustrato no cambia. Sin embargo, la constante catalítica (kcat) de la enzima disminuyó. De igual manera, en la GFT-I de *S. downei* fue

suprimido el C-terminal y la mutante mantuvo el 70% de la actividad (Monchois y col., 1999). Recientemente, se hicieron estudios con la alternanasacarasa (ASR) de *L. mesenteroides* NRRL B1355 (Joucla y col., 2001) e inulosacarasa (IS) la cual es una fructosiltransferasa (enzima que sintetiza polímero de fructosa a partir de sacarosa) de *Leuconostoc citreum* CW28 (Olivares-Illana y col., 2003). En el primer caso al eliminar el C-terminal, la mutante conservó el mismo nivel de actividad para producir oligosacáridos en comparación con la silvestre (Joucla y col., 2001). En el caso de la IS se expresó heterológamente el gen que codifica para la proteína completa, así como fragmentos que tienen eliminado el C-terminal. Se observó que las proteínas mutantes conservaron la capacidad de sintetizar polímero, pero la actividad hidrolítica aumentó, alterando la relación transferencia/hidrólisis. De estos estudios es posible concluir que en la mayoría de las enzimas analizadas hasta la fecha la eliminación total o parcial del C-terminal no afecta la actividad enzimática.

Tabla 1.2. Secuencias repetidas en el dominio C-terminal de las glicosiltransferasas

Motivo	Tamaño (aa)	Secuencia consenso
A	32-37	WYYFNxDGQAATGLQTVFDNGxQVKG
B	45	VNGKTYYFGSDGTAQTQANPKGQTFKDGSGVLRFYNLEGQYVSGSGWY
C	20	DGKIYFFDSGEVVKNRfv
D	15	GGVVKNA DGTYSKY
N	12	YYFxAxQGxxxL

Rusell (1990), Ferretti y col. (1987), Giffard y col. (1991) y Monchois (1997)

Todos los genes de la tabla 1.1 han sido clonados en diversos plásmidos expresados en diferentes bacterias, tanto Gram (+) como Gram (-). Para *E. coli*, entre las que destacan DH1, DH5 α , JM109, BL21 (DE3) y TOP10. En todos los casos se ha observado variabilidad en el peso molecular de las proteínas recombinantes así como la aparición de más de dos bandas activas en geles de SDS-PAGE. Algunos reportes atribuyen este fenómeno de multibandeo a un procesamiento proteolítico (Fujiwara y col., 1992, Bozonnet y col., 2002). Probablemente, los cortes son efectuados en las unidades repetidas del C-terminal, ya que en algunas enzimas se

ha visto que la pérdida de éstas no modifica sustancialmente la actividad catalítica (Ferretti y col., 1987, Fukushima y col., 1992). Otros autores sugieren que el sistema de exportación de *E. coli* podría estar reconociendo el péptido señal de la enzima y de alguna manera procesarlo (Monchois y col., 1998) y otros más omiten la discusión (Funane y col., 2000) a pesar de que este fenómeno se observa en sus resultados. Cabe señalar que la ISL de *L. citreum* CW28 ha sido expresada heterológamente (Olivares-Illana y col., 2003) y se observó también proteólisis, originando formas activas. Hasta el momento no se ha podido explicar totalmente el motivo de estas modificaciones en sistemas recombinantes ni qué extremo se podría estar proteolizando.

1.3. Mecanismo de acción de las glicosiltransferasas.

La formación del intermediario glicosil-enzima es el elemento central de todas las reacciones catalizadas por las glicosidasas y glicosiltransferasas. En el mecanismo de formación del estado de transición y del intermediario y posteriormente el enlace glucosídico participa la triada catalítica compuesta por dos ácidos aspárticos (D) y un ácido glutámico (E) (MacGregor y col., 1996). Como se muestra en la figura 1.3 el oxígeno del enlace glucosídico es protonado por el ácido glutámico. Simultáneamente, el carbono anomérico de la unidad glicosídica sufre un ataque nucleofílico mediado por un ácido aspártico, para formar un enlace β -glucosiléster. El nucleófilo es el ácido aspártico 551 en la DSRS de *L. mesenteroides* NRRL B512F y el donador de protones es el ácido glutámico 589. La formación del éster se acompaña de una primera inversión de la configuración. La segunda inversión se efectúa durante la transferencia de la glucosa, en la cual estaría implicado el segundo ácido aspártico de la triada, correspondiente al D662 de la DSRS.

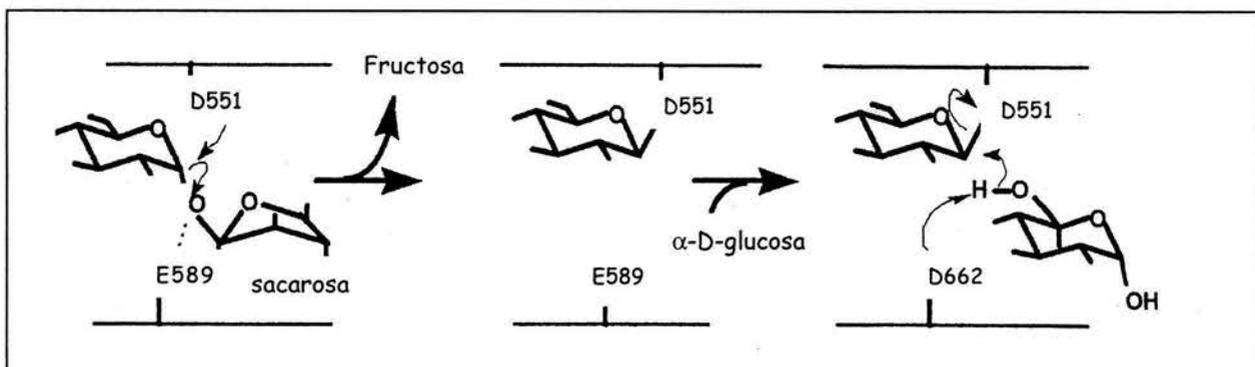


Fig.1.3. Mecanismo de formación del complejo glicosil-enzima

Una vez formado el complejo glicosil-enzima, la glucosa proveniente de la sacarosa puede tomar diferentes rutas (fig. 1.4), ya que puede ser transferido:

1. Sobre la cadena del polímero en elongación.
2. Hacia un aceptor, produciendo oligosacáridos.
3. Hacia una molécula de H_2O , dando lugar a la hidrólisis de la sacarosa.
4. Hacia una molécula de fructosa, dando lugar a la resíntesis de sacarosa o de leucrosa.

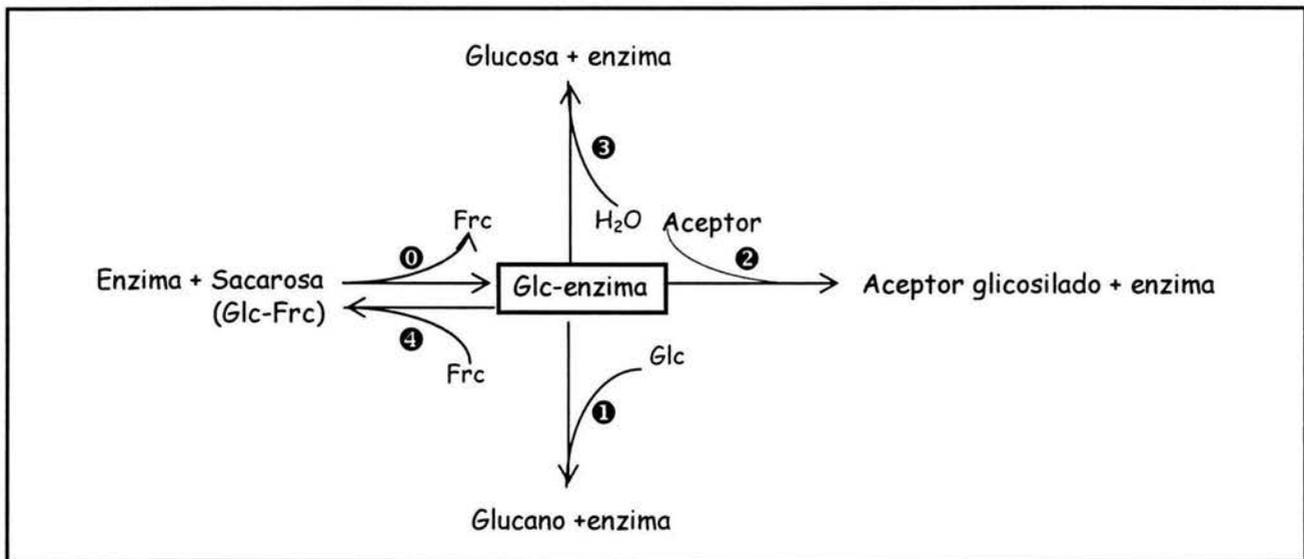


Fig. 1.4. Reacciones catalizadas por las glicosiltransferasas. 0. Formación del intermediario glicosil enzima. 1. Reacción de polimerización o síntesis de glucano. 2. Reacción de aceptor. 3. Hidrólisis 4. Reacción de intercambio isotópico (Mayer 1987).

1.3.1. Mecanismo de síntesis de glucano

La síntesis de glucano se efectúa según un mecanismo progresivo. Existen dos teorías opuestas: una considera que la síntesis es progresiva y se produce a partir del extremo no reductor haciendo intervenir un complejo glicosil-enzima (Mooser, 1992). La segunda teoría habla de un mecanismo igualmente progresivo, pero que involucra dos intermediarios glicosil-enzima durante la elongación y ésta se lleva a cabo a partir del extremo reductor (Robyt y col., 1974).

Elongación por el extremo no reductor.

La elongación del polímero por el extremo no reductor sería similar al mecanismo utilizado por las glicosidasas (Mac Gregor y col. 1996). Kobayashi y Matsuda en 1978, observaron que la glucoamilasa inhibía competitivamente la síntesis de glucano, como consecuencia de la competencia con la dextransacarasa por el grupo glucosilo del extremo no reductor de la dextrana, suponiendo de manera indirecta que el crecimiento de las cadenas se realiza por este extremo (fig. 1.3). Este mecanismo involucra la presencia de un ácido aspártico o un ácido glutámico que actúa como un grupo nucleofílico y otro residuo que actúa como un donador de protones. El grupo carboxilo puede hacer un ataque nucleofílico al C_1 de la glucosa de la sacarosa formando un complejo covalente enzima-glucosa. El otro grupo ácido puede facilitar la liberación de fructosa por la donación de un protón al átomo de oxígeno involucrado en el enlace glucosídico. Este proceso permite también activar a otra molécula de glucosa por la retención del hidrógeno del grupo hidroxilo unido al C_6 . Si la biosíntesis del glucano sigue este mecanismo, la elongación ocurriría en el extremo no reductor de la cadena de glucano y sólo un complejo covalente enzima-glucosa sería necesario.

Elongación por el extremo reductor.

Un segundo mecanismo propuesto es la elongación de la cadena de glucano hacia el extremo reductor. Robyt y col. en 1974, propusieron un mecanismo que hasta la fecha es el más difundido ya que explica diversos fenómenos que ocurren en la reacción (fig. 1.5). Este mecanismo propone la existencia de dos grupos nucleófilos (X) en el sitio activo. Estos grupos atacan a la sacarosa para producir un complejo con dos grupos glucosilo covalentemente unidos a los nucleófilos a través del C_1 . En pasos subsiguientes, el oxígeno del C_6 de una de las moléculas de glucosa del complejo realiza un ataque nucleofílico al C_1 de la glucosa vecina para formar enlaces α -(1,6). Esto ocasionaría la liberación de uno de los dos nucleófilos, lo que le permitiría atacar a una nueva molécula de sacarosa para restaurar así el complejo entre la enzima y la molécula de glucosa. El grupo C_6 -OH de la nueva glucosa incorporada atacaría al C_1 del grupo isomaltosil, formando un enlace α -(1,6) adicional y dando lugar a un trisacárido. Durante la síntesis, los dos grupos catalíticos formarían alternadamente complejos covalentes con la glucosa y con la dextrana. La cadena de dextrana crecería por la inserción de

glucosa entre el grupo catalítico y el extremo reductor del polisacárido. Con este modelo se eliminaría la necesidad de un iniciador. El proceso de crecimiento continúa hasta que la concentración de fructosa alcanza niveles tales que le permiten actuar como aceptor de la transferencia de cadenas de dextrana sola o de la unidad glucosilo unida al sitio activo, deteniendo el crecimiento del polisacárido o formando leucrosa respectivamente.

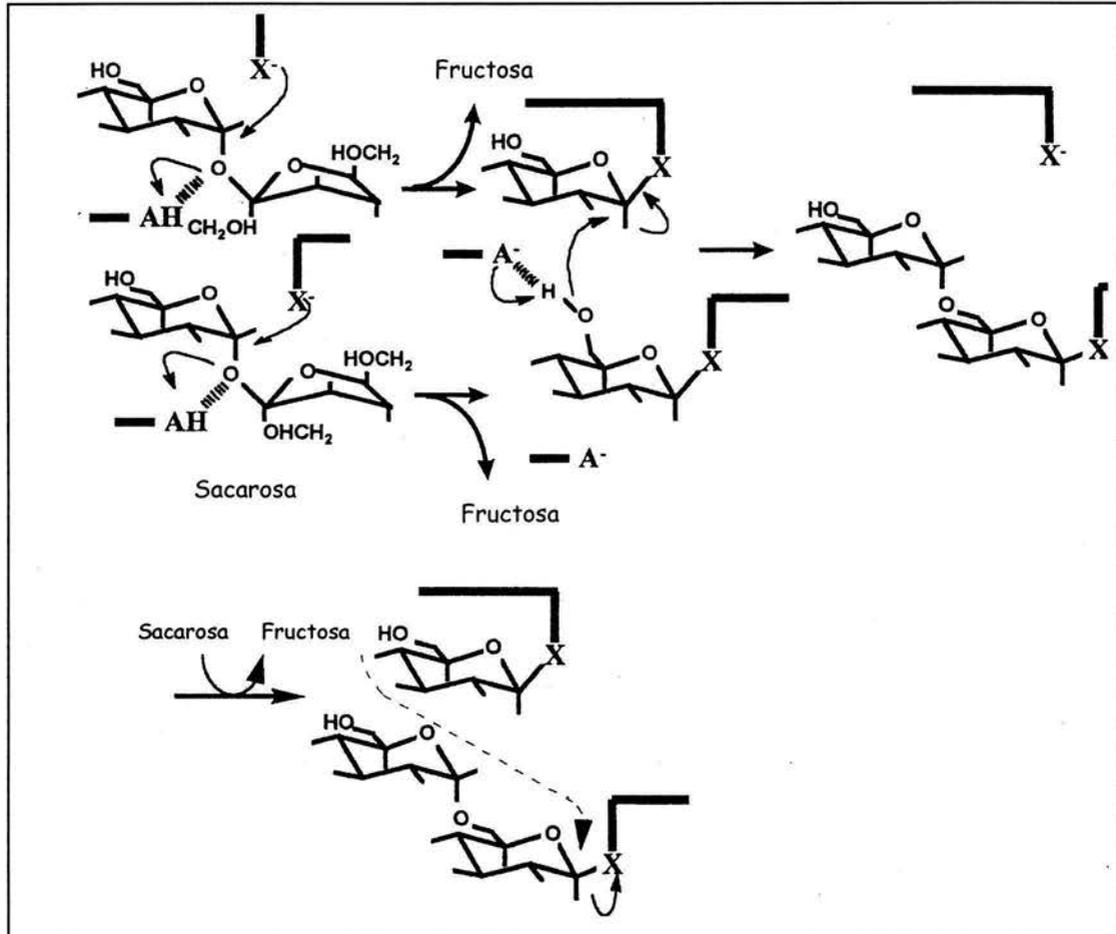


Fig. 1.5. Mecanismo de síntesis de dextrana por la DSR5 de *L. mesenteroides* NRRL B512F (Roby y col., 1974)

1.3.2. Transferencia hacia una molécula aceptora

Esta reacción fue observada por primera vez por Koepsell y col. (1952). Esta compete con la síntesis de glucano y recibe el nombre de "reacción de aceptor". La reacción puede llegar a la:

- Síntesis de un aceptor monoglicosilado, si la molécula formada después de una etapa de glicosilación no retorna como molécula aceptora.
- Síntesis de oligosacáridos de tamaños variables, si el aceptor glicosilado es reconocido como aceptor.

En todos los casos, el residuo glicosil es transferido al extremo no reductor del aceptor (Koepsell y col., 1952).

En contraparte, Robyt y Martin (1983) propusieron un mecanismo donde intervenían 2 intermediarios glicosil-enzima, realizándose la transferencia por el extremo no reductor. Sin embargo esta propuesta ha sido puesta en duda por Monchois y col. (1997). Estos autores estudiaron el efecto de la mutación D551N de la DSRS sobre la síntesis de oligosacáridos u oligósidos, demostrando que la enzima es incapaz de sintetizar productos cuando este aminoácido está mutado. Si la enzima fuera capaz de sintetizar dos intermediarios glicosil-enzima, la mutación de uno de ellos no afectaría la síntesis de oligósidos.

Por otro lado, el glucano libre puede ser un aceptor. La glucosa proveniente de la sacarosa puede ser transferida al extremo no reductor del polímero o sobre alguno de los hidroxilos de los residuos de glucosa de la cadena y de esta manera formar ramificaciones (Roby y Corrigan, 1977). Sin embargo, este mecanismo propuesto no explica la síntesis de glucanos altamente ramificados (Montville y col., 1978). Côté y Robyt (1984) propusieron que en la síntesis de los enlaces α -(1,3), en dextranas altamente ramificadas podría intervenir otro sitio activo, pero esta hipótesis carece de soporte experimental.

Como ya se mencionó, la DSRS es capaz de catalizar en ciertas condiciones otras reacciones como son la hidrólisis de la sacarosa (Robyt y Corrigan, 1977), el intercambio isotópico (Mayer y col., 1981) y las reacciones de desproporción, éstas últimas ocurren cuando la sacarosa se ha consumido totalmente, entonces algunos oligosacáridos funcionan como donadores de la molécula de glucosa y otros como aceptores (Binder y col. 1983 y López-Munguía y col., 1993).

1.4. Peso molecular de la DSRS de *L. mesenteroides* NRRL B512F

Desde hace varias décadas ha existido una controversia en cuanto al peso molecular de la DSRS de *L. mesenteroides* NRRL B512F. Diversos autores han reportado una gran variedad de pesos moleculares desde 65 kDa hasta 188 kDa (tabla 1.3) que presentan actividad dextransacarasa.

Tabla 1.3. Pesos moleculares reportados para la DSRS de *L. mesenteroides* NRRL B512F.

Enzima	Tamaño (kDa)	Referencia
DSRS	188, 126, 65	Kobayashi y Matsuda (1980)
DSRS	174 y 156	Miller y Robyt (1986 ^a).
DSRS	185, 130 y 65	Willemot y col. (1988)
DSRS	177 y 158	Wilke-Douglas y col. (1989)
DSRS	177 y 158	Fu y Robyt, (1990)
DSRS	173 y 155	Sánchez- González (2000)

Kobayashi y Matsuda (1980 y 1986); determinaron que el peso molecular de la DSRS de *L. mesenteroides* NRRL B512F era de 64-65 kDa, y proponían la existencia de 3 monómeros unidos probablemente por la dextrana. Al igual, Kim y Robyt, 1994^a sugirieron que el polímero, en las preparaciones enzimáticas dificultaba la migración en los geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Años más tarde, por medio del uso de radiaciones ligeras de rayos X, Kim y Robyt (1994^b) mutaron el gen que codifica para la DSRS de *L. mesenteroides* NRRL B512F. Logrando su expresión constitutiva y generando así la cepa *L. mesenteroides* NRRL B512FMC. Ésta produce

DSRS sin la necesidad de suministrar sacarosa como inductor, por lo tanto la enzima queda libre de polímero. Sin embargo, en estas preparaciones enzimáticas se continuó observando múltiples bandas con actividad DSRS. Por otro lado, Funane y col. (1995), demostraron que el polímero no intervenía en la migración de proteínas en geles de SDS-PAGE; por lo que probablemente el peso molecular de 170 kDa observado correspondía a la unión de múltiples monómeros.

Wilke-Douglas y col. (1989) lograron aislar, clonar y expresar heterológicamente la DSRS de *L. mesenteroides* NRRL B512F, demostrando que el multibandeo no se debía a agregaciones de la proteína ni a la presencia del polímero, ya que estas preparaciones estaban libres de él. En trabajos con otras GTFs como es el caso de la ASR de *L. mesenteroides* B1355 se sugirió la presencia de actividad proteolítica en los medios de cultivo (Smith y Zanhley, 1997).

En el caso de la GTFs de *Streptococcus*, Grahame y Mayer en 1984 observaron 2 bandas activas de 174 y 156 kDa en los cultivos de *S. sanguis*. En dicho estudio se reconoció la presencia de proteasas en el medio. En *L. lactis* se sabe que el sistema proteolítico es el responsable de la degradación de la caseína (Pritchard y Coolbear, 1993).

1.5. Sistema proteolítico en Bacterias Ácido Lácticas.

El estudio de los sistemas proteolíticos de Bacterias Ácido Lácticas (LABs, por sus siglas en inglés) ha adquirido mucha importancia en las últimas décadas, tanto desde el punto de vista básico como aplicado. Desde el punto de vista básico, es importante entender el funcionamiento del sistema proteolítico de las LABs ya que los productos de degradación obtenidos a partir de proteínas exógenas, constituyen la principal fuente de nitrógeno de las bacterias. Los aminoácidos obtenidos de la degradación son útiles para la síntesis de proteínas, la generación de energía y el reciclado de cofactores reducidos (Pritchard y Coolbear, 1993, Kunjl y col., 1996).

Desde el punto de vista aplicado, las LABs son utilizadas en la elaboración de varios productos alimentarios como quesos y leches fermentadas. El estudio de las propiedades metabólicas de

las LABs tiene una repercusión importante sobre dichos productos industriales (Pritchard y Coolbear, 1993, Tjwan Tan y col., 1993). Hasta el momento, el sistema proteolítico de *Lactococcus* y *Lactobacillus* es de los más estudiados. Tres elementos intervienen principalmente en el sistema:

- Proteinasas
- Sistema de transporte
- Peptidasas

Proteinasas: se encuentran localizadas sobre la superficie de la célula, ocasionando la producción de oligopéptidos de diversos tamaños. La proteinasa extracelular PrtP ha sido identificada como la primera enzima involucrada en la degradación de la caseína. Es una serin proteasa monomérica con un peso molecular entre 180-190 kDa, aunque durante su aislamiento se han encontrado productos de hidrólisis de menor tamaño. El análisis de las secuencias del N-terminal de las proteínas PrtP reveló la presencia de una señal peptídica del tipo sec-dependiente, esta es removida por un proceso post-traducciona dando origen a la proteína madura. El N-terminal de la proteína madura constituye el dominio catalítico y contiene varios residuos conservados que están involucrados en la catálisis y en el posicionamiento del sustrato.

Sistemas de transporte: los oligopéptidos obtenidos de la degradación inicial de la caseína, son translocados a través de la membrana para su futura degradación a aminoácidos en el citoplasma de la célula. Existe un gran número de sistemas de transporte involucrados en este proceso. En *Lactococcus* se han identificado por los menos 10 sistemas de transporte diferentes, entre los que se encuentra un transportador de oligopéptidos (Opp) y dos transportadores de di y tripéptidos (DtpP, DtpT), figura 1.6.

Peptidasas: pueden degradar los oligopéptidos por dos rutas: 1. hidrólisis al azar ó 2. rompimiento sistemático de aminoácidos y péptidos a partir del N-terminal del oligopéptido. Las peptidasas identificadas en LABs son intracelulares, no se ha encontrado ninguna secuencia de anclaje a membrana, lo que es consistente con su localización intracelular.

La variedad de elementos que participan en el sistema proteolítico de *Lactococcus* se pueden confirmar con los datos del genoma secuenciado de *Lactococcus lactis* spp. *Lactis* IL1403 y *Lactobacillus plantarum* WCF51, en los que se han identificado genes que codifican para amino peptidasas, serin proteasas, dipeptidasas y oligopeptidasas, entre otras (Bolotin y col., 2001, Kleerebenzem y col., 2002).

Además de *Lactococcus* y *Lactobacillus*, el análisis del sistema proteolítico se ha extendido a otras LABs como es el caso de *Micrococci*, *Pediococci*, *Leuconostoc* y *Bifidobacteria* (Konings y col., 1991), pero en estos casos su conocimiento es limitado.

En *Micrococcus* GF se han aislado dos proteinasas extracelulares que hidrolizan la caseína. Ambas difieren en los pesos moleculares (23 y 42.5 kDa), pI y en la susceptibilidad a inhibición por EDTA. En otro estudio realizado en *Micrococcus* spp. MCC-315 se identificó una proteinasa extracelular de 29 kDa, clasificada como metaloenzima aunque sensible a inhibidores de serin-proteasas. De igual manera, en *Enterococcus faecalis* subsp *liquefaciens*, *Bifidobacteria* y *Leuconostoc mesenteroides* se ha identificado actividad caseinolítica (Pritchard y Coolbear, 1993).

En otras LABs se ha identificado más de una proteasa extracelular involucrada en la degradación de proteínas extracelulares. En *S. suis* serotipo 2 se identificaron 4 proteasas con actividad dipeptidil peptidasa, arginoaminopeptidasa, caseinasa y DDP IV (Jobin y Grenier, 2003). De la misma manera en cultivos de *Oenococcus oeni* (antes *L. oenos*) se ha identificado y caracterizado parcialmente una proteasa, cuya función sugerida es la de suministrar nutrientes (Farías y Manca de Nadra, 2000).

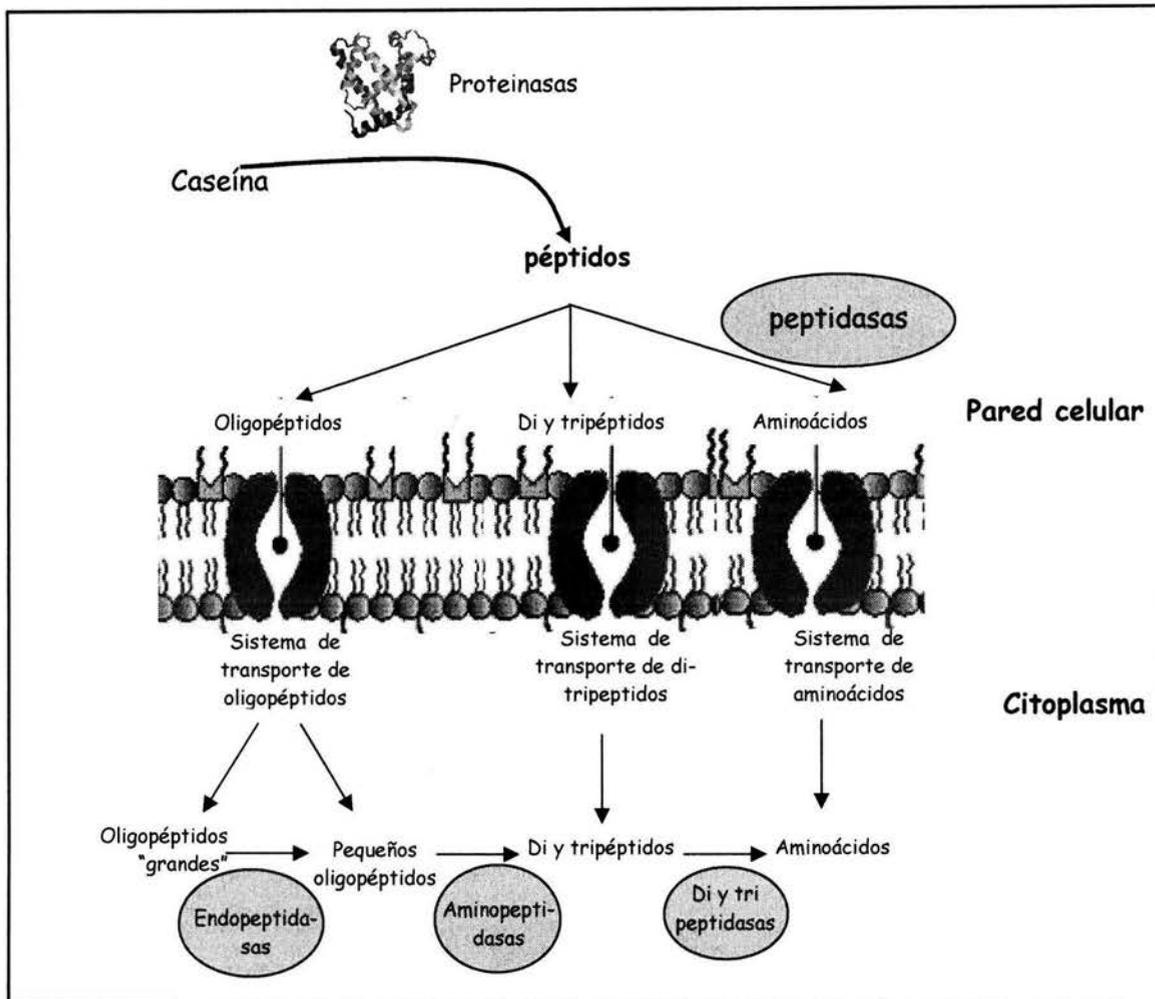


Fig. 1.6. Posibles vías de degradación de caseína por bacterias ácido lácticas (Pritchard y Coolbear, 1993).

1.6. Proteasas en el genoma de *L. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* ATCC 8293

Actualmente está en proceso de secuenciamiento el genoma de *L. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* ATCC 8293 (www.genome.ornl.gov). En la información liberada se han identificado diversas enzimas con probable función proteolítica como se reporta en la tabla 1.4; se incluyen los pesos moleculares, el porcentaje de identidad con respecto a la proteína de referencia y el microorganismo productor de dicha proteína.

Tabla 1.4. Probables proteasas de *L. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* ATCC 8293.

Enzima probable	Peso molecular (kDa)	Identidad (%)	Microorganismo
Proteasa Zn dependiente	19.8	44	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
Proteasa metal dependiente	26.8	34	<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6
Proteasa metal dependiente membranal	14.7	31	<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6
Peptidasa 1B	22.1	36	<i>Staphylococcus aureus</i> ssp. <i>aureus</i> Mu50
Peptidasa tipo IV	24.0	29	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i>
Peptidasa de la familia M23/M37	29.7	34	<i>Streptomyces coelicolor</i>
Proteasa Eep Zn dependiente	45.87	44	<i>Enterococcus faecalis</i>
Prolin dipeptidasa	41.14	29	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Metalopeptidasa extracelular	37.18	55	<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6
Peptidasa O	69.3	64	<i>Streptococcus mutans</i>
Proteasa HtprX-like	32.67	63	<i>Streptococcus mutans</i>

www.genome.ornl.gov

Podemos notar que hay numerosos genes que codifican para enzimas proteolíticas, que constituirían probablemente parte de la poderosa maquinaria proteolítica en *L. mesenteroides*.

1.7. Proteasas en *L. mesenteroides* NRRL B512F

En nuestro laboratorio se identificó por primera vez en extractos enzimáticos de *L. mesenteroides* NRRL B512F y B512FMC una proteasa que podría ser la responsable de la variación del peso molecular de la DSRS (Sánchez-González y col., 1999). Esta proteasa fue caracterizada parcialmente, encontrándose que sus condiciones óptimas de actividad enzimática son pH 8 y 50°C. Sin embargo a pH 5.2 y 30°C aún conserva el 13% de su actividad. Estudios preliminares han mostrado que esta proteasa se requiere en etapas tempranas del cultivo, probablemente para aportar aminoácidos al microorganismo. Por ello, la DSRS alcanza

su actividad máxima después de que la actividad proteolítica ha comenzado a decrecer (Sánchez-González y col., 1999).

1.7.1. Producción de proteasas en *L. mesenteroides* NRRL B512F

En estudios previos realizados en nuestro grupo de trabajo se observó que la producción de la DSRS y de la proteasa se lleva a cabo en el medio de cultivo descrito en la tabla 3.3, sección 3.2 de Materiales y Métodos. Sin embargo, aunque este es el medio óptimo para la síntesis de la DSRS, podría no serlo para la producción de las proteasas. Por tal motivo, se efectuó un estudio acerca de producción de proteasas. Se modificó la fuente de nitrógeno del medio descrito para *Leuconostoc*, utilizando alternadamente: peptona, extracto de levadura, casaminoácidos y triptona. Se observó que el cambio de la fuente de nitrógeno no sólo repercute en la producción de proteasas sino también en la síntesis de la DSRS.

La actividad proteolítica en todos los casos disminuyó, pero en menor porcentaje que la DSRS. Cuando se suministraron extracto de levadura y casaminoácidos, la actividad proteolítica residual fue próxima al 80%, no así la DSRS, que mostró sólo el 10% de actividad residual (cuando se suministraron casaminoácidos).

Así mismo, se realizó un estudio de estabilidad proteolítica a diferentes pH, observando que a pH 8 después de 10 días la actividad proteolítica residual es del 40%, en cambio si se mantiene el pH a 5.2 la actividad residual es del 90%, en el mismo tiempo. Esto explica porque en los extractos enzimáticos de *L. mesenteroides* NRRL B512F después de largos tiempos de almacenamiento a pH 5.2-5.6 y 4°C, distintos autores han observado variación en el peso molecular de la DSRS (Kobayashi y Matsuda, 1980, Miller y Robyt, 1986^a, Willemot y col., 1988, Fu y Robyt, 1990).

1.8. Formas enzimáticas obtenidas de la DSRS de *L. mesenteroides* NRRL B512FMC

El almacenamiento de extractos enzimáticos de *L. mesenteroides* NRRL B512F y B512FMC dio como consecuencia una mezcla de formas enzimáticas proteolizadas, dependiendo de las condiciones y del tiempo de incubación. En los primeros ensayos, se incubaron extractos enzimáticos de *L. mesenteroides* NRRL B512F durante 6 meses a 4°C y a pH 5.2. En estas condiciones se originó una forma proteolizada de la DSRS de 155 kDa. Este cambio en el peso molecular ya había sido reportado por numerosos autores (Fu y Robyt, 1990, Kobayashi y Matsuda 1980 y Miller y Robyt 1986^b).

Sánchez González (2000) caracterizó parcialmente la forma de 155 kDa durante su doctorado en el Lab. del Dr. Agustín López. Los ensayos enzimáticos se hicieron también con la proteína nativa de 170 kDa que se utilizó como control. En términos de pH óptimo, Km y actividad específica no existen diferencias significativas entre ambas formas, únicamente hay una pérdida del 10% de la actividad glicosiltransferasa. Sin embargo, la constante de inhibición por exceso de sustrato (K_i) cambió de 1.8 a 0.6 mM (Sánchez González, 2000). Por lo que respecta al tamaño de polímero, se observó que el polímero producido por la forma de 155 kDa es de estructura similar al que sintetiza la proteína nativa, aunque de menor peso molecular.

1.8.1. Secuenciamiento del N-terminal de las formas de 155 y 129 kDa de la DSRS de *L. mesenteroides* NRRL B512FMC.

En otros ensayos de incubación con extractos enzimáticos de *L. mesenteroides* NRRL B512FMC durante 2 meses a pH 5.2 y 30°C, se obtuvieron 3 formas activas de aproximadamente 155, 129 y 48 kDa, figura 1.7.

Es importante señalar que hasta el momento no se ha encontrado ninguna glicosiltransferasa de 48 kDa que posea actividad enzimática (fig. 1.7).

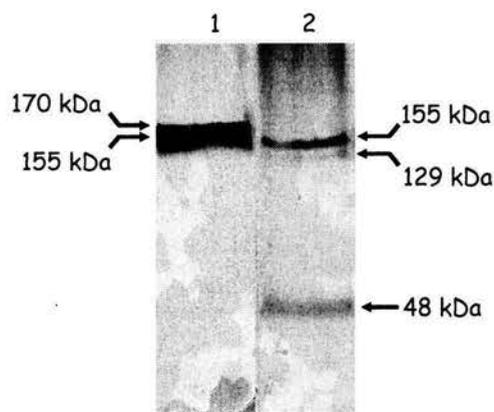


Fig. 1.7. Gel de actividad de las formas proteolizadas de la DSRS nativa: 155, 129 y 48 kDa. 1) Tiempo inicial, 2) Después de dos meses de incubación

Se secuenciaron los extremos N-terminal de las formas proteolizadas de 155 y 129 kDa. Los péptidos obtenidos fueron: FDSKGSSDELTL y FDSKGSSDELTL respectivamente. Estos péptidos se encuentran entre las posiciones 210→ 219 y 210→ 223 en la enzima nativa. De estos resultados se dedujo que el sitio donde la proteasa de *L. mesenteroides* NRRL B512FMC ejerció el corte se encuentra entre los residuos Y209 y F210 de la DSRS. A partir de estos datos de secuenciamiento y de perfiles hidrofóbicos de la DSRS se identificaron sitios de reconocimiento donde la proteasa podría escindir a la DSRS. El dipéptido Y↓F se identificó nueve veces a lo largo de la DSRS, por lo que los sitios probables de escisión estarían repartidos de la siguiente manera: tres en el dominio catalítico (Y252↓F253, Y272↓F273 y Y733↓F734) y cinco más en la región de unión de glucano (GDB) (Y1195↓F1196, Y1237↓F1238, Y1259↓F1260, Y1302↓F1303, Y1452F↓1453) (fig. 1.8) (Argüello-Morales y col., en preparación).

Para la primera forma proteolizada, la masa molecular calculada a partir de la secuencia de aminoácidos es de 147 kDa y podría bien corresponder a la forma de 155 kDa observada en el gel de actividad (figs. 1.7 y 1.8, tabla 1.5). La masa de la segunda forma proteolizada podría ser de 138 o 122 kDa, depende del lugar donde la proteasa endógena efectúe el corte en el carboxilo terminal (fig. 1.8). En el gel de actividad se observa una proteína de aproximadamente 129 kDa (fig. 1.7). La forma enzimática de 48 kDa que se observó en el gel de actividad podría obtenerse si la proteasa corta en

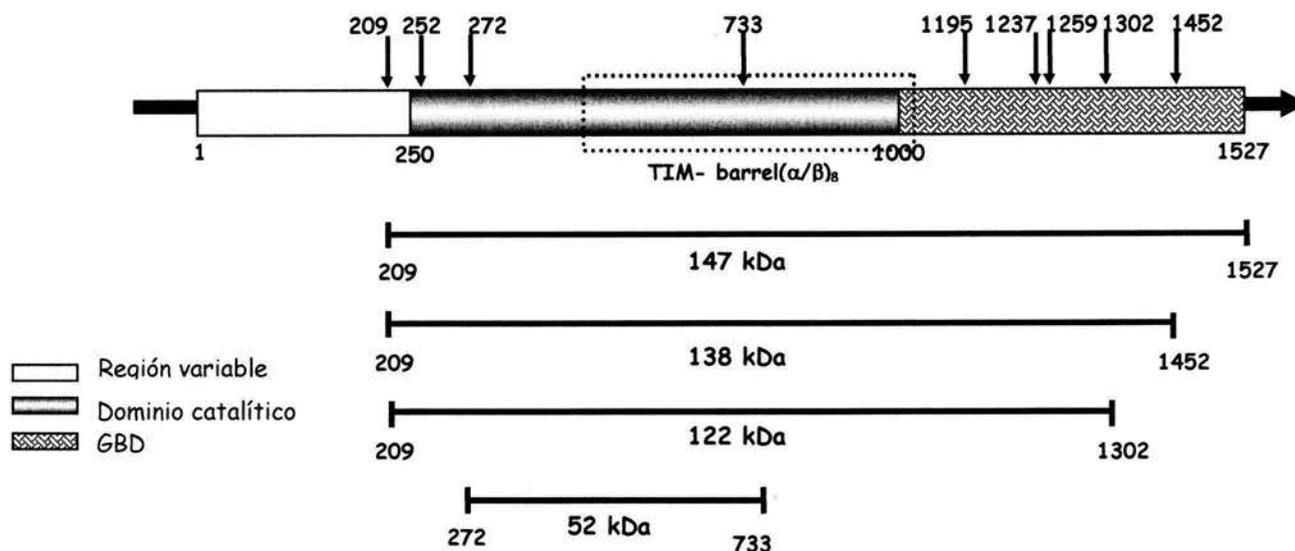


Fig.1.8. Sitios probables de escisión en la DSR5 por la proteasa dando origen a formas enzimáticas de diferente tamaño.

los sitios Y272↓F273 y Y733↓F734 de la DSR5 (Fig. 1.8). De esta manera la masa molecular calculada sería de 52 kDa (Argüello-Morales y col., en preparación) (tabla 1.5).

Tabla 1.5. Pesos moleculares de la DSR5.

Enzima	Longitud (aa)	Peso molecular ^a (kDa)	Peso molecular ^b (kDa)
Nativa (DSRS)	1527	170	173
Forma 1	1318	147	155
Forma 2	1243	138	129
Forma 3	461	52	48

- a. calculados
b. observados

Este modelo sugiere que el corte proteolítico podría efectuarse inicialmente en el N-terminal, en regiones hidrofóbicas. En 2001 se publicó un trabajo donde se analizaron los cortes que efectúan proteasas de *S. aureus* sobre diferentes enzimas extracelulares de cepas estafilocócicas. Los resultados mostraron que los cortes se realizan por el extremo N-terminal de las proteínas. Además, los autores sugieren que

podría haber más de una proteasa involucrada en este proceso (Kawano y col., 2001). Todo esto dio lugar a estudiar más a detalladamente la proteólisis de la DSRS de *L. mesenteroides* NRRL B512F así como la de la DSRS recombinante expresada en *E.coli*, para lo cual se plantearon los objetivos descritos en la sección 2.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Estudiar el procesamiento proteolítico de la dextranacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F.

2.2. Objetivos específicos

1. Producir las proteasas de *L. mesenteroides* NRRL B512F utilizando diferentes fuentes de nitrógeno.
2. Expresar heterológamente el gen que codifica para la DSRS de *L. mesenteroides* NRRL B512F.
3. Realizar ensayos de procesamiento proteolítico de la DSRS nativa y la recombinante.
4. Caracterizar parcialmente las formas proteolizadas de la DSRS en términos de producción de oligosacáridos y polímero.

Materiales y Métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material Biológico

3.1.1. Cepas y plásmidos utilizados.

La cepa *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F se obtuvo de la colección del Northern Regional Research Laboratory (NRRL) Peoria, Illinois. La cepa *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512FMC fue proporcionada por el Dr. Jonh F. Robyt de la Universidad de Iowa, esta cepa produce constitutivamente la dextranacarasa a partir de glucosa como fuente de carbono. Las células se conservaron a -20°C en una solución de glicerol al 30% (v/v) y se utilizaron como inóculos para las fermentaciones.

Las cepas de *Escherichia coli* (tabla 3.1) y los plásmidos (tabla 3.2) utilizados a lo largo de este estudio se enlistan a continuación indicando sus principales características génicas:

Tabla 3.1. Cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo	Referencia
<i>E. coli</i> DH5 α	$\Delta(\text{mcr A})183$, $\Delta(\text{mcr CB-hsdSMR-mrr})$, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac, [F' pro AB, lacI ^q Z Δ M15, Tn10(tet ^r)]	Stratagene
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	B F ⁻ ompT hsdS(r _B ⁻ m _B ⁻) dcm ⁺ Tet ^r gal λ (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam ^r]	Stratagene
<i>E. coli</i> TOP10	F ⁻ mcrA $\Delta(\text{mrr-hsdRMS-mcrBC})$ Φ 80 lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 deoR araD139 $\Delta(\text{ara-leu})7697$ galJ galK rpsL (StrR) endA1 nupG	Invitrogen

Tabla 3.2. Plásmidos utilizados y generados durante este trabajo.

Plásmido	Tamaño (kpb)	Características	Referencia
pTRC99A	4.2	Promotor <i>trc</i> con un terminador transcripcional fuerte. Inducible con IPTG	Amersham
p48-1	5.6	En el plásmido pTRC99A se clonó en los sitios	Argüello Morales,

		<i>Eco</i> RI y <i>Pst</i> I el fragmento que codifica para la proteína DSR4	2002.
pTOPO/TA	4.0	Plásmido de clonación linearizado	Invitrogen
pTPDS8	8.5	En el plásmido pTOPO/TA se clonó en los sitios <i>Kpn</i> I y <i>Xba</i> I el fragmento <i>dsrs</i>	Argüello Morales, 2002
pBAD/TOPO	4.5	Vector de expresión cuyo promotor <i>ara</i> es inducible por L-arabinosa.	Invitrogen
p48-2	6.0	pBAD/TOPO con el fragmento que codifica para la DSR4 clonado en los sitios <i>Eco</i> RI y <i>Pst</i> I.	Este trabajo
p80-2	6.8	pBAD/TOPO con el fragmento que codifica para la DSR8 clonado en los sitios <i>Eco</i> RI y <i>Xba</i> I	Este trabajo
pDXCP	9.0	pBAD/TOPO con el fragmento que codifica para la DSRS clonado en los sitios <i>Nco</i> y <i>Xho</i> I	Olvera Carranza, 2003
pDXSP	8.9	pBAD/TOPO con el fragmento que codifica para la DSRS sin péptido señal clonado en los sitios <i>Eco</i> RI y <i>Xba</i> I,	Olvera Carranza, 2003
pDSPH	8.9	pBAD/TOPO con el fragmento que codifica para la DSRS sin péptido señal clonado en los sitios <i>Eco</i> RI y <i>Eco</i> RV, con colas de histidina	Este trabajo.

3.2. Medios y condiciones de cultivo

Las cepas de *L. mesenteroides* se reactivaron a partir de células liofilizadas en el medio descrito en la tabla 3.3. y cultivadas a 30°C y 250 rpm hasta alcanzar entre 7-8 unidades de DO_{600 nm} y/o un pH alrededor de 5.2. El pH del medio se ajustó antes de esterilizar a 6.9 con ácido fosfórico.

Para la producción de proteasas se utilizó como fuente de nitrógeno casaminoácidos o extracto de levadura en la proporción citada en la tabla 3.3.

Tabla 3.3. Composición del medio de cultivo para la producción de glicosiltransferasas de *L. mesenteroides* NRRL B512F y B512FMC.

Reactivo	Concentración (g/l)
Sacarosa o glucosa ^a	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

^a B512F, sacarosa y B512FMC, glucosa

Las células de *E. coli* se cultivaron, a 37°C y 250 rpm en medio Luria-Bertani (LB) (tabla 3.4) pH fisiológico. El medio fue adicionado con 100 µg/ml de ampicilina ó 50 µg/ml de kanamicina de acuerdo al gen de resistencia del plásmido estudiado. En el caso de la expresión de proteínas heterólogas en *E.coli*, las condiciones del cultivo variaron buscando la máxima producción de proteína. Estas se mencionarán en la sección 4.5.

Tabla 3.4. Medio Luria Bertani

Reactivo	Concentración (g/l)
Bactotripton	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10

El medio para la recuperación de células *E.coli* después de la electroporación, se describe la tabla 3.5.

Tabla 3.5. Medio SOC

Reactivo	Concentración
Tristona	20 g/l

Extracto de levadura	5 g/l
NaCl	10 mM
KCl	2.5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glucosa	20 mM

3.3. Técnicas enzimáticas y bioquímicas.

3.3.1. Producción de glicosiltransferasas de *L. mesenteroides* NRRL B512F.

El inóculo de las fermentaciones se preparó a partir de células almacenadas en glicerol 30% (v/v) a -20°C en matraces, guardando una relación de volumen nominal:volumen de trabajo de 5:1. la fermentación se llevó a cabo en matraces de 2.8 l con 1 l de medio de cultivo que se inoculó al 10% (v/v) (fig. 3.1).

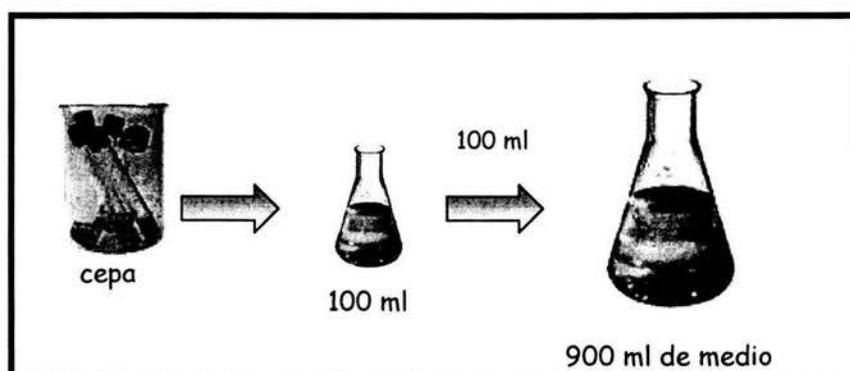


Fig. 3.1 Esquema de propagación de *L. mesenteroides* NRRL B512F para la producción de la DSRS.

El crecimiento celular se monitoreó midiendo la densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro Beckman modelo DU® 650. La fermentación se detuvo cuando el cultivo mostraba entre 7 y 8 U de DO_{600nm} y/o pH 5.2. Posteriormente, las células fueron separadas del sobrenadante por centrifugación a 12857 g durante 20 min. a 4°C. El sobrenadante conteniendo las enzimas se recuperó y se ajustó el pH a 5.2 con soluciones de NaOH o H₃PO₄ 5 M.

El sobrenadante se concentró 20 veces con el sistema de ultrafiltración de fibras huecas Amicon® utilizando una membrana de corte de 20 kDa. Posteriormente se dializó durante una noche en presencia de amortiguador de acetatos pH 5.2 20 mM.

3.3.2. Producción de proteasas de *L. mesenteroides* NRRL B512F y B512FMC.

El inóculo para las fermentaciones se preparó a partir de células almacenadas en glicerol 30% (v/v) a -20°C en matraces de 250 ml con 50 ml de volumen de trabajo. Las células se crecieron en el medio de cultivo descrito en la tabla 3.3, suministrando sacarosa como fuente de carbono. Después de 16 h de crecimiento se inoculó un matraz de 3000 ml con 1000 ml del medio, modificando la fuente de carbono o de nitrógeno, según los requerimientos de trabajo. Los cultivos se inocularon al 10% (v/v).

La fermentación se detuvo cuando el cultivo mostró entre 2.5 y 3 U de $DO_{600\text{ nm}}$ y/o pH 5.2. el caldo de cultivo se mantuvo a 4°C durante 1 h antes de ser centrifugado a 12 857 g durante 20 min. a 4°C, el sobrenadante conteniendo las proteasas se recuperó y el pH se ajustó a 5.2 con soluciones de NaOH o H_3PO_4 5 M.

El sobrenadante se concentró 20 veces con el sistema de ultrafiltración de fibras huecas Amicon® utilizando una membrana de corte de 20 kDa. Éste se dializó durante una noche en presencia de amortiguador de acetatos 20 mM pH 5.2. El dializado se liofilizó para su conservación a temperatura ambiente.

3.3.3. Determinación de la actividad enzimática dextranasa.

La actividad dextranasa se determinó por la cuantificación de azúcares reductores liberados durante la reacción enzimática en presencia de 100 g/l de sacarosa en amortiguador de acetatos 50 mM pH 5.2 y 30°C. Los azúcares reductores se determinaron con el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Sumner y Howell, 1935). Una unidad dextranasa

se define como la cantidad de enzima que provoca la liberación de una μmol de fructosa por minuto en las condiciones mencionadas.

3.3.4. Determinación de la actividad proteolítica.

Esta técnica se basa en la cuantificación de péptidos y aminoácidos liberados al medio de reacción por la proteólisis de la caseína (Ichishima E., 1970).

Reactivos

- Ⓢ Caseína 1% (w/v) Sigma
- Ⓢ Ácido tricloroacético 5 % (w/v) (TCA)
- Ⓢ Amortiguador Tris-base 50 mM CaCl_2 5mM pH 10

Preparación de reactivos

- Ⓢ Caseína 1% (w/v). Ésta se disolvió en amortiguador fosfatos 20 mM pH 7 en baño maría con agitación durante 30 min.
- Ⓢ Amortiguador Tris-base 50 mM CaCl_2 5mM pH 10. El pH se ajustó con HCl 50% (v/v) posterior a la adición del CaCl_2 .

Procedimiento

1. En tres tubos llamados "blanco", "testigo" y "problema" previamente esterilizados, se les colocó caseína 1% (v/v) y la muestra en las siguientes cantidades:

Solución	Blanco	Testigo	Problema
Caseína 1% (v/v)	0.9 ml	0.9 ml	0.9 ml
Muestra	0 ml	0 ml	0.1 ml

Los tubos se incubaron durante 15 h a 37°C y permanecieron muy bien tapados durante la reacción, para evitar evaporación.

2. Después de la incubación, se agregó:

Solución	Blanco	Testigo	Problema
TCA 5%	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml

Muestra	0 ml	0.1 ml	0 ml
Tris-base 50 mM CaCl ₂ 5mM pH 10	0.1 ml	0 ml	0 ml

El TCA precipitó la caseína que no se proteolizó, los aminoácidos y péptidos permanecieron solubles.

3. La reacción se congeló durante 1h.

5. Posteriormente, el medio se centrifugó durante 10 min a 10000 rpm. El sobrenadante se transfirió a otro tubo limpio.

6. Se ajustó a cero con el "blanco". La lectura del testigo se le restó a la lectura del problema. Se utilizó el espectrofotómetro Spectronic 601 de Milton Roy a 280 nm.

El estándar se realizó de la misma manera. Como estándar se utilizó tripsina pancreática bovina (Tipo V, Sigma). La concentración varió entre 0-48 U/ml. La actividad proteolítica equivale a una unidad relativa de tripsina.

3.3.5. Cuantificación de proteína.

La determinación de la concentración de proteínas totales se realizó por el método de Bradford (1976), utilizando el kit Bio-Rad (Hercules, CA), empleando como estándar albúmina sérica bovina (fracción V, SIGMA). La concentración de la curva estándar osciló entre 0-20 mg/l de proteína.

3.3.6. Electroforesis de proteínas.

Las proteínas se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS) siguiendo la metodología de Laemmli (1970). Se utilizó una cámara Mighty small I, con geles de 1 mm de espesor. El gel concentrador se realizó al 4% y el de separación al 8% de poliacrilamida, los pesos moleculares a separar en esta concentración se encuentran en el rango de 50 a 200 kDa. Las

muestras a analizar se incubaron a 95°C durante 5 min con una solución de carga desnaturizante (tabla 3.6).

Tabla 3.6. Composición de la solución desnaturizante para la electroforesis de proteínas

Reactivo	Concentración
tris-HCl	0.12M pH 6.8
SDS	4% (W/V)
glicerol	20% (V/V)
β-mercaptoetanol	10% (V/V)
azul de bromofenol	0.05% (W/V)

La migración se efectuó a corriente constante de 20 - 50 mA. La solución amortiguadora empleada para la electroforesis contiene Tris-base 15.1 g/l, glicina 72 g/l, SDS 5 g/l. Posterior a la migración, el gel podía seguir uno de los siguientes tratamientos:

- A. *Coloración de proteínas con azul de coomassie:* el gel se incubó durante una noche (O/N), en una solución de ácido acético 10% (v/v), metanol 30% (v/v) y azul de coomassie 0.2% (v/v). Posteriormente, se efectuaron lavados del gel para eliminar los excesos del colorante con una solución de ácido acético 10% (v/v) y metanol 30% (v/v).
- B. *Coloración con reactivo de Schiff:* el gel se lavó a temperatura ambiente 3 veces durante 20 min con una solución renaturalizante que contiene: amortiguador de acetatos 20-50 mM pH 5.2 y Tritón X-100 o Tween 80 al 1% (v/v). Posteriormente, el gel se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente con esa misma solución adicionada con sacarosa 100 g/l. La aparición de bandas blancas correspondieron a la síntesis de polímero producido por las GTFs. Las bandas de polímero son fijadas con una solución de etanol al 75% (v/v) durante 30 min. Posteriormente el gel permaneció 1 h en una solución de ácido peryódico 0.7% (p/v) y ácido acético 5% (v/v). Después, se efectuaron 3 lavados sucesivos de 20 min con metabisulfito de sodio 0.2% (p/v) y ácido acético 5% (v/v).

Finalmente el gel se puso en contacto con el reactivo de Schiff (Sigma) hasta alcanzar la coloración deseada.

Para la determinación de actividad proteolítica en gel, las proteínas se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida en presencia de SDS, siguiendo la metodología de Laemmli (1970). Se utilizaron geles de 1.25 mm de espesor, donde el gel de concentración se realizó al 4% poliacrilamida (p/v) y el de separación al 15% poliacrilamida (p/v), debido a que la proteasa tiene un peso molecular cercano a 30 kDa. Se adicionó como sustrato gelatina al 0.1% (w/v). Las muestras se mezclaron con una solución de carga que se describe en la tabla 3.6, sólo que ésta no contiene β -mercaptoetanol. La migración se realizó en la forma anteriormente descrita. Después de la migración, el gel se lavó con una solución de Tris-HCl pH 8 y Triton X-100 1 % (v/v) durante 1 h. Posteriormente, el gel permaneció en incubación durante 48 h a 37°C en esta misma solución, realizando cambios de ésta cada 12 h. Finalmente, el gel se tiñó durante 2 h con una solución de coomassie R-250 (0.25% p/v) que contiene propanol 25% (v/v) y ácido acético 10% (v/v) y se destiñó con ácido acético 10% (v/v). Las bandas claras corresponden a la degradación de la gelatina por la(s) proteasa(s).

3.3.7. Ensayos proteolíticos.

Los extractos que contenían la DSRS nativa después de haberse producido y concentrado (como se describe en la sección 3.3.1.) se dializaron en membranas de poro de 13 kDa con amortiguador de fosfatos 20 mM para modificar el pH, de igual manera se procedió con los extractos proteolíticos de *L. mesenteroides* NRRL B512F y B512FMC y con los extractos de la DSRS recombinante. Posteriormente se realizaron las mezclas DSRS(nativa o recombinante)/proteasas y se incubaron durante tiempos variados, tomando alícuotas a diferentes tiempos de proteólisis.

3.3.8. Síntesis de oligosacáridos

Las reacciones de aceptor se realizaron en las siguientes condiciones:

Sacarosa	10 g/l
Maltosa	10 g/l
Amortiguador de acetatos pH 5.2	20 mM
Azida de sodio	1 g/l
CaCl ₂	0.05 g/l
Enzima	1 U/ml

Las reacciones se llevaron a cabo durante 52 h a 30°C. Para el caso de la proteína recombinante, las bandas de polímero observadas en gel de SDS-PAGE 6% se cortaron y se lavaron con amortiguador de acetatos 20mM. Finalmente se colocaron en la mezcla mencionada. Las alícuotas tomadas se ebullieron durante 5 min, con el fin de inactivar la enzima.

Los oligosacáridos fueron analizados utilizando un equipo de cromatografía líquida a alta presión (HPLC), en un sistema Waters equipado con un detector de índice de refracción, una columna C₁₈ y agua ultrapura como fase móvil a un flujo de 0.7 ml/min.

3.3.9. Producción de glucano.

Se utilizaron las mismas condiciones de la sección 3.3.8., a diferencia de que sólo se suministró sacarosa 100 g/l como sustrato. Después de 2 días de reacción el polímero se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto. Posteriormente se centrifugó a 12857 rpm durante 30 min. Se repitió esta operación de 4-5 veces, finalmente el polímero se resuspendió en 10 ml de agua, se dializó durante 24 h. y se liofilizó para su análisis.

3.4. Técnicas de Biología Molecular

3.4.1. Extracción de ADN de *L. mesenteroides* NRRL B512F

La extracción de ADN de *L. mesenteroides* B512F se realizó a partir de un cultivo de 50 ml que creció durante toda la noche en el medio descrito en la tabla 3.3, utilizando glucosa como fuente de carbono. Las células se recuperaron por centrifugación a 3214 g y se resuspendieron en 10 ml de amortiguador TE 50/20 para lavarlas. Se centrifugaron y resuspendieron en 4.5 ml del mismo amortiguador adicionado con 50 μ l de RNAasa (10 mg/ml), se mezcló bien y se agregaron 500 μ l de lisozima (10 mg/ml en TE), se incubó 30 min a 37°C. Posteriormente se adicionaron 50 μ l de proteinasa K (20 mg/ml), se incubó 15 min a 37°C y se adicionaron 500 μ l de SDS 10% (p/v) y se incubó nuevamente a la misma temperatura durante 30 min. más. Se agregó 1 ml de NaCl 5 M, se agitó por inversión y se incubó 5 min a 65°C, finalmente se adicionó 800 μ l de bromuro de hexadeciltrimetil amonio (CTAB), se mezcló muy bien por inversión se incubó durante 10 min más a 65°C. Posteriormente, se extrajo con un volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), agitando por inversión. Se centrifugó 10 min a 12000 rpm. Se extrajo 2 veces más con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (24:24:1), se extrajo una vez más solo con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) para remover los restos de fenol. Se precipitó adicionando 0.6 volúmenes de isopropanol e incubando 10 min. a temperatura ambiente. Se centrifugó durante 15 min a 12 000 rpm. Se lavó la pastilla tres veces con 1 ml de etanol al 70% sin vortexear. La pastilla finalmente se resuspendió en 30-70 μ l de TE.

El CTAB se preparó disolviendo 4.1 g de NaCl en 80 ml de agua. Lentamente se agregaron 10 g de CTAB con calentamiento y agitación. Cuando se disolvió se ajustó el volumen a 100 ml con agua miliQ. El amortiguador TE se preparó agregando 8 ml de Tris 1 M pH 8.0 y 2 ml de EDTA 0.25M aforando a 100 ml con agua miliQ.

3.4.2. Purificación de ADN plasmídico.

Se extrajo con el Kit CONCERT de Invitrogen siguiendo las indicaciones del proveedor a partir de 5 ml de cultivo crecidos O/N en medio LB adicionado con el antibiótico requerido.

3.4.3. Amplificación de fragmentos de ADN (PCR).

Los fragmentos de ADN se amplificaron por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las amplificaciones del gen *dsrs* de *L. mesenteroides* NRRL B512F se realizaron con la polimerasa Elongase Enzyme Mix (Invitrogen) ya que agrega una terminación de A, necesaria para la clonación en los sistemas de expresión pBAD/TOPO, además de ser una polimerasa de alta fidelidad. El volumen final de reacción fue de 50 μ l colocando los siguientes volúmenes de cada reactivo:

Elongase Enzyme Mix (Invitrogen)	1 μ l
dNTP's (2.5 mM)	4 μ l
Oligonucleótidos (50 pM)	0.5 μ l
DNA	100 ng
Mg SO ₄ (1.8 mM)	10 μ l

Las reacciones se realizaron en el termociclador RoboCycler Gradient 96 Stratagene.

El tiempo de elongación varió de acuerdo a la longitud del fragmento amplificado de ADN, tomando en cuenta que por cada 1000 pb es tiempo de extensión es de 1 minuto (tabla 3.7). La temperatura de alineamiento varió entre 55-61°C (tabla 3.7).

Tabla 3.7. Condiciones de amplificación de los fragmentos de ADN.

No. de ciclos	Etapa	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
1	Desnaturalización	5	94
30	Desnaturalización	1	94
	Alineamiento	1	Variable ^a
	Extensión	Variable ^b	68
1	Extensión final	10	68

a. 50-61°C.

b. Tiempo de extensión de acuerdo al tamaño del fragmento a amplificar

Para analizar los productos de PCR obtenidos se utilizaron 5 µL de reacción y se corrieron en geles de agarosa 0.8% a voltaje constante (100V).

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se enlistan a continuación.

Tabla 3.8. Oligonucleótidos utilizados.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Longitud (nt)	T _m (°C)
Para clonación del gen <i>dsr</i> y las versiones truncadas en pBAD/TOPO			
48 EcoRI	TAT GAA TTC GAT AAT CTT GGG CAA CTA	27	72
48 Pst I	AAA ACT GCA GAT CAT CTG TAT ATA AAT C	28	72
48 Xba I	GCT CTA GAG CAA ATT ATA TTG GTC	28	76
dsrpBADINI	TCC ATG GCA TTT ACA GAA AAA GTA ATG CGG	30	68
dsrpBADSP	GAT GCC ATG GGT ACC CCA AGT GTT TTA GGA GAC	33	73
dsfiXhoI	CAC TAT ATC TCG AGA AAG CTT ATG CTG ACA CAG C	34	70
Para clonación del gen <i>dsr4</i> en pTRC			
48 EcoRI	TAT GAA TTC GAT AAT CTT GGG CAA CTA	27	72
48 Pst I	AAA ACT GCA GAT CAT CTG TAT ATA AAT C	28	72
48 Xba I	GCT CTA GAG CAA ATT ATA TTG GTC	28	76
Para clonación del gen <i>dsr</i> en pTOPO/TA			
DSXpn	GAA GGT ACC ATG CGG AAA AAG CTT TAT AAA G	31	86

DsXba	GCT CTA GAC AGA AAG CTT ATG CTG ACA CAG	30	88
Para clonación del gen <i>dsr</i> en pBAD/TOPO con histidinas en el extremo 3'			
dsrpBADINI	TCC ATG GCA TTT ACA GAA AAA GTA ATG CGG	30	68
sandsrs2	ACT ATA TCT CGA GAT ATC ATA TGC TGA CAC AGC	33	68

Las clonaciones de los productos de PCR se realizaron con el Kit pBAD/TOPO® Thio Fusion de Invitrogen siguiendo las especificaciones del proveedor.

3.4.4. Preparación de células electrocompetentes

A. Células *E. coli* DH5 α

1. Se inoculó en 500 ml de YT2X (Triptona 16 g/l, extracto de levadura 10 g/l, NaCl 5 g/l) con 5ml de un cultivo O/N y crecieron hasta $DO_{600nm} \equiv 0.6$. El cultivo se dejó en hielo durante 30 min.
2. El cultivo se centrifugó 10 min. a 10000 g, 4°C
3. Las células se resuspendieron en 500 ml de agua milliQ fría y estéril y se centrifugaron durante 10 min a 10000 g, 4°C.
4. Posteriormente se resuspendieron en 250 ml de agua fría y se centrifugaron 10 min a 1000 g, 4°C. Se repitió este paso una vez más.
5. La pastilla celular se resuspendió sin vortexear en 30 ml de glicerol 10% (V/V) (preparado en agua miliQ estéril).
6. Se centrifugó la pastilla durante 10 min a 10000 g, 4°C.
7. Se revisó la DO de la pasta, $DO_{600nm} = 100$ corresponde a 3.1010 células/ml (es el mínimo que se debe obtener). La pastilla se diluyó en caso de que hayan estado más concentradas.
8. Las células se alicuotaron y guardaron a -80°C

B. Células *E. coli* BL21

1. Se parte de un precultivo O/N en medio LB, descrito en la tabla 2.4.

2. Se inoculó al 2% (v/v) en medio LB y se mantuvo el cultivo a 37°C hasta que alcance 0.4 unidades de $DO_{600\text{ nm}}$.
3. Posteriormente el cultivo se mantuvo en hielo durante 20 min.
4. El cultivo se centrifugó durante 10 min, 4 000 rpm y 4°C. El sobrenadante se desechó y las células (sin vortexear) se resuspendieron en la cuarta parte del volumen de fermentación en glicerol al 10% (v/v) estéril previamente enfriado.
5. La suspensión se centrifugó con las condiciones del paso 4.
6. En la centésima parte del volumen de fermentación la pastilla celular se resuspendió en glicerol al 10% (v/v) estéril.
7. Las células se alicuotaron en volúmenes deseados en tubos estériles.
8. Las células se almacenaron a -80°C.

3.4.5. Transformación de *Escherichia coli*.

Las cepas de *E. coli* se transformaron por electroporación con un aparato Micropulser Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) bajo las siguientes condiciones: 2.5kV, 25 μF y 200 Ω . Se colocó de 2-5 μl de plásmido purificado o de ligación con 60 μl de células electrocompetentes en una cubeta de 0.2 mm, después de la electroporación se agregó 1 ml de medio SOC, las células se transfirieron a un tubo eppendorf y se mantuvieron incubadas durante 1 h a 37°C y 250 rpm. Posteriormente se plaquearon en cajas LB con el antibiótico correspondiente.

3.4.6. Secuenciación.

Las secuencias obtenidas en este trabajo se realizaron en el secuenciador automático Applied Biosystem 3100 en la Unidad de Secuenciación Automática de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuernavaca, Mor.).

3.4.7. Sobreexpresión de enzimas glicosiltransferasas en *E. coli*.

Diversas cepas de *E. coli* fueron transformadas con los plásmidos pDXCP y pDSPH. Se realizaron cultivos a 37°C a 250 rpm hasta alcanzar $DO_{600\text{ nm}}$ entre 0.4-0.6 unidades, en este punto los cultivos fueron inducidos con diferentes concentraciones de arabinosa, posteriormente se modificó la temperatura a 23, 30 o 37°C, dependiendo el caso de estudio. Las células permanecieron creciendo durante 4 h más y fueron colectadas por centrifugación a 6300 g durante 10 min a 4°C. Posteriormente fueron lavadas en 2 ocasiones con 10 ml de amortiguador de acetatos 20 mM pH 5.2. A continuación, la pastilla se resuspendió en 6 ml de amortiguador de acetatos 20 mM pH 5.2 con tritón x-100 1% (v/v) (en 50 ml de esta solución fue suspendida una tableta Complete-Proteases Inhibitor Cocktail Tablets de Roche), que inhibe serin, metalo y cistein proteasas.

Para la ruptura celular se tomó alguna de las siguientes rutas:

- a. Se sonicaron dando 4 pulsos durante 10 seg., con intervalos de 1 min,
- b. Se utilizó la prensa de French someténdolas 2 veces a 9000 psi de presión;

Posterior a la ruptura celular la muestra, se centrifugó a 10 000 rpm durante 30 min. 4°C y se recuperó el sobrenadante, donde se determinó la actividad dextransacrasa.

3.4.8. Análisis de las secuencias de ADN.

Los alineamientos entre secuencias de aminoácidos se realizaron con el programa ClustalW (www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html). Las comparaciones de las secuencias tanto nucleotídicas como de aminoácidos con las bases de datos se realizaron utilizando distintas versiones de Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

La región promotora fue predicha por el programa Neural Network Promoter Prediction (www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)

Resultados

4. RESULTADOS

Para alcanzar los objetivos de este trabajo se utilizaron dos estrategias: una molecular con la cual se trató de obtener la forma proteolizada de 48 kDa descrita en la figs. 1.7 y 1.8. y otra bioquímica, por medio de la proteólisis limitada de la DSRS de *L. mesenteroides* NRRL B512F obtener la forma enzimática de 48 kDa. Primero se detallará la estrategia molecular y posteriormente la bioquímica.

4.1. Diseño de proteínas mutantes a partir de los datos de secuenciación de las formas proteolizadas.

4.1.1. Diseño de las proteínas mutantes

En un principio, el objetivo de este trabajo fue construir proteínas mutantes de la DSRS a partir de los datos del secuenciación del N-terminal de las formas proteolizadas de 155 y 129 kDa, descritas en la figs. 1.7 y 1.8. En particular, el interés se centró en diseñar la proteína de 48 kDa con actividad glicosiltransferasa.

Para corroborar el modelo descrito en la sección 1.8.1, se amplificaron los fragmentos del ADN de *L. mesenteroides* NRRL B512F que codifican para la proteína completa (DSRS), la proteína de 48 kDa (DSRS4) y para una proteína donde se encuentran todos los elementos del barril (α/β)₈ (DSRS8), figura 4.1.

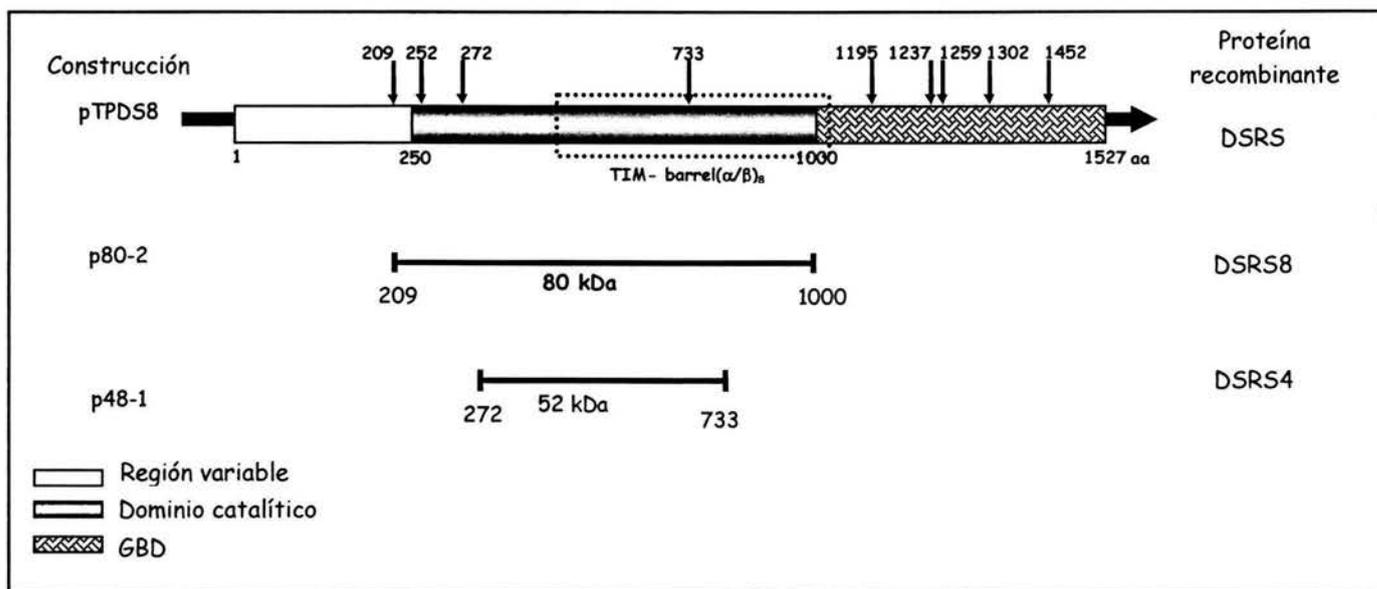


Fig. 4.1. Construcciones y proteínas recombinantes a partir del gen que codifica para la DSRS de *L. mesenteroides* NRRL B512F

En un principio los fragmentos que codifican para la DSRS completa y la proteína de 48 kDa fueron clonados en el plásmido pTRC99A, dando origen a los plásmidos recombinantes pTPDS8 y p48-1, respectivamente (fig. 4.1). Estos se utilizaron para transformar las células de *E. coli* DH5 α .

4.1.2. Expresión heteróloga en *E. coli*

En los primeros ensayos que se efectuaron para actividad glicosiltransferasa utilizando las cepas DH5 α [pTPDS8] y DH5 α [p48-1], no se detectó dicha actividad. Con el fin de favorecer la actividad glicosiltransferasa se utilizaron también las cepas *E. coli* BL21 (DE3) [pTPDS8] y BL21 (DE3) [p48-1] y otras condiciones que a continuación se describen:

- a. *Hospedero*: se utilizaron *E. coli* DH5 α y *E. coli* BL21 (DE3). Esta última es una cepa que expresa eficientemente proteínas heterólogas, pues contiene copias extras de genes que codifican para tRNAs comunes en otros organismos pero ausentes en *E. coli*, además de contener deletadas las proteasas OmpT y lon.
- b. *Condiciones de cultivo*: para ayudar a la expresión modificamos la temperatura y el medio de cultivo. Utilizamos medio LB y mínimo, y los cultivos se hicieron a 20 y 30°C. Realizamos cinéticas después de la inducción con 2 mM IPTG para conocer el tiempo donde la proteína tuviera un mejor nivel de expresión.
- c. *Ruptura celular*: las células se sometieron a sonicación, lisis con lisozima y prensa de French. La actividad glicosiltransferasa se buscó siempre tanto en los sobrenadantes de sonicación como en los restos celulares.

Sin embargo, a pesar de la amplia gama de condiciones ensayadas, no se logró expresar ninguna forma activa de la DSRS.

Expresión en el sistema pBAD/TOPO (Invitrogen)

Después de múltiples esfuerzos en esta dirección, decidimos utilizar otro sistema de expresión para tratar de obtener formas con actividad glicosiltransferasa. Los fragmentos de ADN que codifican para las proteínas DSRS, DSRS8 y DSRS4 se clonaron en el sistema

de expresión pBAD/TOPO, dando origen a los plásmidos recombinantes pDXCP, p80-2 y p48-2, respectivamente. El sistema de expresión pBAD/TOPO está regulado positivamente por el promotor *araBAD*, a su vez está regulado positivamente por el gen *ara C* codificado por el plásmido pBAD/TOPO. Las proteínas recombinantes se expresan como proteínas de fusión con la tiorredoxina (16 kDa), que se encuentra en el N-terminal (fig 4.2). Ésta les ayudaría en el proceso de traducción y en algunos casos en la solubilización, evitando así la formación de cuerpos de inclusión. En el C-terminal se encuentra una serie de histidinas que tienen la función de ayudar a la purificación de la proteína recombinante (fig 4.2). Los pesos moleculares esperados de estas proteínas recombinantes se mencionan en la tabla 4.1.

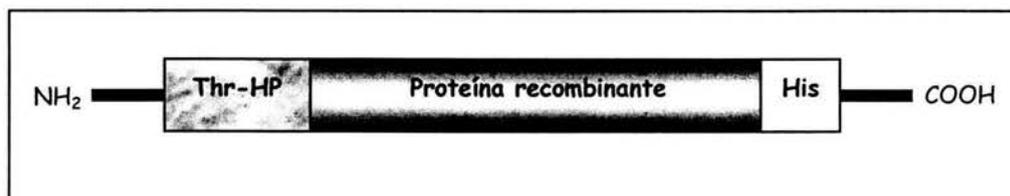


Fig 4.2. Esquema de las proteínas recombinantes que se obtienen de la clonación en el sistema pBAD/TOPO.

Tabla 4.1. Pesos moleculares de las proteínas recombinantes.

Proteína	Peso molecular (kDa) ^a	Construcción	Peso molecular (kDa) ^b
DSRS	170	pDXCP	186
DSRS8	80	p80-2	96
DSRS4	52	p48-2	68

a. proteína nativa

b. proteína + tiorredoxina (16 kDa)

Los plásmidos de la tabla 4.1 transformaron a la cepa *E. coli* DH5 α . Se realizaron cinéticas de inducción con arabinosa al 0.002, 0.02, 0.2 y 2% (p/v) y las células se cosecharon al término de 4 h de haberse inducido. Para la DSRS4 la mayor cantidad de proteína recombinante se obtuvo con arabinosa 0.002% y para la DSRS8 0.02% (p/v). En los geles de SDS-PAGE 10% donde se depositaron células en las que la concentración celular se ajustó por DO_{600 nm} y se lisaron por calor, se observa claramente la sobreexpresión después de la inducción (fig. 4.3 y 4.4).

En la figura 4.3 se muestra la proteína DSR54, proveniente de la clona DH5 α [p48-2]. En los carriles P, se ve claramente la proteína DSR4 sobreexpresada, ésta presenta una peso molecular aproximado de 68 kDa.

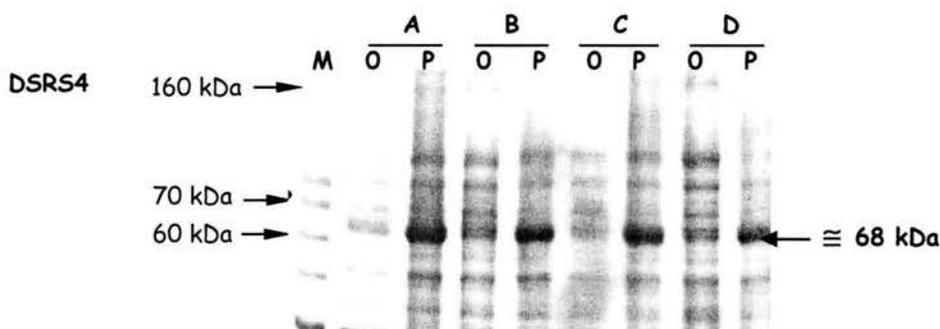


Fig. 4.3. Gel SDS-PAGE 10% con la proteína recombinante DSR54. M: marcador, O: Antes de inducir, P: 5 hrs. posterior a la inducción, A: 0.002%, B:0.02%, C:0.2%, D: 2% (p/v) de arabinosa.

De la misma manera, en la figura 4.4 se muestra la proteína DSR58, proveniente de la clona DH5 α [p80-2], el peso molecular de 96 kDa es el esperado, ya que corresponde a la suma de la DSR58 y de la tiorredoxina (tabla 4.1). En la figura 4.4 se muestra el carril antes de la inducción y 4 horas después.

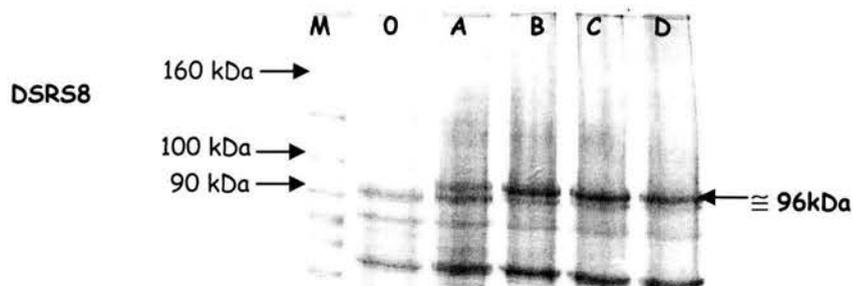


Fig. 4.4. Gel SDS-PAGE 10% con la proteína recombinante DSR58. M: marcador, O: Antes de inducir, A: 0.002%, B:0.02%, C:0.2%, D: 2%, (p/V) de arabinosa, 5 h después de la inducción.

La DSR5 recombinante mostró la mayor expresión cuando se le suministró arabinosa 0.2% (p/v), (fig. 4.5)

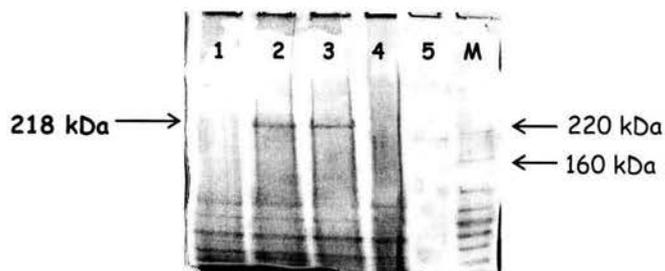


Fig. 4.5. SDS-PAGE 6% en condiciones desnaturalizantes de la DSR5 heteróloga. 1. Arabinosa 0.002% (p/v), 2. arabinosa 0.02% (p/v), 3. arabinosa 0.2% (p/v), 4. arabinosa 0.0% 5. DSR5 de *L. mesenteroides* B512F. M. Marcador de peso molecular

Después de observar que las proteínas recombinantes lograban expresarse, las células se rompieron sonicándolas y se realizaron ensayos de actividad enzimática en las fracciones solubles e insolubles. Las proteínas recombinantes DSR58 y DSR4 se localizaron en la fracción insoluble, en cambio la DSR5 recombinante se localizó en la fracción soluble mostrando actividad (fig. 4.6).

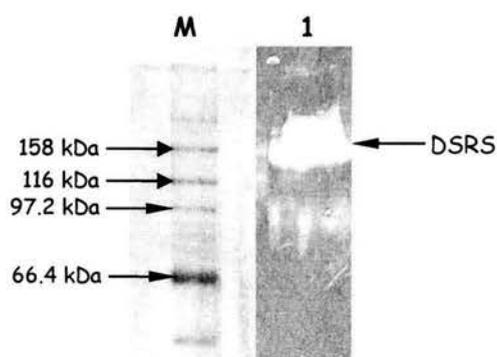


Fig. 4.6. Gel de actividad que muestra a la DSR5 recombinante activa. M. Marcador 1. Sobrenadante de extractos lisados de *E. coli*/DH5 α [pDXCP]

Debido a que la DSR58 y DSR4 se localizaron en la parte insoluble, formando aglomerados proteicos, ya que no mostraron actividad se decidió modificar diversos parámetros para evitar esta formación. A temperaturas menores de 30°C se reduce la velocidad de expresión de proteínas recombinantes y por ende la formación de dichos aglomerados (Galloway y col., 2003), Sin embargo pese a estas modificaciones no se logró obtener actividad glicosiltransferasa en estas proteínas.

Se realizaron trabajos de resolubilización de los aglomerados proteínicos, mediante el desplegamiento con urea 4M y replegamiento con amortiguador de acetatos 20 mM pH 5.2 y tritón X-100 4% (v/v), sin embargo en ninguno de los ensayos de renaturalización se detectó actividad glicosiltransferasa.

4.1.3. Discusión.

Podemos atribuir la falta de actividad glicosiltransferasa a varias razones: se ha reportado que la región variable y el C-terminal no contribuyen sustancialmente a la catálisis; aunque son necesarios para el proceso de plegamiento y contribuyen a la estabilidad. La carencia de estos dominios pudo haber generado formas no estables y/o formas no activas, ya que la proteína recombinante DSRS sí muestra actividad glicosiltransferasa.

En los experimentos donde se obtuvo la proteína de 48 kDa (por proteólisis limitada, a partir de la DSRS nativa), esta provenía de una enzima plegada a la que se realizaron cortes proteolíticos (Argüello-Morales y col., en preparación). Los resultados sugieren que es diferente partir de una enzima plegada para obtener estas formas, que partir de una forma desplegada y tratar de que adopte el plegamiento correcto para que presente actividad, hipótesis que sustentaba este trabajo y que por lo antes expuesto tuvimos que abandonar, abocándonos al estudio del proceso proteolítico, desde un punto de vista bioquímico.

4.1.4. Conclusiones

No se observó actividad glicosiltransferasa en las proteínas DSRS4 y DSRS8 recombinantes.

4.2. Producción de la DSRS de *L. mesenteroides* NRRL B512F y B512FMC.

4.2.1. Cultivo de *L. mesenteroides* NRRL B512F.

La DSRS se produjo por medio de un proceso fermentativo de *L. mesenteroides* NRRL B512F según como se describe en la sección 2.2 utilizando el medio de cultivo mencionado en tabla 2.3. La actividad glicosiltransferasa detectada al final de la fase exponencial fue de 1.5 U/ml.

4.2.2. Cultivo de *L. mesenteroides* NRRL B512FMC

L. mesenteroides NRRL B512FMC produce de manera constitutiva la DSRS, por lo que a diferencia de la nativa ésta no está asociada a polímero. Sin embargo, produce una menor cantidad de proteína activa, ya que sólo registró 0.078 U/ml. Se ha visto que con el número de resiembras, a diferencia de la cepa nativa, la actividad glicosiltransferasa disminuye cerca de 10 veces (Sánchez-González, 2000), por lo que la cepa dejó de utilizarse para la producción de esta enzima.

4.3. Producción de proteasas de *L. mesenteroides* NRRL B512F y B512FMC.

4.3.1. Proteasas de *L. mesenteroides* NRRL B512F y B512FMC.

En varios reportes se ha señalado la importancia que tiene el pH y el efecto de la fuente de nitrógeno sobre la producción y la estabilidad de la DSRS (Tsuchiya y col., 1952, Robyt y Walseth, 1979, Goyal y Katiyar, 1997). Sánchez-González y col. (1999) reportaron la presencia de proteasas en los sobrenadantes de los cultivos de *L. mesenteroides* NRRL B512F y B512FMC. Dado que los rendimientos de actividad proteolítica son muy escasos utilizando el medio descrito en la tabla 3.3, decidimos explorar el efecto de la fuente de nitrógeno sobre la producción de proteasas en los cultivos de *L. mesenteroides* B512F y B512FMC.

En nuestro trabajo realizamos cultivos de *L. mesenteroides* NRRL B512F y B512FMC variando la fuente de nitrógeno y de carbono del medio reportado en la tabla 3.3. Encontramos que cuando se suministra extracto de levadura y glucosa la actividad proteolítica se ve aumentada cerca de 3 veces para la cepa nativa y 5 veces para la constitutiva, con respecto al suministro comunmente utilizado de fuente de carbono y nitrógeno (tabla 3.3), los datos se observan en la tabla 4.2.

Tabla 4.2. Actividad proteolítica en cultivos de *L. mesenteroides* B512F y FMC variando la fuente de nitrógeno y de carbono

Cepa	Fuente de nitrógeno	Fuente de carbono	Actividad proteolítica (U/ml)*	Actividad DSRS (U/ml)*
<i>L. mesenteroides</i> B512F	Extracto de levadura	Sacarosa	145.0	60
<i>L. mesenteroides</i> B512F	Extracto de levadura	Glucosa	395.0	Nd
<i>L. mesenteroides</i> B512FMC	Extracto de levadura	Glucosa	98.8	Nd
<i>L. mesenteroides</i> B512FMC	Casaminoácidos	Glucosa	17.7	Nd

* Extractos concentrados 20 veces

Nd: No detectables

Por lo que respecta a la actividad DSRS, como ya se ha reportado (Quirasco Baruch 2000), ésta sólo se produce en cantidades basales cuando el medio es suministrado con otra fuente

de carbono distinta a la sacarosa, por lo que esperábamos que al suministrar glucosa al medio de cultivo la DSRS se produciría en menor cantidad.

En los ensayos de proteólisis se utilizaron los extractos enzimáticos obtenidos de los cultivos en los que se incluyó extracto de levadura y glucosa en el medio.

Otra técnica utilizada para detección de actividad proteolítica *in situ* fue mediante geles de SDS-PAGE con gelatina (fig. 4.7). En esta figura se observa la actividad proteolítica de los extractos de *L. mesenteroides* NRRL B512F con diferentes fuentes de carbono. Aparentemente no se observan cambios en la producción de proteasas.

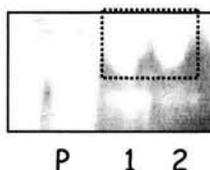


Fig 4.7. Gel de actividad proteolítica, extractos enzimáticos. P. papaína, 1. *L. mesenteroides* NRRL B512F, sustrato sacarosa. 2. *L. mesenteroides* NRRL B512F sustrato glucosa.

La modificación en la fuente de nitrógeno de extracto de levadura por casaaminoácidos tal vez provoca una disminución en la actividad proteolítica porque *L. mesenteroides* no requiere la expresión de su maquinaria proteolítica para adquirir los aminoácidos, puesto que éstos ya son libres, lo que nos podría sugerir que tal vez la proteasa esté relacionada con la obtención de nutrientes. Esta propuesta está sustentada en que Sánchez González (2000) detectó que la actividad proteolítica está vinculada con las etapas tempranas del cultivo, por lo que se sugería que la proteasa tuviera la función de aportar nutrientes a la célula.

De estos experimentos es posible concluir que la actividad proteolítica en cultivos de *L. mesenteroides* NRRL B512F y B512FMC, se logró aumentar en un factor de 3 y 5 veces respectivamente cuando crecieron con extracto de levadura y glucosa. En estas condiciones no se detectó actividad DSRS.

4.4. Proteólisis de la DSRS *L. mesenteroides* NRRL B512F.

4.4.1. Proteólisis de la DSRS nativa.

Teniendo conocimiento que *L. mesenteroides* NRRL B512F produce proteasas (Sánchez-González y col. 1999), sometimos a la DSRS nativa a un proceso de proteólisis limitada durante dos meses a pH 5.2 y 30°C. En estas condiciones el proceso es limitado dado que el pH está muy por abajo del óptimo de la proteólisis. Al término de este tiempo, observamos que la banda de 170 kDa correspondiente a la DSRS desapareció, para dar lugar a una proteína de 162 kDa, figura 4.8. Decidimos seguir el proceso durante un mes adicional, al cabo del cual no se identificó ninguna banda activa que presentara actividad glicosiltransferasa.

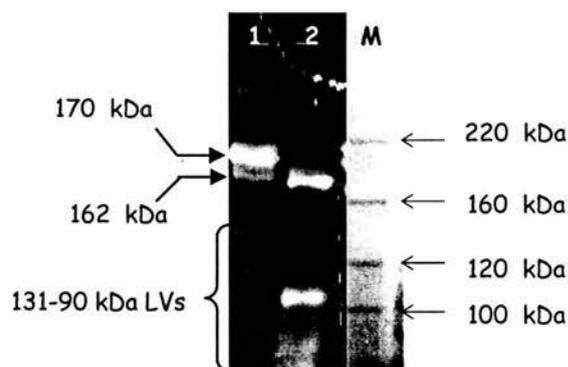


Fig. 4.8. Degradación proteolítica de la DSRS de *L. mesenteroides* NRRL B512F a pH 5.2 y 30°C. 1. tiempo inicial. 2. Dos meses de incubación. LVs levansacarosas. M. Marcador de peso molecular

Otra actividad transferasa observada en este ensayo es una levansacarasa (LV), la cual es una fructosiltransferasa (FTF) que a partir de sacarosa produce un polímero de fructosa, sólo que a diferencia de la DSRS ésta muestra una degradación desde el tiempo inicial (fig. 4.8, carril 1).

Por otro lado cuando la temperatura se mantiene a 30°C y el pH se modifica a 7, la DSRS sin proteasas endógenas (extractos proteolíticos de *L. mesenteroides* NRRL B512F libres de DSRS) pierde el 86% de actividad después de 6 h de incubación. Pero cuando se le suministra inhibidores de proteasas (descrito en Materiales y Métodos), la DSRS pierde solamente 36% de actividad al término de 6 h de incubación, como se muestra en la figura

4.9. Este experimento demuestra que la disminución del peso molecular de la DSRS es provocada por la acción de proteasas, las cuales se ven detenidas cuando se suministra al medio de reacción inhibidores de proteasas.

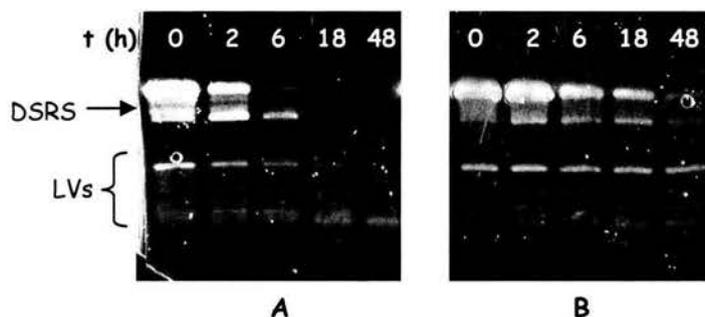


Fig. 4.9. Efecto del pH y del tiempo en la degradación de la DSRS de *L. mesenteroides* B512F sin adición de proteasas endógenas a pH 7 y 30°C. "Gel de actividad" SDS-PAGE. A. DSRS sin inhibidor de proteasas. B. DSRS con inhibidor de proteasas

Las figs. 4.8 y 4.9 cuando son comparadas demuestran la importancia del pH en la proteólisis, confirmando que a pH neutro, la degradación se hace poco específica y rápida para el caso de la DSRS, en cambio a pH 5.2 la proteólisis es lenta y específica. Por lo que respecta a las LVs observadas en las figs. 4.8 y 4.9 éstas también presentan degradación, pero a diferencia de la DSRS no se proteolizan totalmente a pH 7 y 30°C, porque probablemente la proteasa responsable de su degradación sólo es activa a pH 5.2.

4.4.2. Proteólisis de la DSRS nativa con adición proteasas endógenas.

Hemos mencionado reiteradamente que la DSRS sufre una degradación proteolítica por la presencia de proteasas en los extractos enzimáticos, de manera lenta y gradual a pH 5.2 y rápida y total a pH 7. Mediante la adición de proteasas endógenas tratamos de establecer si la velocidad de proteólisis podría acelerarse, por lo que incubamos la DSRS a 30°C y a pH 7, adicionando proteasas de *L. mesenteroides* NRRL B512F que fueron producidas con extracto de levadura y glucosa. La relación DSRS:proteasas fue 1:10. Estos resultados se muestran en la fig 4.10.

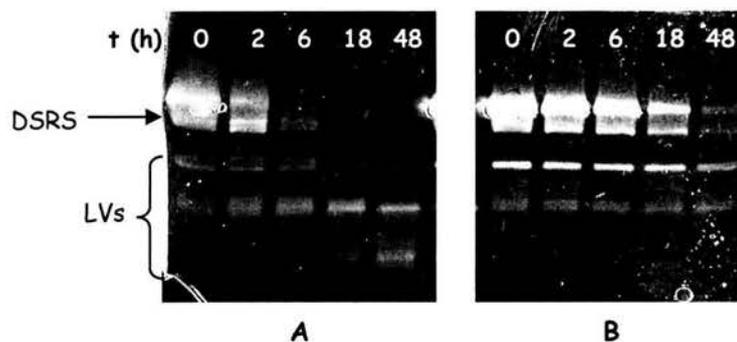


Fig. 4.10. Efecto del pH y del tiempo en la degradación de la DSRS de *L. mesenteroides* B512F con proteasas endógenas a pH 7 y 30°C. "Gel de actividad" SDS-PAGE. A. DSRS sin inhibidor de proteasas. B. DSRS con inhibidor de proteasas

Al analizar la proteólisis de las figs. 4.9 y 4.10., observamos que la proteólisis de la DSRS no se incrementó con respecto a la observada sin proteasas endógenas.

Después de 6 h de incubación, la actividad residual es de 20%. Cuando a la reacción, además de las proteasas endógenas se le agregó inhibidores de proteasas, después de 6 h de incubación, ésta conserva aún el 64% de su actividad (fig. 4.10). El comportamiento resulta muy similar al obtenido en el caso al que no se agregaron proteasas endógenas.

Analizando los resultados de las figuras 4.8 y 4.9 es claro que la proteólisis sólo se realiza por las proteasas producidas por *L. mesenteroides* NRRL B512F en presencia de sacarosa, pues cuando se trata la DSRS con proteasas endógenas obtenidas de los cultivos con glucosa y extracto de levadura, no aumenta la velocidad de procesamiento. Esto ocurre probablemente debido a que la modificación de la fuente de carbono tiene alguna función regulatoria en la producción de determinadas proteasas. Se ha visto que en el caso de *L. oenos* la producción de proteasas está sujeta a represión catabólica por glucosa (Rollán y col., 1998). De esta manera, la proteasa responsable de la degradación de la DSRS probablemente no se exprese cuando la bacteria crece en presencia de glucosa.

La actividad de la proteasa responsable de la degradación de la DSRS se favorece a pH 7 y 30°C, aunque a pH 5.2 conserva su actividad, lo que provoca la degradación parcial de la DSRS, después de largos tiempos de almacenamiento.

Como ya mencionamos, en los extractos enzimáticos de *L. mesenteroides* NRRL B512F se encuentra una LV. Al igual que la DSRS, ésta sufre degradación cuando los extractos enzimáticos permanecen incubados a pH 5.2 (fig. 4.8.), pero cuando los extractos se incuban a pH 7 (figs. 4.9 y 4.10), la LVS no sufre degradación a la misma velocidad que la DSRS. Esto nos puede sugerir que la proteasa responsable de la degradación parcial de la LV es activa a pH 5.2 y probablemente se inhibe a pH 7. Entonces, probablemente haya más de una proteasa en los extractos de *L. mesenteroides* NRRL B512F involucradas en el procesamiento de las GTFs y FTFs. Esta propuesta está basada en el hecho de que la gran mayoría de las LABs presentan una maquinaria compleja de degradación de la caseína (Pritchard y Coolbear, 1993). Por otro lado, en *Staphylococcus aureus* NCT8325 se detectó más de una proteasa involucrada en procesamiento de 3 proteínas extracelulares de esta misma bacteria, encontrando que los cortes proteolíticos se llevan a cabo desde el N-terminal. En los N-terminales identificados de las proteínas procesadas se observa un claro corte de aminoácidos hidrofóbicos (Kawano y col., 2001). Esta hipótesis coincide con el modelo de proteólisis propuesto por Argüello-Morales y col. (en preparación) para la DSRS de *L. mesenteroides* NRRL B512F.

4.5. Expresión heteróloga de la DSRS de *L. mesenteroides* NRRL B512F.

El objetivo de este trabajo es analizar el procesamiento proteolítico de la DSRS nativa y de la proteína expresada heterológamente en *E. coli* DH5 α . Por tal motivo, realizamos la optimización de la producción de la DSRS heteróloga.

4.5.1. Clonación del gen *dsr-S*

En el grupo de trabajo se clonó el fragmento que codifica para la DSRS con y sin péptido señal en el sistema pBAD/TOPO dando origen a los plásmidos recombinantes pDXCP y pDXSP, respectivamente (tabla 3.2). Nuestro trabajo inició secuenciando ambos plásmidos. No encontramos ninguna delección, mutación o cambio en el marco de lectura.

4.5.2. Expresión heteróloga en *E. coli* DH5 α

Células de *E. coli* DH5 α fueron transformadas con los plásmidos pDXCP y pDXSP. Se realizaron ensayos preliminares de actividad glicosiltransferasa y encontramos que solo la cepa *E. coli* DH5 α [pDXCP] presentó actividad. Este resultado es congruente con lo ya reportado; ninguna glicosiltransferasa expresada en *E. coli* es activa sin el péptido señal. Posteriormente, optimizamos diversos aspectos de la producción de la DSRS con péptido señal:

- Concentración de inductor
- Temperatura de cultivo.
- Tiempo de cultivo.

Concentración del inductor

Los cultivos se inocularon al 1% (v/v) con un cultivo over-night (O/N). Crecieron a 37°C hasta alcanzar 0.59 U de DO_{600 nm}, concentración a la que fueron inducidos con arabinosa 0.002, 0.02 y 0.2% (p/v) (fig. 4.9). Monitoreamos el experimento por medio de geles de SDS-PAGE teñidos con azul de coomassie. Notamos que la expresión aparente de la proteína es la misma para 0.02% y 0.2% (p/v) de arabinosa. Sin embargo, cuando se renaturalizaron las enzimas presentes en los geles de SDS-PAGE 6% ("geles de actividad"), observamos que la mayor

cantidad de proteína activa se obtenía con la concentración de 0.2% (p/v) de arabinosa. Para las siguientes etapas de optimización, se empleó esta concentración de inductor (fig. 4.5).

Temperatura de cultivo.

En el protocolo del Kit pBAD/TOPO, se sugiere que la temperatura de fermentación sea 37°C. Sin embargo, la DSRS registra su máxima actividad a 30°C, por lo que también se utilizó esa temperatura. Los cultivos permanecieron a 37°C hasta el momento de la inducción con arabinosa 0.2% (p/v) (0.59 U DO_{600 nm}), momento en el que se modificó la temperatura de los cultivos a 30°C y manteniendo un cultivo control a 37°C. Realizamos geles de SDS-PAGE 6% teñidos con coomassie y "de actividad". Encontrando que la DSRS se expresa mejor a 37°C, aunque se obtiene mayor actividad a 30°C comparando las intensidades de las bandas en los geles de SDS-PAGE 6% de actividad. Los cultivos posteriores se realizaron a esta temperatura.

Utilización de detergentes.

En la solución de ruptura celular (amortiguador de acetatos 20mM pH 5.2, inhibidores de proteasas) fue necesario adicionar tritón X-100 al 1% (p/v) para cuantificar actividad dextranasa. En los casos que no se agregó este detergente no se detectó actividad.

Tiempo de cultivo.

Probamos diversos tiempos de cultivo después de la inducción: 4, 8 y 15 h. En todos los casos lisamos células por sonicación dando 4 pulsos de 10 seg., con intervalos de 1 min. Se determinó actividad en los sobrenadantes celulares. Encontrando mayor actividad a las 4 h de cultivo. Ensayos posteriores realizados por Rafael Beine en nuestro laboratorio mostraron que a las 4 h de cultivo, se produce la mayor cantidad de proteína activa. Una hora después la actividad puede disminuir hasta 9 veces. Después de haber optimizado varios aspectos en la producción y obtención de la DSRS, la actividad máxima obtenida fue de 0.024 U/ml de cultivo.

Podemos concluir que la proteína heteróloga que presentó actividad glicosiltransferasa es la que tiene péptido señal, siendo producida de manera eficiente si se induce con 0.2% de

arabinosa (p/V) cuando la $DO_{600\text{ nm}}$ llega a 0.59 U (a la mitad de la fase exponencial). La fermentación, posterior a la inducción debe realizarse a 30°C y detenerse a 4 h después, pues dejar por más tiempo el cultivo provoca una importante pérdida de enzima activa. Otro aspecto a destacar es que es conveniente utilizar tritón X-100 1% (V/V) en la solución de ruptura celular, pues se piensa que contribuye a la renaturalización proteínica. También es recomendable lisar las células con la ayuda de la Prensa de French, ya que cuando las células se sonicar, la enzima no alcanza los mismos niveles de actividad que cuando son prensadas.

4.6. Proteólisis de la DSRS heteróloga.

4.6.1. Proteólisis de la DSRS heteróloga con adición de proteasas de *L. mesenteroides* NRRL B512 F.

En nuestro afán de saber si la DSRS recombinante sufre la misma degradación que la DSRS nativa, se realizaron incubaciones de ésta con proteasas de *L. mesenteroides* NRRL B512F. Las incubaciones se realizaron bajo diferentes condiciones de temperatura 25, 30, 37, 40°C y 45°C y pH 5.2, 6, 6.5 y 7.0. Para ajustar el pH las muestras se dializaron con buffer de fosfatos 20 mM, al pH correspondiente.

Se tomaron muestras a diversos tiempos hasta 48 h y se analizaron por medio de "geles de actividad" SDS-PAGE 6%. A pesar de las condiciones severas a las que en algunos casos se produjeron las reacciones, en ninguna se observó una degradación total de la proteína.

En la fig 4.11 B observamos a la DSRS a pH 7 y 40°C incubada con proteasas de *L. mesenteroides* B512F. Desde el inicio de la reacción se observan tres bandas activas principalmente (su tamaño y probable origen se discuten más adelante). Durante el proceso, éstas no dan lugar a proteínas activas de menor peso molecular, ni se observa una degradación drástica de alguna proteína, como en el caso de la DSRS nativa (fig 4.9A y 4.10A).

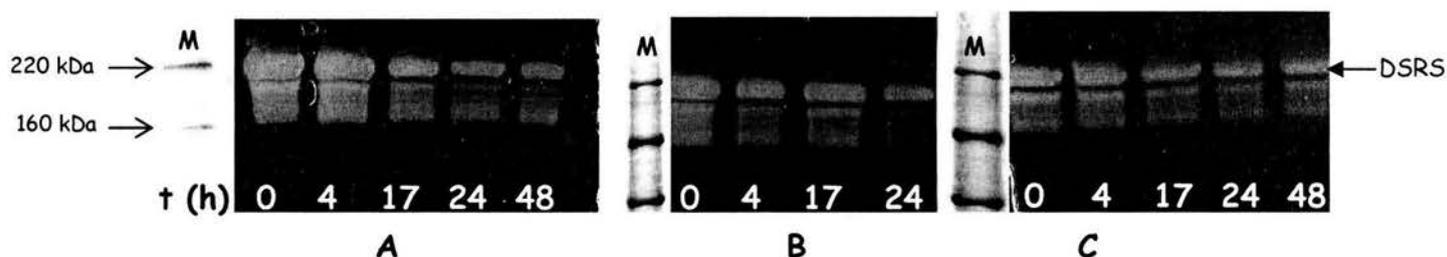


Fig 4.11. "Geles de actividad" SDS-PAGE 6% de la DSRS recombinante. M. Marcador A. DSRS recombinante incubada a pH 7, 40°C, B. DSRS recombinante incubada a pH 7, 40°C con proteasas de *L. mesenteroides* B512F. C. DSRS recombinante incubada a pH 7 40°C con proteasas de *L. mesenteroides* B512F e inhibidor de proteasas.

En la figura 4.11 C, donde los extractos contienen inhibidor de proteasas, se observa un comportamiento bastante parecido al observado en las figuras 4.11 A y B; una disminución progresiva y uniforme de la actividad glicosiltransferasa. En la tabla 4.3 se muestra como la actividad disminuye de manera parecida en las tres condiciones, la determinación se realizó a través de análisis de imágenes por medio del software LabWorks de UVP BioImaging Systems.

Tabla 4.3. Actividad residual de la DSRS recombinante. A. DSRS recombinante incubada a pH 7, 40°C, B. DSRS recombinante incubada a pH 7, 40°C con proteasas de *L. mesenteroides* B512F. C. DSRS recombinante incubada a pH 7 40°C con proteasas de *L. mesenteroides* B512F e inhibidor de proteasas.

Tiempo transcurrido (h)	A (%)	B(%)	C(%)
0	100	100	100
4	90	86	89
17	71	70	68
24	58	47	53
48	51	Nd	45

Nd: no determinado

Evidentemente, el proceso proteolítico de la DSRS recombinante no es el mismo que se realiza en la DSRS nativa de *L. mesenteroides* NRRL B512F. Tal vez, éste no se efectúa debido a la presencia de la tiorredoxina unida a la DSRS en el N-terminal. En el modelo propuesto por Argüello-Morales y col. (en preparación), la proteasa inicia la degradación de la DSRS por el N-terminal; por lo que si este extremo no se encontrara expuesto sería difícil iniciar el proceso. No podemos asegurar que si al eliminar la tiorredoxina el proceso de degradación se efectuaría de manera similar a la DSRS nativa.

4.6.2. Utilización de diversas cepas de *E. coli*

El plásmido pDXCP fue transformado inicialmente en *E. coli* DH5 α . Pensamos que probablemente las tres formas activas que observábamos en los geles de SDS-PAGE se debían a la acción de proteasas presentes en los extractos celulares de *E. coli* y que una forma de contender con este fenómeno era la utilización de cepas que no expresaran

eficientemente sus proteasas. Por esta razón se utilizó *E. coli* BL21 (DE3) (Stratagene), pues esta cepa tiene deletada las proteasas OmpT y Lon. La OmpT es una proteína de 34 kDa asociada a la membrana celular, originalmente clasificada como una serin-proteasa, pero ahora como una aspartil-proteasa. Está regulada positivamente por estrés térmico y es una de las proteasas a las que se le atribuye principalmente la degradación de proteínas recombinantes. (Gill y col., 2000, Groedberg y col., 1988, Sugimura y Nishihara 1988).

Otra cepa utilizada para la expresión de la DSRS fue *E. coli* TOP10, esta es recomendada por el proveedor del kit pBAD/TOPO.

En las tres cepas empleadas (DH5 α , BL21 (DE3) y TOP10) se expresó eficientemente la DSRS; al preparar "geles de actividad" SDS-PAGE se observó el mismo patrón de degradación, indicándonos, que el procesamiento es independiente del fondo genético (fig 4.12). Lo observado es congruente con lo reportado por diversos autores que han expresado heterológamente fructosil y glucosiltrasferasas (Ferretti y col., 1987, Fukushima y col., 1992, Fujiwara y col., 1992, Monchois y col., 1997, Monchois y col., 1998, Bozonnet y col., 2002). Sin embargo, en ninguno de los estudios ha quedado establecida la causa del fenómeno.

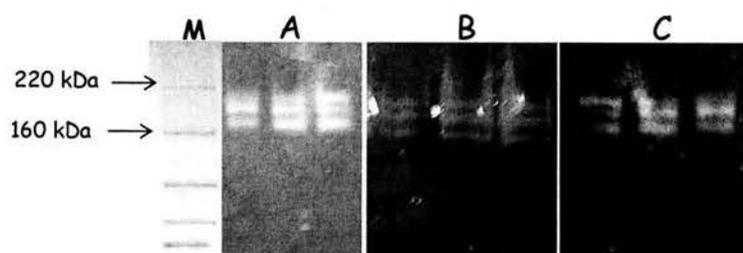


Fig. 4.12 Gel de actividad, DSRS expresada en diferentes cepas de *E. coli*. M. Marcador de peso molecular A. BL21, B. DH5 α , C. TOP10

Kaufmann y col. en 1994 identificaron una proteasa muy parecida a la OmpT, que fue llamada OmpP. Ésta es 87% idéntica a OmpT y posee la misma actividad enzimática. Por lo que tal vez la única ventaja que podría tener la cepa *E. coli* BL21 sobre otras cepas de *E. coli* se pierde. Ésta es una explicación por la que en *E. coli* BL21 también ocurre la degradación de la DSRS.

Realizamos modificaciones ligeras en la producción de la DSRS recombinante con el fin de averiguar desde qué momento estaba ocurriendo la proteólisis y si de alguna manera podríamos evitarla o inducirla.

Modificamos el periodo de inducción, suministrando por pulsos el inductor. Otro aspecto evaluado fue la extracción enzimática, en la que después de romper las células, el extracto total se incubó por un par de horas a temperatura ambiente. En ambos casos el patrón de degradación no cambió. Se continuaron observando las tres bandas activas, sin modificación aparente. Finalmente utilizamos inhibidor de proteasas durante la síntesis de la DSRS, en el medio de cultivo. Cultivamos las células e indujimos con arabinosa al 0.2% (P/V) de la manera descrita en Materiales y Métodos, pero adicionamos 1 tableta del coctel de inhibidor de proteasas COMPLETE (Roche) por cada 50 ml de medio de cultivo al momento de la inducción y recuperamos las células 4 h después. Lisamos las células como se describe en la sección 3.4.7 y analizamos las muestras por "geles de actividad" SDS-PAGE 6% (fig. 4.13). Sorprendentemente, la forma enzimática de menor tamaño no aparecía. Este resultado nos llevó a pensar que la proteólisis de la DSRS recombinante se podría efectuar por la acción de proteasas de *E. coli*, que se inhibían al suministrar inhibidores de proteasas, impidiendo así la proteólisis de la DSRS. En la figura 4.13, observamos en el carril A una mayor actividad de la segunda banda, con respecto a su similar del carril B, lo que sugiere un proceso complejo de proteólisis, ya que el inhibidor de proteasas no impide que casi toda la forma original se procese (Fig 4.13, carril A).

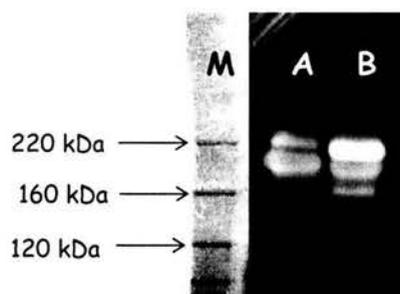


Fig. 4.13. DSRS heteróloga a la que se suministró inhibidor de proteasas en el cultivo. M. Marcador de peso molecular. A. DSRS con inhibidor de proteasas. B. DSRS sin inhibidor de proteasas

4.6.3. Caracterización parcial de las formas proteolizadas

4.6.3.1. Determinación del peso molecular de las formas proteolizadas

Los sobrenadantes de las células de *E. coli* BL21 (DE3) previamente lisadas en la prensa de French, fueron utilizadas para hacer un gel SDS-PAGE desnaturalizante al 6%. El gel fue tratado para observar proteínas portadoras de actividad glicosiltransferasa. En la figura 4.14 se observan 3 proteínas activas al tiempo inicial y después de 4 meses de almacenamiento a 4°C y pH 5.2. Es claro que al término de la incubación, la concentración de las formas proteolizadas disminuyó, pero no dió lugar a otras formas activas (en estas condiciones). Contrario a lo que ocurre con la DSRS nativa, que da origen a enzimas de menor peso molecular con actividad glicosiltransferasa.

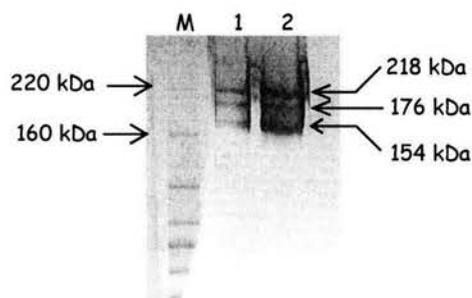


Fig. 4.14. Gel de actividad de la DSRS recombinante. 1. Extracto enzimático expresado en *E. coli* DH5 α , almacenado durante 4 meses a 4°C. 2. DSRS sobreexpresada en *E. coli* DH5 α , tiempo inicial. M. Marcador de peso molecular

Los tamaños calculados a partir del gel son: 218, 176 y 154 kDa. La forma 1 es de aproximadamente 218 kDa, la forma 2 presenta un peso molecular de 176 kDa (el peso molecular nos sugiere que solo debe ser la DSRS libre de tiorredoxina, si el corte se realizara desde el N-terminal). A diferencia de la forma 1, la forma proteolizada de 176 kDa en los gels SDS-PAGE teñidos con azul de coomassie presenta menor concentración, lo que va de acuerdo con la actividad observada. La forma de menor tamaño que tiene actividad glicosiltransferasa es de 154 kDa, aproximadamente perdió un segmento de 323 aa. De acuerdo a la secuencia de la

DSRS reportada, este segmento correspondería al péptido señal y parte de la región variable (fig. 4.15) (Wilke-Douglas, 1989). Así, la proteína de 156 kDa podría corresponder a la forma de 155 kDa reportada por varios autores.

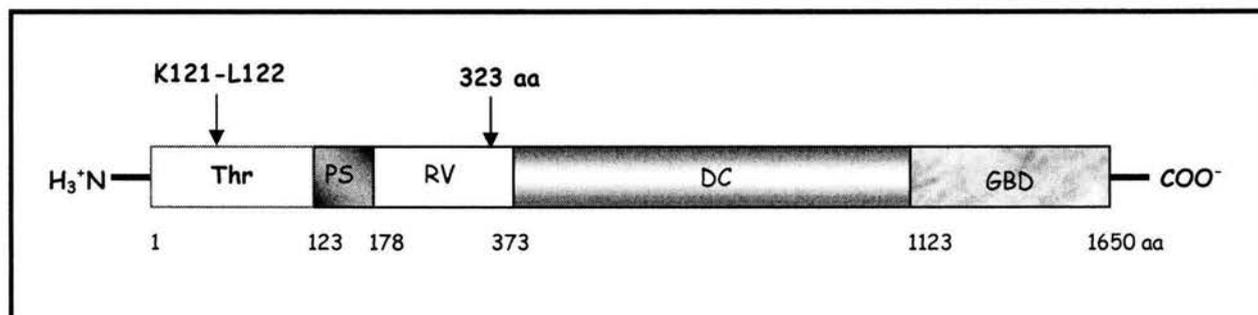


Fig. 4.15. Esquema de la estructura primaria de DSRs recombinante. Thr: Tiorredoxina, PS: Péptido señal, RV: Región variable, DC: Dominio catalítico, GBD: Dominio de unión a Glucano. La flecha indica el sitio probable de corte para obtener la forma enzimática de 154 kDa

La tiorredoxina muestra regiones hidrofóbicas, y una de ellas comprende desde el N-terminal hasta el residuo G35. Si esta región funciona como péptido líder, podría ser reconocida por *E. coli* y utilizarse para la translocación de proteínas recombinantes al espacio periplásmico. *E. coli* utiliza una colección de transportadores, donde los más conocidos son los Sec, que catalizan la translocación de varios polipéptidos a través de la membrana interna. Durante el proceso, el péptido señal es escindido, lo que parece ocurrir siempre posterior a la translocación membranar (Danese y Silhavy, 1998). Por lo que probablemente la forma de 176 kDa sea producto de este procesamiento.

Por otro lado se ha visto que la OmpT, al igual que la OmpP, se localiza inmersa en la membrana externa, y que rompe enlaces entre aminoácidos básicos (Sugimura y Nishihara, 1998). Reconoce a la Lys o Arg, seguidos de cualquier aminoácido excepto Asp, Glu y Pro. En varios sistemas se ha utilizado la OmpT para liberar las proteínas recombinantes de las fusionadas. Se sabe que su nivel de expresión se incrementa en respuesta a la sobreexpresión de proteínas recombinantes (Gill y col., 2000). De esta manera podríamos decir que la banda de 176 kDa pudo originarse de la ruptura de la

tiorredoxina luego que fue translocada, tal vez por una OmpT, ya que curiosamente la tiorredoxina tiene un sitio de reconocimiento cercano al inicio de la DSRS (K121↓L122, fig. 4.15).

Los niveles de actividad se estimaron a partir del gel por medio de análisis de imágenes. Así, la proteína de 218 kDa es 3 veces más activa que la de 176 kDa y 6 veces más que la de 154 kDa, desde el momento de la ruptura celular.

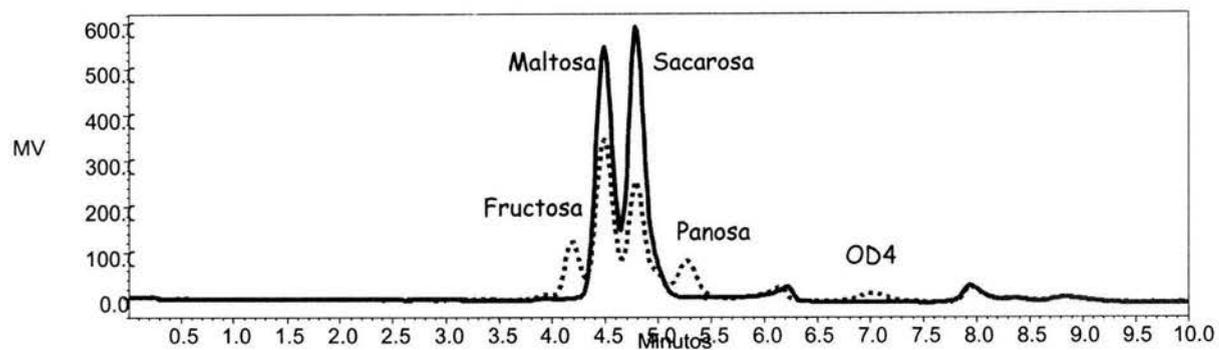
4.6.3.2. Síntesis de oligosacáridos

Las formas proteolizadas de 218, 176 y 154 kDa obtenidas de la DSRS heteróloga fueron caracterizadas parcialmente en función de su capacidad para sintetizar oligosacáridos por "reacción de aceptor".

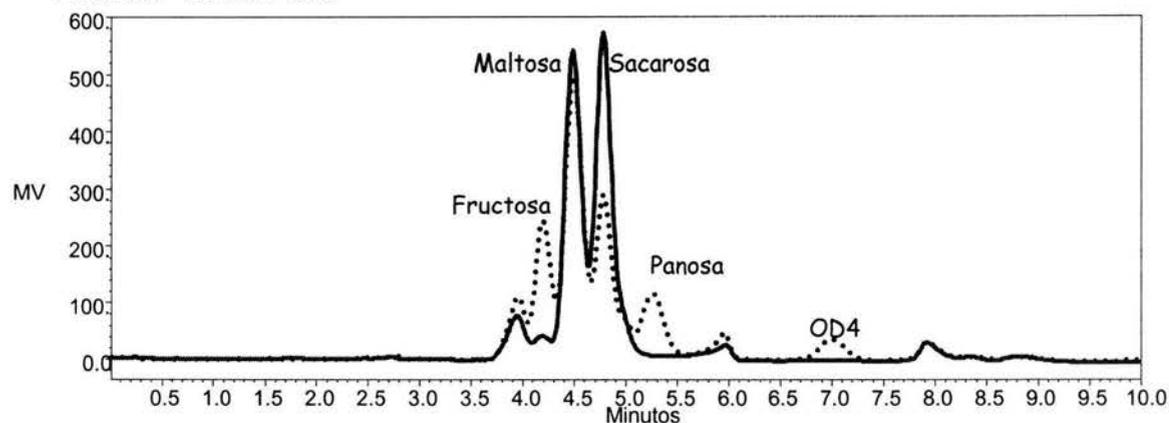
Las reacciones de aceptor se llevaron a cabo durante 24 h en presencia de maltosa y sacarosa. Las formas de 218, 176 y 154 kDa fueron aisladas de un gel de SDS-PAGE 6% y puestas en contacto con la mezcla de azúcares. Utilizamos como control la DSRS nativa de *L. mesenteroides* NRRL B512F. Los productos de la reacción fueron separados y cuantificados por Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC, por sus siglas en inglés). En la figura 4.16 se muestran los productos obtenidos de las tres formas enzimáticas. En los tres casos fueron sintetizados dos productos identificados por comparación con los oligosacáridos producidos por la DSRS nativa: panosa (*O*- α -glucopiranosil-(1-6)-*O*- α -D-glucopiranosil-(1-4)-D-glucosa) y OD4 (6- α -D-isomaltosil maltosa). Es importante señalar que la velocidad de consumo de sustratos no fue la misma en todas las reacciones. Durante este periodo, las formas enzimáticas de 218 y 176 kDa consumieron cerca del 50% de sacarosa, mientras que la proteína de 154 kDa consumió el 85% de la sacarosa alimentada. En el caso de la maltosa, la proteína de 176 kDa consumió únicamente el 5%, mientras que las otras proteínas consumieron cerca del 30%.

Suponemos que la dextrana producida por cada una de las formas proteolizadas es similar en estructura al polímero producido por la enzima nativa. Actualmente el análisis de la dextrana está en proceso.

Proteína de 218 kDa



Proteína de 176 kDa



Proteína de 156 kDa

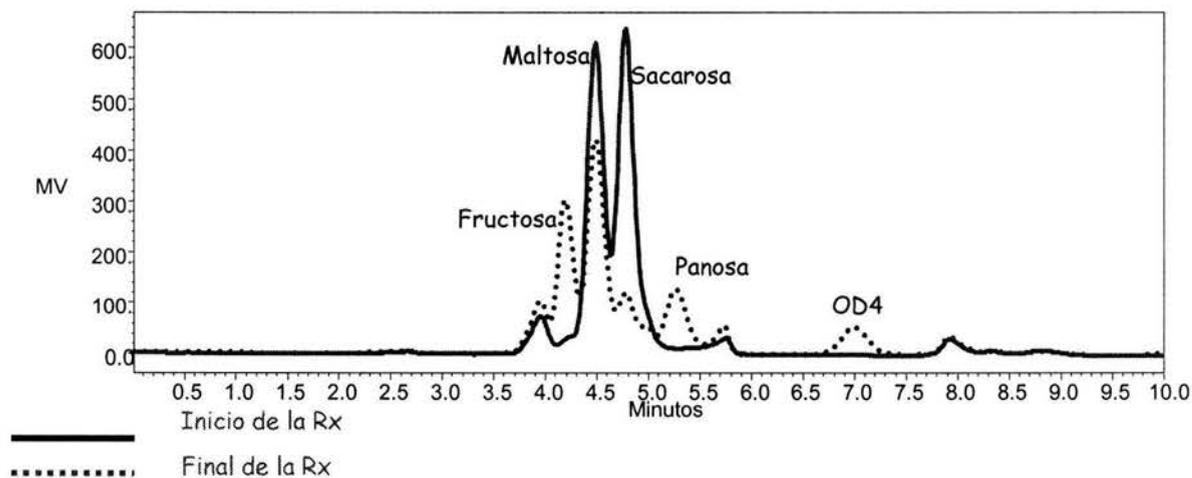


Fig. 4.16. Análisis de los productos de reacción sintetizados por las formas enzimáticas obtenidas por proteólisis de la DSRs recombinante. Panosa: O - α -glucopiranosil-(1-6)- O - α -D-glucopiranosil-(1-4)-D-glucosa, OD4: 6- α -D-isomaltosil maltosa.

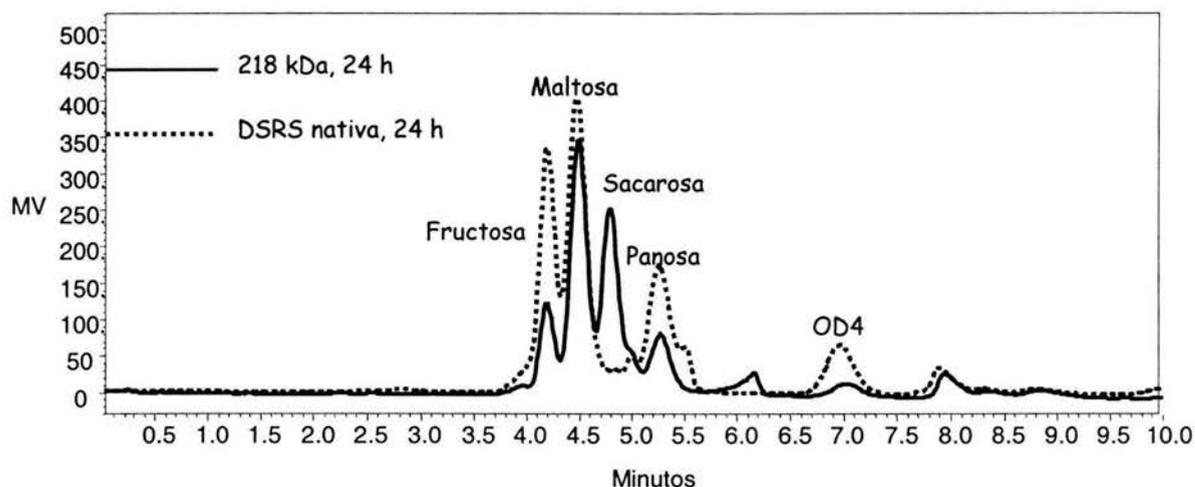


Fig. 4.17. Comparación de los productos de reacción de la proteína de 218 kDa y la DSRS nativa

De estos resultados se puede concluir que la DSRS heteróloga no sufre una degradación igual a la que se presenta en la DSRS nativa. La recombinante presenta tres formas activas desde el momento de la ruptura celular, las que con el paso del tiempo van perdiendo actividad, no importando si en los extractos hay inhibidor de proteasas y/o proteasas exógenas. Cuando se almacena a 4°C y pH 5.2 no da origen a formas activas de menor peso molecular, solo se observa una disminución en la concentración de las formas proteolizadas.

Con respecto al tamaño de las formas encontradas, podemos afirmar que si el corte se efectúa desde el N-terminal, la enzima de 176 kDa se origina a partir de la pérdida de la tiorredoxina por alguna peptidasa localizada en el periplasma, si la proteólisis continua del mismo extremo la forma de 154 kDa podría haber perdido hasta la región variable. La degradación de la DSRS recombinante fue independiente del fondo genético, pues la utilización de diversas cepas de *E. coli* DH5 α , TOP 10 y BL21 no evitó su degradación, ni *E. coli* BL21(DE3) que tiene deletadas las proteasas OmpT y lon, aunque el corte que da origen a la forma de 154 kDa se realiza por una serin, cisteín o metalo proteasa, ya que su formación se inhibe cuando se suministra inhibidores de proteasas COMPLETE (Roche) al cultivo.

Las tres formas generadas quedan dentro de la célula, puesto que las detectamos al lisar las células y, generan los mismos productos de reacción que la DSRS nativa, en presencia de sacarosa y maltosa, la única diferencia observada entre ellas radica en la forma en que consumen los sustratos.

Conclusiones

5. Conclusiones generales

En vista de que *L. mesenteroides* NRRL B512F produce proteasas, la DSRS se sometió a proteólisis limitada a pH 5.2 y 4°C. Se encontró una banda de 162 kDa como el producto más abundante.

Cuando se somete a los extractos enzimáticos de *L. mesenteroides* NRRL B512F a un cambio de pH, la DSRS se degrada totalmente en 6 h, indicándonos que la actividad de las proteasas se incrementa a pH 7.

La adición de proteasas endógenas a los extractos enzimáticos de *L. mesenteroides* NRRL B512F y B512FMC no aumentaron la velocidad de proteólisis, aunque la actividad proteolítica sea mayor a la registrada por extractos producidos con extracto de levadura y sacarosa. En *L. oenos* se ha encontrado que algunos genes de proteasas sufren represión catabólica por glucosa (Rollán y col., 1998), lo que nos sugiere que la proteasa responsable de la degradación de la DSRS podría estar reprimida.

En el caso de la LVs observadas en extractos de *L. mesenteroides* NRRL B512F, esta también muestra degradación, pero a diferencia de la DSRS no se proteoliza totalmente a pH 7 y 30°C, porque la proteasa responsable de su degradación solo es activa a pH ácidos. Múltiples reportes han mostrado que las LABs contienen un sistema proteolítico complejo. Las evidencias experimentales y la localización de diversas proteasas en el genoma de *L. mesenteroides* spp. *mesenteroides* ATCC 8293, nos sugiere la presencia de más de una proteasa involucrada en la degradación de GTFs y FTFs desde tal vez el extremo N-terminal (Kawano y col., 2001).

Por lo que respecta a la DSRS recombinante, ésta sufre un proceso degradativo diferente a la enzima nativa, probablemente causado por el hospedero. Al estar fusionada con la tiorredoxina, puede ser translocada hacia el periplasma, posterior a su translocación la tiorredoxina podría ser escindida por alguna peptidasa.

Las formas enzimáticas proteolizadas, generan los mismos productos de reacción que la DSRS nativa en presencia de sacarosa y maltosa, la única diferencia observada es en la forma en que consumen los sustratos.

6. Perspectivas

- Secuenciar el N-terminal de las formas proteolizadas de la DSRS recombinante.
- Analizar el sistema proteolítico de *L. mesenteroides* NRRL B512F, identificando las enzimas que participan en la degradación de la DSRS.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Bibliografía

Bibliografía

1. **Abo H.**, Matsumura T., Kodama T., Ohta K., Fukuki K., Kato K. y Kagawa H. **1991**. Peptide sequences for sucrose splitting and glucan bindings within *Streptococcus sobrinus* glucosyltransferase (water-insoluble glucan synthetase). *J. Bacteriol.* 175: 989-996.
2. **Aoki H.**, Matsumura T., Kodama T., Ohta K., Fukuki K., Kato K. y Kagawa H. **1986**. Cloning of *Streptococcus mutans* glucosyltransferase gene coding for insoluble glucan synthesis. *Infect. Immun.*, 53:587-594.
3. **Argüello-Morales M.**, Remaud-Simeon M., Pizzut S., Sarçabal P., Willemot R. y Monsan P. **2000**. Sequence analysis of the gene encoding alternansucrase, a sucrose glucosyltransferase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL-B1355. *FEMS Letters.* 182:81-55.
4. **Argüello-Morales M.** **2000**. L'altenane-saccharase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355: structure primaire et synthese d'oligosides. Tesis doctoral. INSA- Toulouse, Francia.
5. **Argüello-Morales M.** **2002**. Comunicación personal.
6. **Argüello-Morales M.**, Sánchez-González M. Canedo M., Quirasco M., Farrés A. y López-Mungia, A. Endogenous proteolytic modification of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC dextransucrase. En preparación.
7. **Banas J.**, Simon D., Williams L., Ferretti J. y Rusell R. **1994**. Analysis of primer-independent GTF-I from *Streptococcus salivarius*. *FEMS Microbiol. Lett.* 123:349-354.
8. **Binder T.**, Côté G. y Robyt J., **1983**. Disproportionation reactions catalyzed by *Leuconostoc* and *Streptococcus* glucansucrases. *Carbohydr. Res.*, 124:275-286.
9. **Bolotin A.**, Wincker P., Mauger S., Jaillon O., Malarne K., Weissenbach J., Ehrlich y Sorokin A., **2001**. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* spp. *lactis* IL1403. *Gen Res.* 11:731-753.
10. **Bozonnet S.**, Dols-Laffargue M., Fabre E., Pizzut S., Remaud-Simeon M., Monsan P. y Willemot R. **2002**. Molecular characterization of DSR-E an α -1,2 linkage-synthesizing dextransucrase with two catalytic domains. *J. Bacteriol.* 184:5753-5761.
11. **Bradford M.** **1976**. A rapid y sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochim.* 72:248-254.
12. **Côté G.** y Robyt J., **1982**. Isolation and partial characterization of an extracellular glucansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B1355 that synthesizes an alternating (1-6), (1-3)- α -D-Glucan. *Carbohydr. Res.*, 101:57-54.
13. **Côté G.** y Robyt J., **1984**. The formation α -D-(1-3) branch linkage by D-glucansucrase from *Streptococcus mutans* 6715 producing a soluble D-glucan. *Carbohydr. Res.* 127:95-107.
14. **Danese P.N.** y Silhavy T.J. **1998**. CpxP, a stress-combative member of th Cpx regulon. *J. Bacteriol.* 180:831-39
15. **Devulapavelle K.**, Goodman S., Gao Q., Hemsley A. Mooser G. **1997**. Knowledge-based model of a glucosyltransferase form oral bacterial group of mutans streptococci. *Protein Sci.*, 6:2489-2493.
16. **Fariás M.** y Manca de Nadra M. **2000**. Purification and partial characterization of *Oenococcus oeni* exoprotease. *FEMS Microbiol. Lett.* 185:263-266.
17. **Fernández J.** **2003**. Aislamiento y expresión del gene que codifica para la dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ. Tesis de maestría. IBT-UNAM, Morelos, México.
18. **Ferretti, J.**, Gilpin, M. and Rusell, R, **1987**. Nucleotide sequence of a glucosyltransferase gene from *Streptococcus sobrinus* Mfe28. *J. Bacteriol.* 169:4271-4278.

19. **Fu D.** y Robyt. **1990.** A facile purification of *Leuconostoc mesenteroides* B512FM dextransucrase. Prep. Biochem. 20:93-106.
20. **Fujiwara T.**, Kawabata S. y Hamada S. **1992.** Molecular characterization and expresion of the cell-associated glucosyltransferase gene from *Streptococcus mutans*. Bioch. Biophys. Res. Comuni.187:1432-1438
21. **Fukushima K.**, Ikeda T. y Kuramtmsu H. **1992.** Expresion of *Streptococcus mutans* *gtf* genes in *Streptococcus milleri*. Infect. Immun. 60:2815-2822
22. **Funane K.**, M., Yamahada M., Shiraiwa M., Takahara H., Yakamoto N., Ichishima E. y Kobayashi M. **1995.** Aggregated form of dextransucrases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F and its constitutive mutant. Biosci. Biotech. Biochem., 59:776-780.
23. **Funane K.**, Mizuno K., Takahara H., Kobayashi M. **2000.** Gene encoding a dextransucrase-like protein in *Leuconostoc mesenteroides* B512F. Biosci. Biotechnol. Biochem. 64(1): 29-38.
24. **Funane K.**, Ishii T., Matsushita M., Hori K., Mizuno K., Takahara H., Kitamura Y. y Kobayashi M. **2001.** Water soluble and water-insoluble glucans produced by *Escherichia coli* recombinant dextransucrases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F. Carbohydr. Res. 334: 19-25.
25. **Galloway C. A.**, Sowdwn M.P. y Smith H.T. **2003.** Increasing the yield of soluble recombinant protein expressed in *E. coli* by induction during late log phase. Biotechniques. 34:524-526
26. **Giffard P.**, Milward C., Simpson C. y Jacques N. **1991.** Molecular characterization of a cluster of at least two glucosyltrasferases genes in *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. J. Gen. Microbiol., 137:2577-2593.
27. **Giffard P.**, Allen M., Milward C., Simpson C. y Jacques N. **1993.** Sequence of the *gtfK* gene *Streptococcus salivarius* ATCC 25975 and evolution of the *gtf* genes of oral streptococci. J. Gen. Microbiol., 1511-1522.
28. **Gill R.T.**, Delisa M., Shiloach M., Holoman R.T y Bentley W.E. **2000.** OmpT expression and activity increase in response to recombinant chloramphenicol acetyltransferase overexpresion and heat shock in *E. coli*. J. Mol. Microbiol. 23:283-289.
29. **Gilmore K.**, Rusell R. y Ferretti J. **1990.** Analysis of the *Streptococcus downei* *gtfS* gene, which especifices glucosyltransferase that synthesizes soluble glucans. Infect. Immun., 58:2452-2458.
30. **Grahame, D.A.** y Mayer R.M. **1984.**The origin and composition of multiple forms of dextransucrase from *Streptococcus sanguis*. Biochim.Biophys. Acta.786, 42-48
31. **Grahame D.A.** y Mayer R.M. **1985.** Purification and comparasion of multiple forms of dextransucrase from *Streptococcus sanguis*. Carbohydr. Res. 142:285-298.
32. **Groedberg J.**, Lundrigan M.D., Toledo D.L., Mangel W.F. y Dunn J.J. **1988.** Complete nuclotide sequence and deduced aminoacid sequence od the *ompT* gene of *Escherichia coli* K-12. Nucleic. Acid. Res. 16:1209
33. **Groenwall A.** e Ingelman B. **1948.** Manufacture of infusion and injection fluide. US Patent 2437518.
34. **Goyal A.** y Katiyar S. 1997. Effect of certain nutrients on the production of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B512F. J. Basic. Microbiol. 37:197-204.
35. **Hanada N.** y Kuramitsu. **1988.** Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans* *gtfC* gene, coding for both soluble and insoluble glucan synthesis. Infect. Immun. 56:1999-2005
36. **Hanada N.** y Kuramitsu. **1989.** Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans* *gtfD* gene, coding for primer-dependent soluble glucan synthesis. Infect. Immun.57:2079-2085.
37. **Hanada N.**, Yamashita Y., Shibata Y., Sato S., Katayama T., Takehara T. y Inoue M. **1991.** Cloning of *Sytreptococcus sobrinus* *gtf* gene that encode a glucosyltransferase which produce a high-molecular-weight water-soluble glucan. Infect. Immun., 59:3434-3438.

38. **Ichishima E.** 1970. Acid proteinases methods in enzymology. Acad. Press. USA. 397-404
39. **Invitrogene.** Catálogo 2003
40. **Jeanes A.,** Haynes W., Williams C., Rankin J., Melvil E, Austin M., Cluskay J., Fisher B., Tsuchiya H. y Rist C. 1954. Characterization and clasification of dextrans from ninety six strains of bacteria. J. Am. Chem. Soc. , 76: 5041-5052.
41. **Jobin M.C.** y Grenier D. 2003. Identification and characterization of four proteases produced by *Streptococcus suis*. FEMS Microbiol. Lett. 220:113-119.
42. **Joucla G.,** Argüello-Morales M., Pizzut S., Willemot R., Monsan P. y Remaud-Simeon M. 2001. Sequence analysis of alternansucrase gene from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355 and expresion of entire and genetically truncated forms in *Escherichia coli*. 4th Carbohydrate Bioengineering Meeting. Poster. Estocolmo, Suecia.
43. **Kaufmann A.,** Stierhof Y y Henning U. 1994. New outer membrane-asociated protease of *E. coli* K-12. J. Bacteriol. 176:359-367
44. **Kawano Y.,** Kawagishi M., Nakano M., Mase K., Yamashino T., Hasegawa T. y Ohta M. 2001. Proteolytic cleavage of *Sthapyllococcus* exoproteins analyzed by two-dimensional gel electrophoresis. Microbiol. Immunol. 45:285-290.
45. **Kim D.** y Robyt J.F. 1994^a. Produccion and selection of mutants of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL-512F constitutive for glucansucrases. Enzyme microbial. Technol 16: 659-664
46. **Kim D.** y Robyt J.F. 1994^b. Properties of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL-512FMC constitutive dextransucrase. Enzyme Microb. Technol. 16: 1010-1015.
47. **Kim H.,** Kim D., Ryu H.J. y Robyt J.F. 2000. Cloning and sequencing of the α (1-6) dextransucrase gene from *Leuconostoc mensenteroides* B-742CB.J. Microbiol. Biotechnol.10 (4): 559-563.
48. **Kleerebezem M.,** Boekhorst J., van Kranenburg R., Molenaar D., Kipers O., Leer R., Tasrchini R., Peter., Sandbrink H., Fiers M., StiekemaV., Klein R., Bron P., Hoffer S., Nierpo M, Kerkhoven R., Vries M., Ursing., de Vos W. Y Siezen R. 2002. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. P. Natl. Acad. Sci. USA. 100:1990-1995.
49. **Kobayashi M.** y Matsuda K. 1978. Inhibition of dextran synthesis by glucoamylase and endodextranase. Carbohydr. Res. 66: 277-288.
50. **Kobayashi M.** y Matsuda K. 1980. Characterization of multiple forms and main component of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F. Biochim. Biphys. Acta . 614:46-62.
51. **Kobayashi M.** y Matsuda K. 1986. Electropohoretic analysis of multiple forms of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL-B512F. J. Biochem. 100:615-621.
52. **Koepsell, H.J.,** Tsuchiya, H.M., Hellman, N.N., Kasenko, A., Hoffman, C.A., Sharpe, E.S. y Jackson, R.W. 1952. Enzymatics synthesis of dextran acceptor specificity and chain initiation. J. Biol. Chem. 793-801.
53. **Konings W.N.,** Smid E.J., Laan H. y Driessen a. J. M. 1991. From casein to cheese: the role of *Lactococcus lactis*. Food Biotechnol. 5, 263-277
54. **Kralj S.,** van Greel-Schutten G. H., Rahaoui H., Leer R. J., Faber E. J., van der Maarel M. J. E. C. y Dijkhuizen L. 2002. Molecular characterization of a novel glucosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* strain 121 synthesizing a unique, highly branched glucan α -(1-4) and α -(1-6) glucosid bonds. Appl. Env. Microbiol. 68:4283-4291.
55. **Kunji E.,** Mierau I., Hagting A., Poolman B., y Konings W. 1996. The proteolytic systems of acid bacteria. Antoine van Leeuwenhock. 70:187-221.

56. **Laemli U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*. 227:2040-2042.
57. **López-Munguía A.**, Pelenc V., Remaud-Simeon M., Biton J., Michel J., Lang C. y Monsan P. 1993. Production and purification of alternansucrase, glucosyltransferase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B1355 for the synthesis of oligoalternans. *Enzyme. Microb. Technol.* 15:77-85.
58. **MacGregor, A.**, Jespersen, H. y Svenson, B., 1996. A circularly permuted α -amylase type α/β barrel structure in glucano synthesizing glucosyltransferases. *FEBS Lett.* 378:263-266.
59. **Mayer R.**, Matthews C., Futerman C., Parnaik y Jung S. 1981. Dextransucrase: acceptor substrate reactions. *Arch.Biochem. Biohys.*, 208:278-287.
60. **Mayer R.** 1987. Dextransucrase: a glucosyltransferase from *Streptococcus sanguis*. *Methods Enzymol.*, 138:649-661.
61. **Miller A. W.** y Robyt J. F. 1986^a. Activation and inhibition of dextransucrase by calcium. *Biochim. Biophys. Acta* 880:32-39.
62. **Miller A. W.** y Robyt J. F. 1986^b. Inhibition of dextransucrase by Zn^{+2} , Ni^{+2} , Co^{+2} , and Tris. *Arch. Biochem. Biophys.* 80:579-586.
63. **Monchois V.**, Willemot R., Remaud-Simeon M., Croux C. y Monsan P. 1996. Cloning and sequencing of a gene coding for a novel dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL-1299 synthesizing only $\alpha(1,6)$ and $\alpha(1,3)$ linkages. *Gene*, 182: 23-32.
64. **Monchois V.** 1997. Etude des relations structure/fonction de dextrane-saccharases de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F y NRRL B-1299. Tesis Doctoral. INSA-Toulouse, Francia.
65. **Monchois V.**, Remaud-Simeon M., Rusell R., Monsan P. y Willemot R. 1997. Characterization of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextransucrase (DSRS) and identification of amino acid residues playing a key role in enzyme activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48:465-472.
66. **Monchois V.**, Reverte A., Remaud-Simeon M., Monsan P. y Willemot R. 1998. Effect of cloning *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F dextransucrase carboxyl terminal deletions on dextran and oligosaccharide synthesis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64:1644-1649
67. **Monchois V.**, Argüello-Morales M., Rusell R., 1999. Isolation of an active catalytic core of *Streptococcus downei* Mfe28 GTF-I glucosyltransferase. *J. Bacteriol.*, 181:2290-2292.
68. **Montville T.**, Cooney C. y Sinsky A. 1978. *Streptococcus mutans* dextransucrase. *Adv. Appl. Microbiol.* 24:55-84.
69. **Mooser G.** 1992. *Glycosidases and glycosyltransferases*, in *The Enzymes*. Academic. Press Inc.
70. **Neubauer H.**, Bauché A. y Mollet B. 2003. Molecular characterization and expression analysis of dextransucrase DsrD of *Leuconostoc mesenteroides* Lcc4 in homologous and heterologous *Lactococcus lactis* cultures. *Microbiol.* 149:973-982.
71. **Olivares-Illana V.**, López-Munguía A. y Olvera C. 2003. Molecular characterization of inulosucrase from *Leuconostoc citreum*: a fructosyltransferase within a glucosyltransferase. *J. Bacteriol.* 185:3606-3612.
72. **Olvera Carranza C.** 2003. Comunicación personal.
73. **Pritchard G. G.** y Coolbear T. 1993. The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12:179-206.

74. **Potocki de Montalk G.**, Remaud-Simeon M., Willemot R., Planchot y Monsan P. **1999**. Sequence analysis of the gene encoding amylosucrase from *Neisseria polysaccharea* and characterization of the recombinant enzyme. *J. Bacteriol.*, 181:375-381.
75. **Quirasco Baruch M.** **2000**. Estudios de expresión de la dextransacarasa producida por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F. Tesis doctoral. Fac. de química. UNAM. D.F., México
76. **Robyt J.F.**, Kimble B. y Walseth T. **1974**. The mechanism of dextransucrase action: direction of chain growth during dextran biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.*, 165:634-640.
77. **Robyt J.F.** y Corrigan A. **1977**. The mechanism of dextransucrase action. *Arch. Biochem. Biophys.*, 183:729-731.
78. **Robyt J.F.** y T.F. Walseth. **1979**. Production, purification and properties of dextransucrase from *L. mesenteroides* B512F. *Carbohydr. Res.*, 68:95-111
79. **Robyt J.F.** y Martin P. **1983**. Mechanism of synthesis of D-glucans by D-glucosyltransferase from *Streptococcus mutans* 6715. *Carbohydr. Res.* 113:301-315.
80. **Robyt J.F.** **1986**. Dextran. En: *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*. Vol. 4, 2ª. Ed., pp. 752-767. Eds. Mak F., Bikales M., Overgerger G. Y Menyes G. Wiley y sons, Inc. N. York. E.U.A.
81. **Rollan G.M.**, Fariás M.E., Strasser de Saad A.M y Manca de Nadra M.C. **1998**. Exoprotease activity of *Leuconostoc oenos* in stress conditions. *J. Appl. Microbiol.* 88:219-223.
82. **Rusell R.**, Gilpin M., Musaka H. y Dougan G. **1987**. Characterization of glucosyltransferase expressed from a *Streptococcus sobrinus* gene cloned in *E. coli*. *J. Gen. Microbiol.*, 133:935-944.
83. **Sánchez-González M.**, Alagón A., Rodríguez-Sotrés R., López-Munguía A., **1999**. Proteolytic processing of dextransucrase of *Leuconostoc mesenteroides*. *Microb. Lett.* 181:25-30.
84. **Sánchez González M.** **2000**. Origen y propiedades de las diversas formas observadas de la dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* B 512FMC. Tesis doctoral. IBT UNAM. Morelos, Mex.
85. **Sato S.**, Masaku I., Hanada N., Aizaawa Y. y Isobe Y. **1993**. DNA sequence of the glucosyltransferase gene of serotype d of *Streptococcus sobrinus*. *DNA Seq.*, 4:19-27.
86. **Sidebotham R.** **1974**. Dextrans. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 30:371-444
87. **Simpson C.**, Cheetman N., Giffard P y Jacques N. **1995**. Four glucosyltransferase, GTF-J, GTF-K, GTF-L and GTF-M from *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. *Microbiology*, 141:1451-1460.
88. **Smith M. R.** y Zahunley J. C. **1997**. *Leuconostoc mesenteroides* B1355 mutant producing alternansucrases exhibiting decreases in aparent molecular mass. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:581-586.
89. **Soetaert D.**, Schwengers W., Bucholz K. Y Vandamme E. **1995**. A wide range of carbohydrate modifications by simple micro-organism: *Leuconostoc mesenteroides*, in *Carbohydrate Engineering*. Elsevier Science, B.V.
90. **Stratagene**. Catálogo 2001-2002
91. **Sugimura K.** y Higashi N. **1988**. A novel outer-membrabe-associated protease in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170:3650-3654.
92. **Sumner J.** y Howell S. **1935**. A method for determination of saccharase activity. *J. Biol. Chem.* 108:51-54.
93. **Tjwan Tan P. S.** , Pollman B., Konings W., **1993**. Proteolytic enzymes of *Lactobacillus lactis*. *J. Dairy Res.* 60:269-286.
94. **Tsuchiya H. M.**, Koepsell h. J. Corman J., Bryant G., Bogard M.O., Feger V.H. y Jackson R. W. **1952**. The effect of certain cultural factors on the production of dextransucrases by *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Bacteriol.* 64: 521-527

95. **Vickerman M.**, Sulavik M., Nowak J., Gardber N., Jones C. y Clewell D. **1997**. Nucleotide sequence analysis of the *Streptococcus gordonii* glucosyltransferase gene *gtfG*. DNA Seq. 7:83-95
96. **von Eichel-Streiber C.**, Saueborn M. y Kuramitsu H. **1992**. Evidence for a modular structure of the homologous repetitive C-terminal carbohydrate-binding site of *Clostridium difficile* toxins and *Streptococcus mutans* glucosyltransferase. J. Bacteriol., 174:6707-6710.
97. **von Heije G.** **1990**. The signal peptide. J. Membrane Biol. 115:195-201
98. **Willemot R.M.**, Monsan P. y Durand G. **1988**. Effects of dextran on the activity and stability of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides*. Ann. N. Y. Acad Sci. 8:169-172
99. **Wilke-Douglas, M.**, Perchorowicz, J.T., Houck y Thomas, B.R. **1989**. Methods and compositions of altering physical characteristic of fruit products. US patente WO 89/12386.

Páginas de la red.

1. www.genome.ornl.gov, consultada el 8 de marzo de 2004
2. www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST consultada por última vez 4 de marzo de 2003
3. www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html consultada por última vez 8 de marzo de 2004
4. www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html consultada por última vez 14 de abril de 2004