



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



FACULTAD DE QUÍMICA

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

DETERMINACIÓN DEL INICIO DE LA TRANSCRIPCIÓN EN LAS GLICOSILTRANSFERASAS DE *Leuconostoc mesenteroides*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:

ABRAHAM ITZCOATL ACATZI SILVA

Tutor: DRA. MARICARMEN QUIRASCO BARUCH



MÉXICO, D.F.

JUNIO 2012

Reconocimientos

Esta Tesis de Maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Maricarmen Quirasco Baruch en el laboratorio L-312 del Conjunto E, en el Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutoral que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Agustín López-Munguía Canales Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra Facultad de Química, UNAM

Dra. Maricarmen Quirasco Baruch Facultad de Química, UNAM

Durante los estudios de Maestría goce de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente Tesis.

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente Dr. Agustín López-Munguía Canales Instituto de Biotecnología, UNAM

Vocal Dr. Juan Enrique Morett Sánchez Instituto de Biotecnología, UNAM

Secretario Dr. Guillermo Gosset Lagarda Instituto de Biotecnología, UNAM

Suplente Dra. Carmen Gómez Eichelmann Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Suplente Dra. Carmen Gómez Eichelmann Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Índice

	Pág.
1. Resumen	4
2. Introducción	6
3. Antecedentes	8
3.1 <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	8
3.2 Glicosiltransferasas	9
3.2.1 Glucosiltransferasas	9
3.2.1.1 Clasificación de las glucosiltransferasas	10
3.2.1.2 Dextransacararas	11
3.2.2 Fructosiltransferasas	13
3.2.2.1 Levansacarasa	13
3.3 Inicio de la transcripción	15
3.4 Factores sigma (σ)	16
3.4.1 Características estructurales de la familia σ^{70}	18
3.5 Promotores	21
3.5.1 Secuencias consenso	22
3.6 Elemento UP	25
3.7 Promotores estudiados en <i>L. mesenteroides</i>	27
4. Objetivos	28
4.1 Objetivos particulares	28
5. Diagrama general de la investigación	29
6. Materiales y métodos	30
6.1 Microorganismos y medio de cultivo	30
6.2 Cinética de crecimiento	30
6.3 Actividad GT durante la fermentación	31
6.3.1 Concentración-purificación de la actividad extracelular	31
6.3.2 Medición de actividad GT por aparición de reductores	32
6.4 Extracción del RNA total	33
6.4.1 Cuantificación y evaluación de la calidad del RNA obtenido	34
6.5 Diseño de cebadores	35
6.6 Síntesis y amplificación de ADNc	37

Índice

	Pág.
6.7 Condiciones de PCR	38
7. Resultados y discusión	40
7.1 Cultivo de <i>L. mesenteroides</i>	40
7.2 Diseño de los cebadores para la síntesis de ADNc y la reacción de 5'RACE	42
7.3 Extracción y evaluación del ARN total	44
7.4 Determinación del inicio de la transcripción	46
7.4.1 Gene <i>asr</i>	46
7.4.2 Gene <i>dsr-P</i>	48
7.4.3 Gene <i>dsr-T</i>	51
7.4.4 Gene <i>dsr-C</i>	53
7.4.5 Gene <i>dsr-B</i>	56
7.4.6 Gene <i>lev-S</i>	57
7.4.7 Gene <i>dsr-E</i>	58
7.4.8 Gene <i>dsr-A</i>	60
8. Análisis general de la región promotora	62
8.1 Región -10	62
8.2 Región -35	63
8.3 Secuencias espaciadoras	65
8.4 Región río arriba de la caja -35	67
8.5 Región promotora	69
8.6 Análisis de la secuencia Shine-Dalgarno en genes de GT	71
9. Conclusiones	73
10. Perspectivas	74
11. Bibliografía	75
13. Anexo	79

1. Resumen

L*euconostoc mesenteroides* produce glicosiltransferasas (GT) que catalizan la formación de biopolímeros de uso biotecnológico, por lo que el interés científico se ha centrado en el estudio de la relación estructura función y características cinéticas de estas enzimas. Hasta ahora se han clonado y secuenciado más de una docena de genes de dextrantransferasas (DT) y dos genes de levansacarasas (LS) de varias cepas de *L. mesenteroides*. Sin embargo, es muy limitada la información generada a partir del análisis experimental, que permita explicar la regulación y expresión de estos genes. En dos de los estudios realizados sobre este último aspecto, se determinó el inicio de la transcripción y ubicación de la posible región promotora de los genes *dsr-S* y *dsr-D*, en *L. mesenteroides* B-512F y L-cc4, respectivamente (Quirasco *et al.* 1999 y Neubauer *et al.* 2003), donde se observó que la región -10 era canónica y la región -35 estaba alejada del consenso pero conservada en los genes de GT. De estos resultados se especuló que la región promotora de GT era particular del género *Leuconostoc* y/o que podría ser reconocida por un factor sigma alternativo.

Para aportar más información al respecto, el primer paso para descifrar el mecanismo de inicio de la transcripción en estos genes y por lo tanto comenzar a explicar con bases moleculares la expresión de estas enzimas dentro del género *Leuconostoc*, en este trabajo se logró determinar experimentalmente el inicio de la transcripción de seis genes de GT, para de esta manera establecer y analizar la región promotora en cada uno de ellos.

Los resultados del análisis de los promotores de las GT estudiadas, demostraron que la región -10 es conservada y canónica, por lo que es una señal de reconocimiento fuerte para el factor σ^{70} primario. Se observó, a una base río arriba de la caja -10 un motivo GGn, que puede ser considerado como elemento -10 extendido, ya que, únicamente en estas posiciones del total de la región promotora, fue donde se encontró una alta frecuencia de aparición del nucleótido guanina. La región -35 es menos conservada y presenta una alta frecuencia de aparición del nucleótido Timina. Río arriba de la caja -35 establecida, se encontró una zona rica en A+T característica del elemento UP reconocido por la subunidad α de la RNAPol. Por lo anterior se llegó a la conclusión de que la región promotora de estos genes posee señales fuertes de reconocimiento para que la RNAPol comience la transcripción. Así, por primera vez, se podría comenzar a explicar con bases moleculares firmes y con analogía a lo estudiado en otras bacterias, el mecanismo por el

cual existe una alta expresión de estas enzimas en *Leuconostoc mesenteroides*. Sin embargo, aún falta atribuir una función precisa tanto a las bases localizadas en la región -35, como a las secuencias espaciadoras. Considerando los antecedentes existentes sobre la inducción de las DS y la función de las bases circundantes a la región -35, se abriría la posibilidad de que pueda intervenir alguna proteína que active la transcripción en estos genes.

Por otro lado y como resultados paralelos al estudio central, se encontró que el gene *dsr-T* se transcribe, ya que hasta el momento no se contaba con ninguna evidencia sólida de la existencia de dicho mensajero. Sin embargo se propone que, aunque se transcribe no se traduce, ya que la secuencia consenso de unión a ribosoma establecida en estos genes, se encuentra muy cercana al codón de síntesis de la primera metionina, por lo cual el inicio de la traducción puede ser ineficiente o nulo. Además se sugiere que su transcripción es baja, debido a que este gene posee la región promotora del -10 más alejada del consenso observado en los genes de GT de *L. mesenteroides*. Se encontró también que de los genes *dsr-C* (cepa B-1355) y *dsr-B* (cepa B-1299) tienen un 99.9% de identidad. Finalmente se demostró que el gene *dsr-C* se transcribe, contrario a lo reportado, pero no se traduce por poseer una delección justo después del segundo codón del ORF, lo cual ocasiona que se introduzca un codón de señal de paro de la traducción; lo anterior ocasionaría que el marco de lectura abierto reportado no sea el correcto, y así se explicaría por qué no se ha encontrado la proteína correspondiente a este gene.

2. Introducción

El género *Leuconostoc* pertenece al grupo de las bacterias ácido lácticas (BAL), las cuales juegan un papel muy importante en la preservación de alimentos, vía la producción de ácido láctico por fermentación de carbohidratos, así como en las propiedades finales de textura y sabor final de los mismos. *Leuconostoc* se puede encontrar principalmente en los productos lácteos y vegetales. Además de su efecto de bioconservación, en BAL como *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Lactobacillus* se encuentra la producción de exopolisacáridos, los cuales dependiendo de su composición y mecanismo de biosíntesis pueden clasificarse en: 1) heteropolisacáridos, cuando la cadena de carbohidratos esta formada por diversos tipos de azúcares, y 2) homopolisacáridos, cuando existe sólo un tipo de azúcar en su cadena y son formados únicamente a partir de la sacarosa, ambos sintetizados por la acción de enzimas del tipo Glicosiltransferasas (GT). Del tal manera que los polisacáridos podrían ser glucanos, sintetizados por GT o fructanos, producidos por fructosiltransferasas (FT). Parámetros como la masa molecular, el tipo de enlace glicosídico, la solubilidad y el grado de ramificación determinan las propiedades funcionales y por tanto las aplicaciones biotecnológicas de este tipo de biopolímeros. Los homopolisacáridos más estudiados son los producidos por los géneros de *Streptococcus*, asociados a los problemas de caries dental y de *Leuconostoc*, por uso industrial y aplicación en el área de la medicina, bioquímica y de los alimentos. De estos últimos, y con la finalidad de desarrollar nuevas aplicaciones biotecnológicas mediante el incremento en la diversidad de los glicanos producidos, en la última década se buscaron nuevos genes que codificaran para la síntesis de glucosiltransferasas en un mayor número de cepas de *Leuconostoc*, de tal manera que hasta el momento se tienen reportes de más de una docena de genes identificados para la expresión de estas enzimas (van Hijum *et al.* 2006). Como consecuencia, las líneas de investigación se han dividido en dos aspectos generales, el primero de ellos es el estudio bioquímico de la relación estructura-función de estas enzimas, y el segundo es la aplicación biotecnológica de los poli u oligosacáridos sintetizados a partir de estas enzimas. Por lo cual tanto la enzima como el polímero han concentrado el interés y la mayor parte de la investigación. Sin embargo, un aspecto básico poco estudiado de estas enzimas es el relativo a la información genética y fisiológica que involucra la expresión de dichas enzimas, en especial en el género *Leuconostoc*. A partir de 1989 cuando se aisló, secuenció y patentó el primer gene de dextranacarasa (*dsr-S*), la GT con mayor uso industrial (Wilke-Douglas *et al.*, 1989), la búsqueda de nuevos genes involucrados en la síntesis de enzimas productoras de homopolisacáridos ha

sido constante. Hasta el momento se han logrado identificar y clonar nueve genes que codifican para la expresión de GT en varias cepas de *Leuconostoc*, sin embargo en la mayoría de los casos se desconoce cuales son los mecanismos de regulación para la expresión de dichos genes en cada cepa.

Dentro del grupo de trabajo se realizó uno de los primeros estudios de regulación de GT en *L. mesenteroides* (Quirasco *et al.*, 1999), donde se reportó que la inducción de la dextransacarasa (DS) de la cepa B-512F, la cual es la GT con mayor uso industrial, no se produce únicamente en presencia de sacarosa como fuente de carbono, contrario a lo observado hasta ese momento, si no que también existe la inducción en presencia de glucosa y fructosa, pero en niveles mucho más bajos. Se determinó que en presencia de diferentes fuentes de carbono sólo se expresa un gene que codifica para DS, y finalmente se determinó que la región promotora de dicho gene posee una región -35 alejada del consenso en los procariotas y una región -10 canónica. Posteriormente en el Centro de Investigación de Nestlé se determinó que la región promotora del gen *dsr-D*, en la cepa Lcc4 (Neubauer *et al.*, 2003), es idéntica a la reportada para el gene *dsr-S*. Por lo cual se planteó la hipótesis de que la regulación en la expresión de los genes de DS en el género *Leuconostoc* podría estar localizada en la región promotora de estos genes, postulando que la región del -35 era característica de estas enzimas y/o que el inicio de la transcripción en estos genes podría estar mediado por un factor sigma alternativo a la familia σ^{70} . Con el propósito de contribuir con el estudio de la expresión de estas enzimas dentro del género *Leuconostoc* y así aportar mayor información acerca de la regulación en la expresión de DS, en el presente trabajo se reporta la identificación del inicio de la transcripción en varios genes de DS y su posible región promotora.

Por otro lado, la falta de estudios con base en el transcrito producido por genes de DS en *L. mesenteroides* ha generado incógnitas en cuanto a su transcripción y/o traducción. Específicamente no se ha demostrado fehacientemente el gene *dsr-T* de la cepa B-512F se transcriba (Funane *et al.* 2000) y tampoco se ha identificado a la proteína correspondiente. Por otro lado, con el gene *dsr-C*, existe la duda de que se exprese, debido a que en la secuencia reportada (Acceso al Genbank AJ250172) (Argüello-Morales, 2000^b) aparentemente no existe alguna región río arriba del gene estructural que se parezca a un promotor procarionte. Tampoco en este caso se logrado identificar a la proteína que correspondería a este gene.

3. Antecedentes

3.1 *Leuconostoc mesenteroides*

El género *Leuconostoc* se encuentra dentro del grupo de las bacterias ácido lácticas (BAL), junto con los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Carnobacterium*, *Weissella* y *Pediococcus* (Stiles and Holzapfel, 1997). Dichas bacterias se caracterizan por producir ácido láctico como producto mayoritario durante la fermentación de carbohidratos, por esta razón estos organismos se han utilizado desde la antigüedad como agentes para la preservación de alimentos, entre los que se encuentran, una gran variedad de productos lácteos, cárnicos y vegetales fermentados. Actualmente todas las bacterias pertenecientes a estos géneros tienen una condición GRAS (por sus siglas en inglés Generally Recognized as Safe) lo cual implica su libre uso en la producción de alimentos de consumo humano.

Los géneros *Lactococcus* y *Lactobacillus* concentran el mayor interés y la inversión en la investigación en el grupo de las BAL, esto es debido a su uso mundial en el área industrial de los productos lácteos, en específico con la producción de quesos y leches fermentadas, por tal motivo existe mucho menor información publicada acerca de los otros géneros de BAL.

De manera general, el género *Leuconostoc* comprende un grupo de bacterias aerobias y anaerobias facultativas, no móviles, cocos Gram-positivos de 1 a 2 μm de diámetro, no formadoras de esporas, catalasa y oxidasa negativas. Son lácticas heterofermentativas, esto es, que fermentan carbohidratos para producir ácido láctico y cantidades considerables de ácido acético, alcohol etílico, dióxido de carbono (CO_2) y de manera ocasional ácido fórmico como productos finales de su fermentación. Son bacterias quimioorganotróficas, por lo que requieren de aminoácidos y factores de crecimiento complejos para su crecimiento. Este género no crece a pHs menores de 4.5, su pH óptimo de crecimiento es cercano a la neutralidad, durante su cultivo la acidez aumenta por aumento de la concentración de ácidos orgánicos, alcanzando valores inferiores a pH 5. Estos microorganismos son de vida libre y su hábitat lo constituyen los vegetales y los suelos; su población se ve afectada por factores como la temperatura y humedad. Pueden ser aislados tanto de estos medios como de vegetales fermentados (Axelsson, 1993). Los microorganismos pertenecientes a este género son capaces de producir enzimas llamadas

dextranosa (DS), las cuales al crecer en sacarosa como sustrato, participan en la síntesis de un exopolisacárido derivado de la glucosa y de alto peso molecular denominado dextrana.

3.2 Glicosiltransferasas

Las glicosiltransferasas (GT) pertenecen al grupo de enzimas Transferasas. Estas enzimas catalizan el traslado de un grupo funcional específico desde un sustrato (donador) hacia otro (aceptor), el grupo que se transfiere puede ser de naturaleza variada. Las glucosiltransferasas y fructosiltransferasas pertenecen a este grupo de enzimas.

3.2.1 Glucosiltransferasas

Las glucosiltransferasas son enzimas de alto peso molecular cuyo promedio es de 160 kDa, catalizan la síntesis de polímeros de alto peso molecular a partir de la sacarosa, los glucanos sintetizados están compuestos por unidades D-glucosa y sólo sintetizan enlaces α , generalmente α -1,2, α -1,3, α -1,4 y α -1,6, con la consecuente liberación de fructosa:



La energía necesaria para la catálisis es provista por el enlace glicosídico del sustrato y es almacenada en un intermediario covalente enzima-sustrato, por lo que no requieren de intermediarios de alta energía, ni de cofactores para llevar a cabo la transferencia de los residuos glucosilo.

La síntesis de estos polímeros ha sido observada en diferentes géneros de BAL, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Lactobacillus* y *Lactococcus*. La masa molecular, la estructura y las propiedades físicas del glucano sintetizado por estos organismo, esta influenciado por factores como el medio de cultivo, la temperatura, el tiempo de incubación, la concentración de sacarosa utilizada y la presencia de enzimas degradantes de polisacáridos.

Cuando al medio de reacción se le añaden moléculas que presentan una alta eficiencia como aceptores, por ejemplo maltosa e isomaltosa principalmente, también se da la formación de oligosacáridos de bajo peso molecular (Monchois and Monsan, 1999):



3.2.1.1 Clasificación de las glucosiltransferasas

Las glucosiltransferasas se clasifican con base en la estructura de los glucanos que sintetizan. Existen cepas que sintetizan más de un tipo de glucano, indicando la producción de más de una glucosiltransferasa. La estructura de estos polímeros se determinó usando una gran variedad de técnicas, tales como la metilación del polímero, hidrólisis enzimática, la prueba de degradación de Smith y análisis de resonancia magnética nuclear.

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

- I. **Dextransacarasa. E.C.2.4.1.5.** Sintetizan el polímero de dextrana, el cual es homopolisacárido extracelular de alto peso molecular, que posee al menos 50% de enlaces α -1,6 dentro de la cadena principal y ramificaciones en α -1,2, α -1,3, α -1,4, el porcentaje de ramificación varia dependiendo de la cepa productora de la enzima. Las dextranas con mayor aplicación biotecnológica son las producidas por *L. mesenteroides* NRRL B-512.
- II. **Mutansacarasa. E.C. 2.4.1.5.** El polímero sintetizado por estas enzimas recibe el nombre de mutana y está constituido por más de un 50% de enlaces α -1,3 el cual es insoluble en agua. Estas enzimas son producidas por *L. mesenteroides* NRRL B-523, B-1149, algunas cepas de *Streptococcus*. Hasta ahora, en estos polímeros no se han desarrollado posible aplicaciones biotecnológicas, de hecho los polímeros de mutana están involucrados en la adhesión de microbiota oral bacteriana (*S. mutans*) causante de la placa dental (Guggenheim, 1970).
- III. **Alternansacarasa. E.C. 2.4.1.40.** Estas enzimas produce un polímero llamado alternana constituido por enlaces α -1,6 y α -1,3 en la cadena principal de manera alternada. Las cepas productoras de estas enzimas son *L. mesenteroides* NRRL B-1355, B-1501 y B-1498 (Monsan P. *et al* 2001).

IV. **Reuteransacarasa.** Recientemente un nuevo glucano fue identificado a partir de *Lactobacillus reuteri* 121, el cual contiene principalmente enlaces α -1,4 (van Hijum *et al.* 2006).

3.2.1.2 Dextransacarasas

Como ya se mencionó, las dextransacarasas (DS) catalizan la síntesis del polímero dextrana (Figura 3.1), el cual es un glucano de importancia biotecnológica. La DS de *L. mesenteroides* B-512 es la de mayor interés, debido a que produce un glucano que contiene un 95 % de enlaces α -1,6, el cual es utilizado en el área de la medicina, ya que una solución salina isotónica con dextrana (6% p/v) puede ser utilizada como sustituto de plasma sanguíneo, y principalmente en el área de tecnología de separaciones, debido a que los geles a base de dextrana son utilizado para la purificación y separación de proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos, Sephadex® (Flickinger M. and Drew S. 1999).

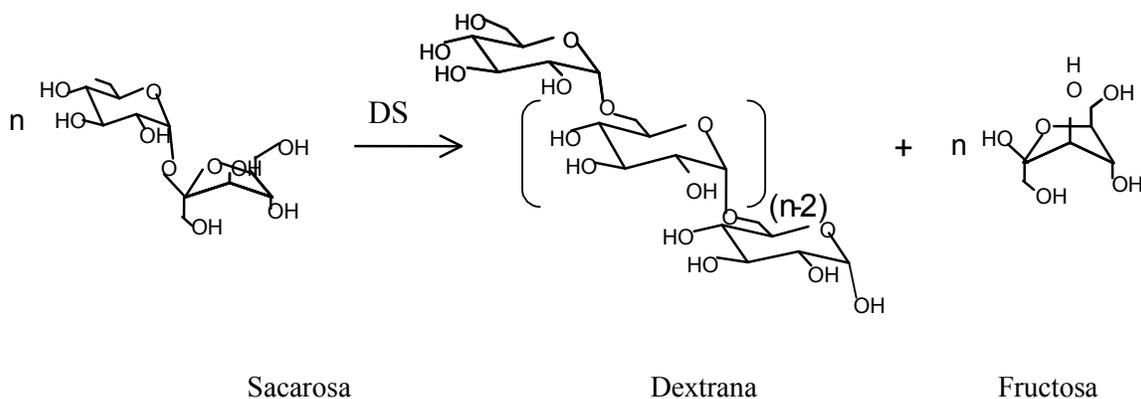


Figura 3.1
Reacción catalizada por la dextransacarasa

Además de la dextrana, los oligosacáridos sintetizados a partir de la DS y en especial de la cepa B-1299, tienen aplicación en la industria alimentaria como compuestos prebióticos, ya que al poseer enlaces de tipo α -(1 \rightarrow 2) y al no ser hidrolizados por las enzimas digestivas de los organismos monogástricos, pasan al intestino grueso donde son metabolizados por la microbiota

microbiana presente (Djouzi and Andrieux. 1995), contribuyendo a mantener la flora bacteriana benéfica para la salud.

Dentro de los estudios bioquímicos y moleculares realizados a estas enzimas se encuentran, la determinación del peso molecular, el mecanismo catalítico, el análisis de la relación estructura-función, así como la caracterización de los genes que identifican a estas enzimas. En este último aspecto ya se han logrado secuenciar un gran número de genes que codifican para la expresión de DS en varias cepas de *L. mesenteroides* (Tabla 3.1).

Tabla 3.1
Genes de DS identificados en *Leuconostoc mesenteroides*

Cepa	Gene	Glucano	Tamaño (aa)	PM (kDa)	Referencia
B-512F	<i>dsr-S</i>	95% α -1,6 5% α -1,3	1527	170	Wilke-Douglas M. <i>et al</i> 1989
	<i>dsr-T</i>		1016	112	Funane K. <i>et al.</i> , 2000
B-1299	<i>dsr-A</i>	85% α -1,6 15% α -1,3	1290	146	Monchois V. <i>et al</i> , 1996
	<i>dsr-B</i>	95 % α -1,6 5% α -1,3	1508	167	Monchois V. <i>et al</i> , 1998
	<i>dsr-E</i>	α -1,2 y α -1,6	2835	313	Bozonnet S. <i>et al</i> , 2002
B-1355	<i>dsr-C</i>	α -1,6	1477	165	Arguello-Morales M. <i>et al</i> 2000 ^a
	<i>asr</i>	α -1,3 y α -1,6 (alternados)	2057	229	Arguello-Morales M. <i>et al</i> 2000 ^b
IBT-PQ	<i>dsr-P</i>	80% α -1,6 20% α -1,3	1454	166	Fernández-Vazquez J., L., <i>et al</i> 2003
Lcc4	<i>dsr-D</i>	95% α -1,6 5% α -1,3	1527	165	Neubauer H. <i>et al</i> , 2003
B-1501	<i>dsr-R</i>	No determinado	1330	149	Kim C.H. <i>et al</i> 2003

3.2.2 Fructosiltransferasas

Las fructosiltransferasas (FS) pertenecen al grupo de las glicosiltransferasas, estas enzimas utilizan a la sacarosa como sustrato, transfiriendo el residuo de fructosa a una molécula aceptora, la cual puede ser la cadena creciente de fructosa, otra molécula de sacarosa, el agua (hidrólisis) o de mono hasta tetrasacáridos para producir oligosacáridos la energía que se libera del enlace glucosídico es transferida hacia la formación del enlace fructosilo, cuya especificidad es dependiente de la fuente de la enzima. Los productos principales de las FS son dos tipos de

polímeros: la levana polímero de enlaces en β -2,6-fructosa producido por la actividad de la levansacarasa (LS), e inulina polímero de enlaces en β -2,1-fructosa producido por la actividad de la inulinosacarasa (Castillo & López-Munguía, 2004). La inulinosacarasa se expresa únicamente en las BAL, mientras que la LS esta ampliamente distribuida en bacterias gram positivas y negativas. Sin embargo, a nivel de aminoácidos las LS de las gram positivas son más grandes y presentan sólo un 20% de similaridad con las producidas por las gram negativas (van Hijum, *et al.* 2006), por ejemplo la LS de *S. salivarius* ATCC 13459 es particularmente grande con una masa molecular de 140 kDA (Newbrun and Baker, 1968). En los últimos años las FT han tomado gran relevancia por su capacidad de sintetizar fructooligosacáridos (FOS) a partir de la sacarosa, los cuales son azúcares que al no ser digeridos en el estómago ni en el intestino delgado estimulan selectivamente el crecimiento de bifidobacterias, mostrando importantes beneficios para la salud (Monsan, *et al.* 2001).

Cabe mencionar que aunque el sustrato de la reacción de las DS y las FT es el mismo (sacarosa) la secuencia de aminoácidos no es similar entre ellas y por lo tanto el gene también es diferente. Sin embargo, se estudió en el presente trabajo que la región promotora de ambos genes (DS y LS) presenta gran similitud.

3.2.2.1 Levansacarasa

La levansacarasa (LS) (E.C. 2.4.1.10) (β -2,6 fructan: D-glucosa-1-fructosiltransferasa) es una enzima que pertenece al grupo de las fructosiltransferasas y poseen características similares a las glucosiltransferasas sólo que en este caso transfieren un residuo fructosilo de la sacarosa a una molécula aceptora, liberan glucosa al medio de reacción y dan lugar a la formación de levana (Figura 3.2), un polisacárido de alto peso molecular compuesto por unidades D-fructopiranosilo. La levana al igual que la dextrana posee aplicaciones biotecnológicas propias, lo cual hace que sea útil para una gran variedad de aplicaciones, por ejemplo en el campo de los cosméticos, los alimentos y la industria farmacéutica y en el área de la medicina como agente hipocolesterolémico. La LS además de catalizar la formación del polímero de fructosa también lleva a cabo la síntesis de oligosacáridos de bajo peso molecular cuando en el medio de reacción se encuentran presentes moléculas aceptoras como la lactosa y la maltosa (van Hijum, *et al.* 2006).

Entre los organismos con mayor producción de LS se encuentra el género *Bacillus*, en el que se han realizado una amplia gama de estudios encaminados a su aplicación biotecnológica por ejemplo, en la producción de FOS. Dentro de las BAL se ha reportado la presencia de actividad LS, sin embargo este conocimiento es aún muy limitado. Sólo para el caso del género *Lactobacillus* se ha encontrado que, cuando éste participa durante la fermentación del pan ácido se produce levana, entre otros polisacáridos, lo cual da como resultado que el producto final posea propiedades reológicas similares a las que se presentan cuando se utilizan xantana o goma guar (Tiekling, *et al.* 2003), este hecho abre la posibilidad de usar estas BAL como sustitutos en el uso de aditivos.

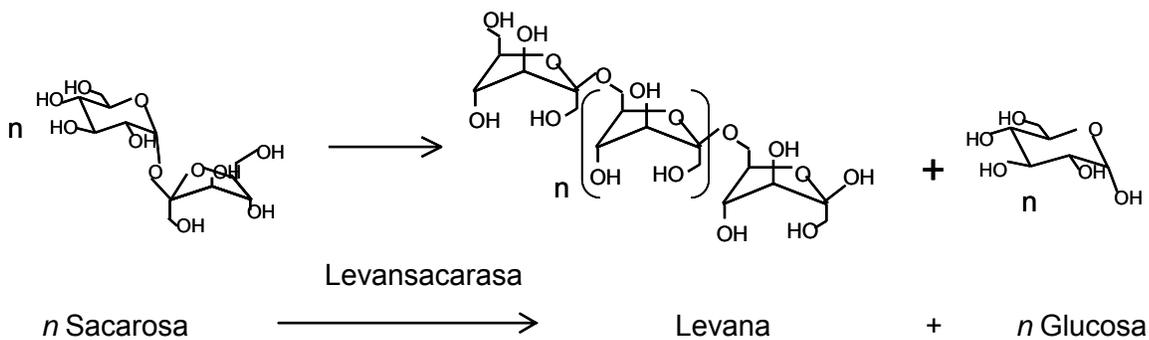


Figura 3.2
Reacción catalizada por la levansacarasa

En 1986 se reportó, por primera vez en *L. mesenteroides* B-512F, la presencia de la LS (Miller and Robyt, 1986), en aquellas investigaciones la presencia de actividad LS en *Leuconostoc* se consideraba como un obstáculo para diversos estudios de la DS, ya que estaba presente en el mismo extracto enzimático y utiliza el mismo sustrato que la DS. Recientemente el grupo de investigación del Dr. López-Munguía aisló, secuenció y clonó en *E. coli* el gene de la LS (*lev-S*) de la cepa B-512F (Morales-Arrieta, *et al.* 2006), donde se reportó que el gene codifica para una posible proteína de 1022 aminoácidos, con una masa molecular teórica de 113 kDa, contribuyendo así el estudio molecular de la GT en *L. mesenteroides*.

3.3 Inicio de la transcripción

Las bacterias codifican miles de diferentes proteínas necesarias para su óptimo funcionamiento, pero ante cambios en su medio ambiente no todas son requeridas al mismo tiempo, ni en la misma cantidad. La regulación de la expresión genética permite a la célula controlar la producción de proteínas necesarias para su ciclo de vida o para la adaptación a los cambios extracelulares esta regulación hace posible que la bacteria se adapte rápidamente a dichos cambios. Los diversos pasos durante la transcripción y la traducción son, por lo tanto, objeto de diferentes mecanismos de regulación.

Un gene es aquella secuencia de ADN que produce un transcrito y no importa si se llega a traducir o no, por lo tanto, el proceso de la transcripción es fundamental para el funcionamiento biológico de cualquier organismo. En la mayoría de los procesos biológicos, el paso más importante en la regulación se da al comienzo, por lo que el control más importante en la expresión de un gene es en el inicio de la transcripción, la relación estructura función entre las proteínas involucradas en la transcripción, así como la secuencia de ADN que servirá como molde para la síntesis del ARNm, es central para el entendimiento de este proceso biológico.

La ARN polimerasa (ARN pol) es la enzima que lleva a cabo la transcripción la polimerasa más estudiada de los organismos procariotes es la ARNpol de *E. coli* y dependiendo de la velocidad de crecimiento se pueden encontrar de 1500 a 11400 moléculas de ARNpol por cada célula de *E. coli* (Woësten. 1998). La holoenzima de la ARNpol (ARNPH) esta compuesta de la ARNpol (núcleo) más la subunidad sigma (factor σ). El núcleo es un complejo de ~400 kDa conformada por cinco subunidades ($\alpha_2\beta\beta'\omega$). Para comenzar el inicio de la transcripción de un gene, la ARNpol debe reconocer entre todo el vasto mundo de ADN una región denominada promotora. Sin embargo, el núcleo es incapaz de iniciar la transcripción por si solo, la subunidad σ debe de unirse al núcleo para formar la holoenzima y así dirigir todo el complejo hacia la identificación de la región promotora. Cuando la ARNPH reconoce la región promotora, se establece en el ADN aproximadamente de la posición -6 a la -54, dando inicio a la formación del llamado complejo cerrado. Una vez establecida la ARNPH en la región promotora, provoca una serie de transiciones estructurales para la formación del llamado complejo abierto (Murakami, *et al.*, 2002), en el cual comienza la apertura de la doble hélice para exponer la hebra molde, aquella que servirá para construir la cadena de ARN, a partir de ese momento se establece la fase de elongación, donde la ARNPH comienza la síntesis de ARN utilizando como molde la cadena de

ADN. Cuando la ARNPH entra en la fase de elongación y deja atrás la zona promotora, la subunidad σ pierde afinidad por la ARNAP y eventualmente se disocia (Geszvain and Landick, 2005).

3.4 Factores sigma (σ)

Las bacterias sintetizan diferentes factores sigma con el propósito de dirigir a la ARNPH a distintas clases de promotores con diferentes secuencias consenso. Esta variedad de factores σ permite a la bacteria mantener la expresión genética basal, así como responder a estímulos generados en el medio extracelular. Al factor σ que participa en la transcripción de la mayoría de los genes que componen un genoma se le conoce como sigma endógeno, primario o de mantenimiento. Basados en la similaridad de sus secuencias, los factores σ pueden agruparse en dos familias, la familia de factores σ^{70} y la familia σ^{54} (Campbell *et al.* 2002)

La identificación de factores σ en varias especies de bacterias ha propiciado que se encuentren en la literatura factores σ similares con diferentes nombres e incluso diferentes factores σ con nombres idénticos. En *E. coli* y otras bacterias Gram negativas el gene que codifica para el factor σ es designado *rpo* (por *RNA polymerase subunit*), mientras que en muchas bacterias Gram positivas estos genes son designados *sig*. Las proteínas pueden ser nombradas σ con un superíndice que refleje el peso molecular o el nombre del gene, o puede designarse arbitrariamente una letra, en la Tabla 3.2 se muestra el nombre de varios factores σ .

El factor σ^{70} es el factor sigma primario responsable del reconocimiento de la mayoría de los promotores de ARNm, ARNr y ARNt en todos los organismo bacterianos, los cuales pueden contener uno o más factores σ pertenecientes a la familia σ^{70} , la cual está dividida en tres subgrupos dependiendo de su estructura y funcionalidad en la Tabla 3 se muestra los subgrupos pertenecientes a la Familia σ^{70} .

Tabla 3.2
Secuencias consenso de promotores reconocidos por varios factores σ .
Wöesten. 1998

Familia σ^{70}	Nombre	Secuencia Consenso		
		-35	Espacio	-10
1. FACTORES σ PRIMARIOS	σ^{70} , RpoD, SigA	TTGACA	16-18	TATAAT
2. FACTORES σ PRIMARIOS NO ESENCIALES				
2.1 Factor σ de fase estacionaria	σ^{38} , RpoS			CTATACT
3. FACTORES σ ALTERNATIVOS				
3.1 Factores σ Flagelares	σ^{28} , FliA, SigD	TAAA	15	GCCGATAA
3.2 Factores σ ECF	σ^E , SigE	GAACCTT	16-17	TCTRA
3.3 Factores σ de choque térmico	σ^{32} , RpoH σ^B , SigB	CTTGAAA	11-16	CCCATnT
		GTTTAA	12-14	GGGTAT
3.4 Factores σ de esporulación	σ^H , SpoOH	AGGAWWT	12-14	RGAAT
	σ^F , SpoIIAC	WGCATA	14-15	GGGnRAYAM TW
	σ^E , SpoIIGB	GKCATATT	13-15	CATACAMT
	σ^G , SpoIIIG	TGAATA	17-18	CATACTA
	σ^K , SpoIIIC	AC	16-17	CATAnAnTA
Familia σ^{54}	Nombre	Secuencia Consenso		
	σ^N , RpoN, SigL	-24	Espacio	-12
		TGGCAC	5	TTGCW

N: Cualquier base; R: A o G; W: A o T; Y: C o T; M: A o C; K: G o T

El grupo 1 comprende los factores σ primarios responsables de la transcripción de muchos genes que se expresan en la fase exponencial de crecimiento, necesarios para el funcionamiento celular, por lo cual estos factores están presentes en todas las bacterias. El grupo 2 comprende aquellos factores σ que poseen secuencia de aminoácidos muy similar a los factores σ primarios en la región de unión al ADN, lo cual sugiere que ambos grupos podrían reconocer secuencias promotoras similares, sin embargo estos factores σ no son esenciales para el crecimiento de la célula. Las enterobacterias, las bacterias Gram positivas con alto contenido de GC y las cianobacterias, poseen factores σ del grupo 2. En las enterobacterias y *Pseudomonas* estos factores σ son conocidos como factores σ específicos de fase estacionaria, σ^S o RpoS, los cuales se expresan cuando las células experimentan una falta de nutrientes o situación de estrés físico y/o químico, de tal manera que para adaptarse a largos periodos sin crecimiento, dichos factores

regulan la expresión de proteínas necesarias para sobrevivencia de la célula, por ejemplo genes involucrados en la prevención y reparación del DNA dañado, osmoprotección y termotolerancia. El grupo 3 son los denominados factores σ alternativos, los cuales difieren considerablemente en secuencia de los factores σ primarios y regulan la transcripción de regulones específicos en condiciones fisiológicas específicas, como son los genes involucrados en la formación del flagelo, de esporulación y de respuesta a cambios térmicos o de “*Heat shock*” (Woësten. 1998 y Paget and Helmann. 2003).

Por otro lado, muchas bacteria también poseen el factor σ perteneciente a la familia σ^{54} , el cual ha sido relacionado con la regulación del nitrógeno en *E. coli*. La familia σ^{54} contiene sólo un grupo de factores σ (Tabla 3), los cuales se consideran que no son necesarios en ciertas condiciones de crecimiento. Sin embargo, en la literatura reciente se ha reportado nuevas funciones de σ^{54} , como lo es la transcripción de genes involucrados en el transporte y metabolismo de diferentes fuentes de nitrógeno y carbono, síntesis de diversos cofactores, producción de alginato y en genes flagelares (Cases, *et al.* 2003).

3.4.1 Características estructurales de la familia σ^{70}

Con base en el análisis de secuencias, se observa que las proteínas de la familia σ^{70} poseen cuatro regiones conservadas y divididas a su vez en subregiones, en la Figura 3.3 se muestra un esquema de la relación estructura-función de la subunidad σ^{70} .

La región amino terminal 1 se encuentra conservada sólo en los factores σ^{70} primarios y está dividida en dos subregiones (1.1 y 1.2). La región 1.1 no está presente en los factores σ alternativos. En los factores σ primarios esta relacionada con la unión al ADN y con la eficiencia en el inicio de la transcripción. Una vez que el complejo cerrado se ha formado, la región 1.1 facilita la transición del complejo cerrado al complejo abierto de la ARNpol, ya que se ha demostrado que mutaciones en dicha región afectan la formación del complejo abierto. Además se ha propuesto que cuando σ^{70} se encuentra libre, la región 1.1 interacciona con la región 4.2, es decir bloquea la región 4.2 responsable del reconocimiento de la región promotora -35 (Geszvain and Landick. 2005). La región 1.2 es requerida para la formación del complejo abierto.

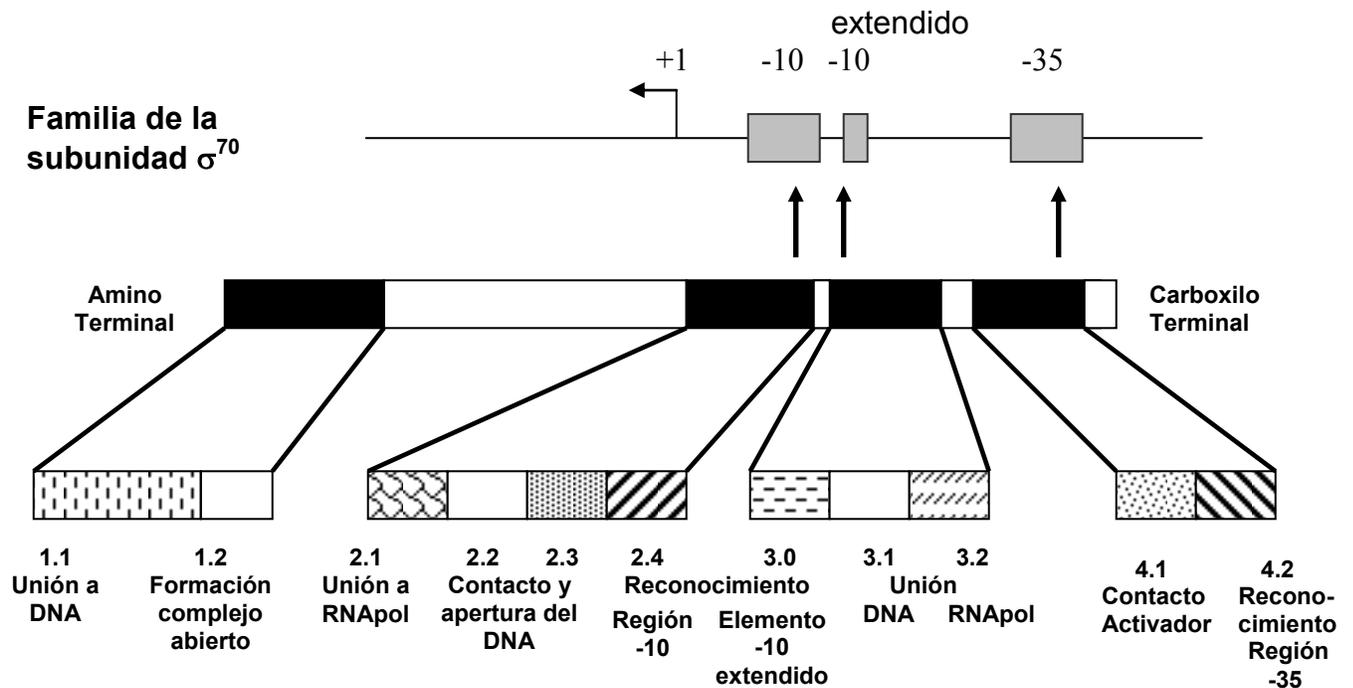


Figura 3.3
Mapa general de las regiones conservadas en la familia σ^{70}
 (Malhotra *et al.* 1996, Woësten. 1998 y Campbell *et al.* 2002)

La región 2 es la más conservada en todos los miembros de la familia σ^{70} y se divide en cuatro subregiones (Figuras 3 y 4). La región 2.1 participa en el contacto con el núcleo de la RNAPol, en particular con la subunidad β' . Las regiones 2.2 y 2.3 poseen residuos positivos conservados y están involucradas en el contacto y apertura de la cadena de ADN cargada negativamente, mediante un probable reconocimiento no dependiente de una secuencia específica (Campbell *et al.* 2002). La región 2.4 es fundamental para el reconocimiento del elemento promotor situado en -10, es decir aproximadamente 10 nucleótidos río arriba del inicio de la transcripción (+1). Mutaciones en la región 2.4 modifican la interacción con la región -10, por lo cual, el reconocimiento hacia la cadena de ADN en este caso si es dependiente de la secuencia de nucleótidos presente (Malhotra *et al.* 1996, Woësten. 1998 y Campbell *et al.* 2002).

La región 3 es considerada como la menos conservada y se subdivide en tres regiones (Figura 3.4 y 3.5). La región 3.0, anteriormente nombrada como la región 2.5, es un dominio que posee la

estructura de tres α hélices, la región anfipática amino terminal consiste en una α hélice que presenta aminoácidos conservados que interactúan con una región del ADN localizada río arriba del elemento -10, llamada elemento menos diez extendido (Campbell *et al.* 2002). Las regiones 3.1 posee un motivo de unión a ADN y la región 3.2 puede estar involucrada en el contacto con el núcleo de la ARNpol.

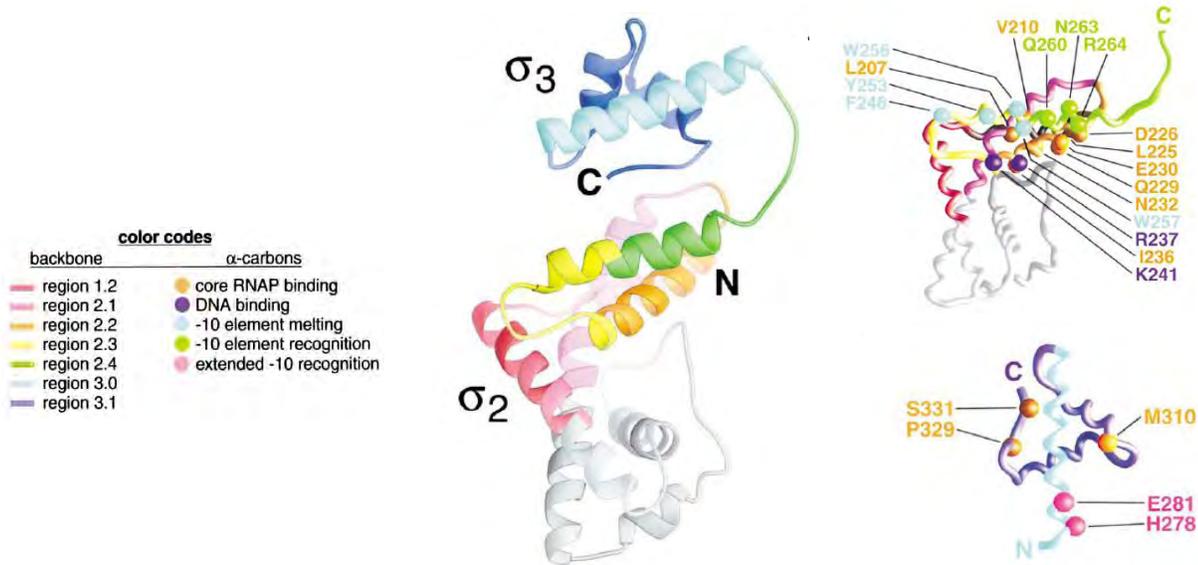


Figura 3.4

Modelo estructura-función de las regiones 2 y 3 del factor σ^{70}

El código de colores relaciona la función reportada para cada subregión
 Las estructuras en gris representan elementos no conservados.
 (Campbell *et al.* 2002)

Después de la región 2, la región 4 es la segunda región más conservada, la cual posee tres motivos en α hélices y está dividida en dos subregiones (Figura 3.5). La región 4 interactúa con la subunidad β de la ARNpol, para de esta forma exponer sólo la región 4.2. Un motivo conservado hélice giro hélice con residuos hidrofóbicos es responsable de una interacción secuencia específica con el elemento promotor localizado en el -35. La región 4.1 se ha propuesto que se une a ciertos activadores durante el inicio de la transcripción (Wösten. 1998).

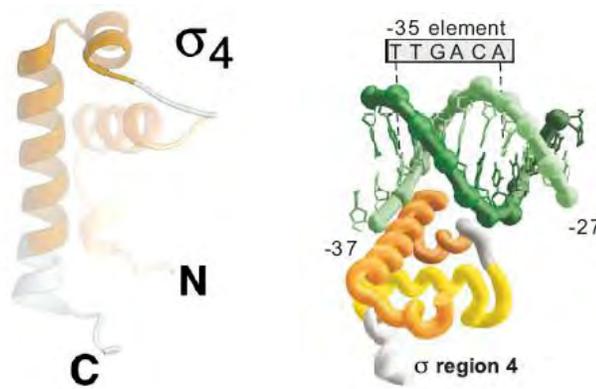


Figura 3.5

A. Modelo de región 4 del factor σ^{70}
(Campbell *et al.* 2002)

B. Modelo de interacción de la región σ_4 con la secuencia promotora -35
En café se indica la región 4.2 y en color amarillo la región 4.1
(Geszvain and Landick, 2005)

3.5 Promotores

Los promotores de *E. coli* son de las señales reguladoras en el ADN mejor estudiadas, el reconocimiento del promotor es un paso crucial en la transcripción, desde el punto de vista de la regulación y también en lo que se refiere al mecanismo por el cual la ARNpol encuentra a los promotores mediante un proceso de búsqueda. Existen datos biofísicos que muestran que la ARNpol se desliza a lo largo del ADN sin dissociarse del mismo, la subunidad σ es quien lleva a cabo el reconocimiento de la zona promotora, la enzima sin σ continua siendo activa, pero se une al ADN en mucho más lugares no promotores (Geszvain and Landick, 2005). En bacterias el reconocimiento del promotor es un paso limitante en la velocidad de inicio de la transcripción dado que todos los genes se transcriben por la misma ARNpol, las variaciones de la estructura del promotor han de ser en gran parte las responsables de los cambios en la frecuencia de inicio de la transcripción.

Como otro ejemplo, se sabe que muchas de las estrategias para una eficiente producción de proteínas heterólogas en diferentes organismos hospederos, deben incluir la presencia de una región promotora fuerte que garantice una alta expresión de la proteína de interés. La región promotora debe contener elementos de regulación que permitan una alta expresión del gene blanco, los cuales dependerán del organismo hospedero. Por ejemplo, los vectores de expresión

en *E. coli* deben poseer una región promotora localizada de 10 a 100 pb río arriba de la señal Shine-Dalgarno, en la cual las cajas -10 y -35 sean idénticas a las consenso y deban estar separadas por un espacio óptimo de 17pb (Jana and Deb. 2005), en la Figura 3.6 se esquematiza los elementos básicos de un vector de expresión en *E. coli*.

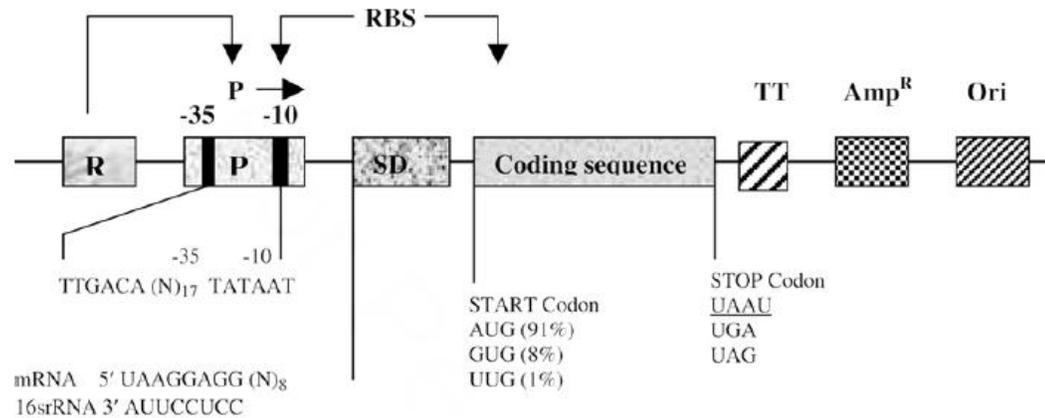


Figura 3.6
Esquema general de los elementos presentes
en un sistema de expresión en *E. coli*
 (Jana and Deb. 2005)

3.5.1 Secuencias consenso

La frecuencia a la cual la ARNpol inicia la transcripción depende de la secuencia del promotor, también llamada “fuerza del promotor”, y de la conformación del ADN en la región promotora. En 1975 David Pribnow y Heinz Schaller examinaron de manera independiente los datos, en ese entonces, limitados de secuencias de ADN, observaron que todos los genes que se transcriben en *E. coli* compartían una secuencia corta común rica en adenina y timina, centrada a unos 10 nucleótidos río arriba del comienzo de la transcripción. Existían variaciones entre los promotores analizados, sin embargo surgió una secuencia consenso que comprendía las bases que aparecían con más frecuencia en cada posición dentro de esta región conservada. Entre las diferentes secuencias de iniciación analizadas en *E. coli* la secuencia consenso fue T₈₀A₉₅T₄₅A₆₀A₅₀T₉₆*. Posteriormente se observó otra región de secuencia de nucleótidos conservada en el nucleótido -35, con una secuencia de consenso T₈₂T₈₄G₇₈A₆₅C₅₄A₄₅*. Las dos secuencias conservadas se denominan región -35 y región -10. No hay ningún promotor natural

conocido que tenga regiones -35 y -10 idénticas a las de las secuencias consenso, pero en general en cuanto más se parecen estas regiones de un promotor a las secuencias consenso, más eficiente es el promotor en la iniciación de la transcripción.

Cabe señalar que las primeras secuencias consenso establecidas corresponden sólo a aquellas reconocidas por los σ^{70} primarios, debido a que estas secuencias se encuentran en los genes que se expresan en mayor cantidad en *E. coli*. Sin embargo, cada uno de los σ^{70} expresados en las bacterias posee una secuencia consenso de reconocimiento, en la Tabla 3.2 se muestra las secuencias consenso que reconocen los diferentes factores σ reportados en bacterias.

La secuencia consenso promotora que reconoce el factor σ^{70} primario en los procariotas es conservada, si bien el descubrimiento de las secuencias consenso en la región promotora se realizó con base en los genes de *E. coli*, el análisis de la región promotora de los genes reportados en *B. subtilis* muestra la misma estructura reportada para *E. coli*. En la Figura 3.7 se muestra el análisis de la frecuencia de aparición de cada nucleótido en la región promotora de 236 genes de *B. subtilis* (Helmann J. 1995), donde es clara la alta frecuencia de aparición de los de los nucleótidos TTGACA y TATAAT, centradas en las posiciones -35 y -10 respectivamente, desde el sitio de inicio de la transcripción (+1).

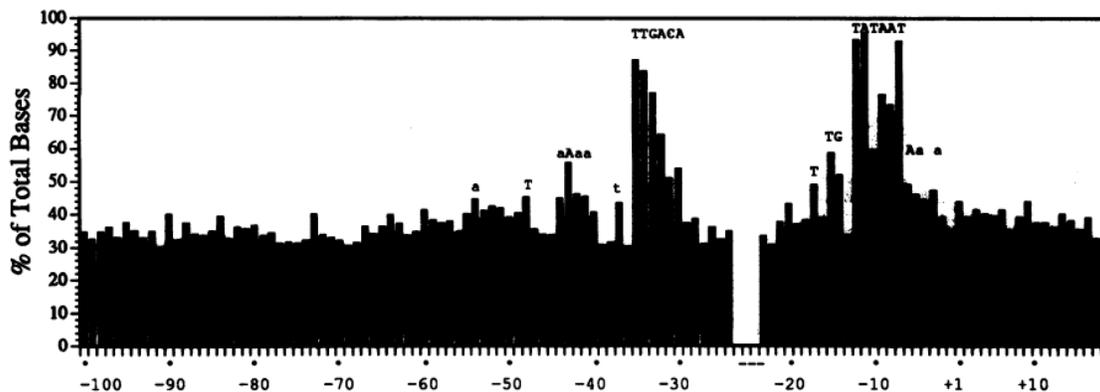


Figura 3.7
Bases conservadas a partir del alineamiento de 236 regiones promotoras en genes de *B. subtilis*
 En la figura aparecen graficadas sólo las bases que presentaron mayor frecuencia de aparición en cada posición
 (Helmann. 1995)

* Los números indican la frecuencia con la que se presenta cada nucleótido en esa posición

Con base en análisis estadísticos de la frecuencia de aparición de cada nucleótido en regiones promotoras de genes de *E. coli* se ha establecido que ambos hexámeros se localizan frecuentemente a distancias específicas respecto al inicio de transcripción. La caja promotora -10 se ha observado que se localiza de 4 a 12pb respecto al inicio de transcripción, con preferencia a los 7 nucleótidos (Harley and Reynolds, 1987, Figura 3.8, A). Mientras que las secuencias alrededor de las cajas -35 y -10 están frecuentemente separadas por un espacio de 16 a 18 nucleótidos, con preferencia a los 17 nucleótidos (Harley and Reynolds, 1987, Figura 3.8, B).

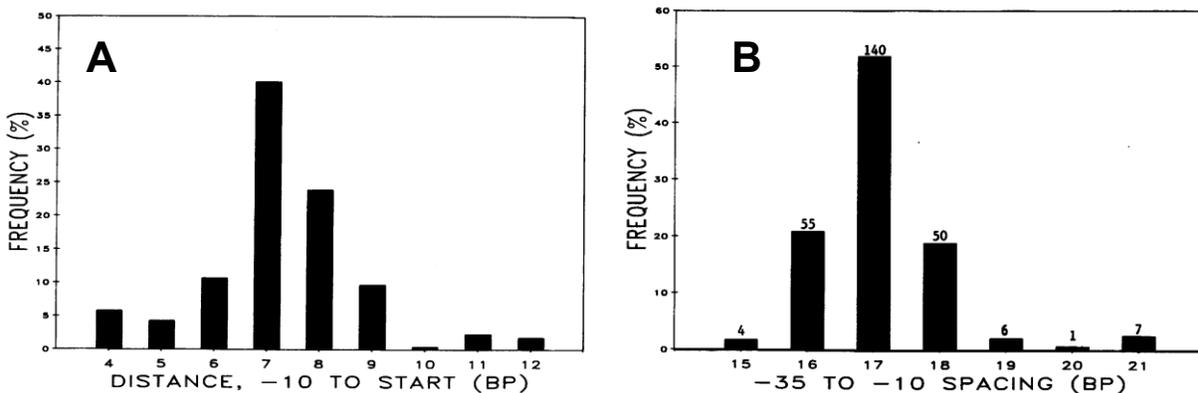


Figura 3.8
A, Distribución de 263 promotores con respecto al inicio de transcripción
B, Distribución de promotores respecto al espacio entre las cajas -10 y -35
 (Harley and Reynolds, 1987)

Las secuencias espaciadoras se considera no conservadas, por lo que existe una variabilidad de secuencias entre cada gene. Sin embargo, Jensen and Hammer en 1998 demostraron mediante la construcción de una biblioteca de promotores sintéticos, que modificaciones en dichas secuencias también pueden modular la fuerza de los promotores bacterianos. El cambio de bases en las secuencias espaciadoras provocó cambios en los niveles de expresión en la actividad β -galactosidasa evaluada. En la Figura 3.9 se muestra la secuencia de oligonucleótidos utilizada para la generación de una librería sintética de promotores para *Lactococcus lactis*, en la cual se presentan los mismos elementos regulatorios de la región promotora para la expresión de genes en *E. coli* (Jensen and Hammer, 1998).

5' -MCS-NNNNNAGTTTATTCTTGACANNNNNNNNNNNNTGRTATAATANNWNAGTACTGTT-MCS-3'
 -44 -35 -15 -10 +1

Figura 3.9
Secuencia de oligonucleótidos utilizada para la generación de una
librería sintética de promotores para *Lactococcus lactis*
 N, cualquier base (A, T, G y C). T, puede ser A o G. W, puede ser G o T

Hasta el momento, sólo se consideran a las secuencias espaciadoras como elementos importantes en la región promotora por el número de nucleótidos que posea y no por la secuencia de cada una de ellas.

Cómo resultado del reconocimiento del factor σ^{70} primario de las secuencias consenso en -10 y -35, los cambios de nucleótidos en estas secuencias generalmente disminuyen la fuerza del promotor. Sin embargo, varios experimentos, así como la estructura cristalográfica de la región 3 de la subunidad σ^{70} , han demostrado la existencia de promotores que presentan una secuencia -35 alejada del consenso, en los cuales la transcripción puede funcionar o es dependiente de una secuencia conservada 5'-TG-3' localizada a una base río arriba del elemento -10 (Campbell *et al.* 2002, Murakami *et al.* 2002 y Young *et al.* 2002). El motivo TGn es denominado “elemento menos diez extendido” (EMDE), el cual se ha reportado que provee una fuerte señal de reconocimiento para la subunidad σ^{70} y hace innecesario la presencia de una caja -35 conservada y/o una región -10 conservada para iniciar el proceso de la transcripción. Este motivo ha sido reportado en el 30% de los promotores de *E. coli*, y en algunas bacterias Gram positivas está presente en el 50% de los promotores.

3.6 Elmento UP

Casi 25 años después del descubrimiento del factor σ como elemento de reconocimiento para las señales de inicio de la transcripción en el DNA bacteriano, se reportó que la subunidad α de la RNAPol puede involucrarse en el reconocimiento de un tercer elemento en la región promotora. Este elemento consiste en una secuencia de nucleótidos rica en (A+T), localizada en la región río arriba de la caja -35 del promotor, al cual se nombró “elemento UP” (por *Upstream*), en la Figura

3.10 se muestra el modelo propuesto (Gourse *et al.* 2000) para el reconocimiento del elemento UP por parte de la subunidad α de la RNAPol.

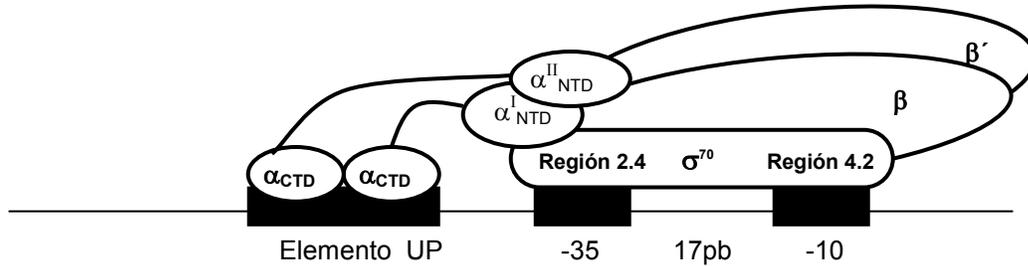


Figura 3.10
Modelo de reconocimiento del elemento UP por parte de subunidad α de la RNAPol
 CTD: Dominio carboxilo terminal de la subunidad α
 NTC: Dominio amino terminal de la subunidad α
 (Gourse *et al.* 2000)

Se ha reportado que el elemento UP en ausencia de otros factores adicionales a la RNAPol estimula la transcripción por un factor de 30 veces *in vitro* como *in vivo*, y que la modificación de las secuencias UP incrementan las actividades de varios promotores de *E. coli* y *B. subtilis*. Con base en el análisis de genes ribosomales, se ha logrado obtener secuencias consenso localizadas río arriba de la región promotora -35, en la Figura 3.11 se muestra la secuencia consenso característica de los elementos UP. Sin embargo, hasta el momento no se consideran como elementos canónicos en la región promotora (Ross *et al.* 1998, Estrem *et al.* 1998, Gourse *et al.* 2000).

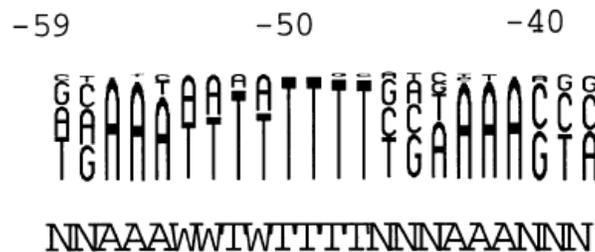


Figura 3.11
Secuencias consenso de en los elementos UP
 A. Diagrama de frecuencia con la que cada nucleótido aparece en las secuencias.
 B. Secuencia consenso basada en la frecuencia de nucleótidos,
 W = A ó T, N = cualquier nucleótido

3.7 Promotores estudiados en *L. mesenteroides*

La mayoría de los promotores reportados para el género *Leuconostoc* y en particular para los genes de GT de la especie *L. mesenteroides* provienen de estudios *in silico*, lo cual motivó, en algunos casos, a elaborar hipótesis donde se ponía en duda la expresión del gene encontrado, dado que no se logró determinar, mediante este método, una región promotora cercana al consenso de los procariotas (Quirasco *et al.* 2000). Y por otro lado, son escasos los estudios experimentales enfocados a la identificación del inicio de la transcripción y por lo tanto establecimiento de las regiones promotoras, en la Tabla 4 se muestra las regiones promotoras reportadas en este género de bacterias.

Dado que las GT también son expresadas por el género *Streptococcus*, donde existe una mayor información respecto a la expresión de dichas enzimas, a manera de comparación en la Tabla 3.3 se muestran las secuencias promotoras obtenidas para los genes de GT en este género de bacterias. Al igual que en los genes de *L. mesenteroides* la región -10 es conservada, pero en la región -35, a diferencia de los genes de GT en *L. mesenteroides*, sí presentan una secuencia de nucleótidos cercana al consenso de los procariotas.

Tabla 3.3
Regiones promotoras de genes pertenecientes al los géneros *Leuconostoc* y *Streptococcus*

Cepa	Gene	Región -35						Región -10					Referencia	
Consenso en procariotes	-	T ₈₂	T ₈₄	G ₇₈	A ₆₅	C ₅₄	A ₄₅	T ₈₀	A ₉₅	T ₄₅	A ₆₀	A ₅₀	T ₉₆	
<i>L. mesenteroides</i> B-512F	<i>dsr-S</i>	C	T	G	T	T	T	T	A	T	A	A	T	Quirasco <i>et al.</i> 2000
<i>L. mesenteroides</i> Lcc4	<i>dsr-D</i>	C	T	G	T	T	T	T	A	T	A	A	T	Neubauer <i>et al.</i> , 2003
<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>mae</i>	T	T	G	A	C	T	T	A	G	A	A	T	Bekal <i>et al.</i> 1999
	<i>clyR</i>	T	T	G	A	T	A	T	A	C	A	A	T	
	<i>gtf-B</i>	T	T	G	T	T	T	T	A	C	A	A	T	
<i>Streptococcus mutans</i> GS5	<i>gtf-C</i>	T	T	G	T	G	C	T	A	C	A	A	T	Goodman and Gao. 2000

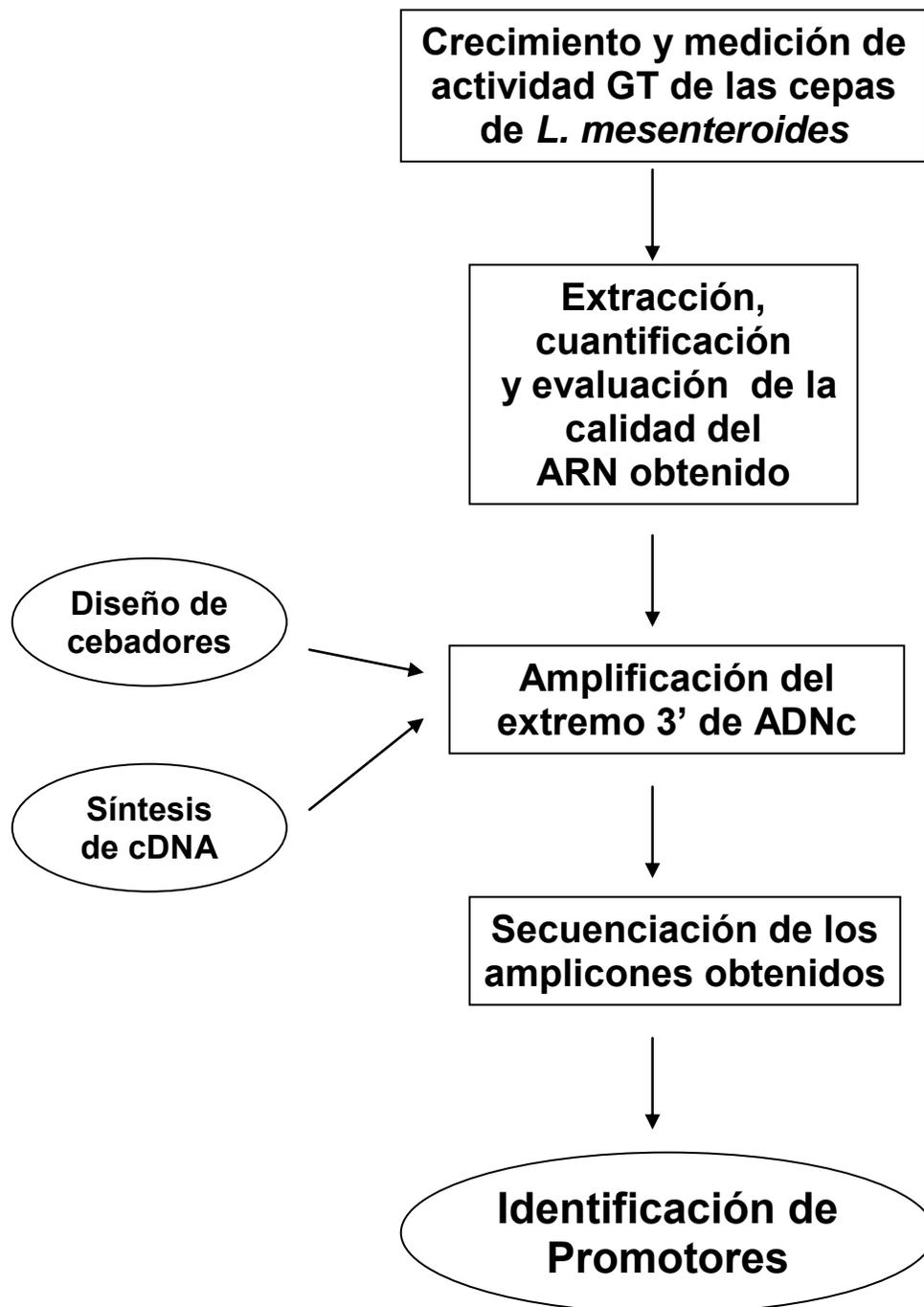
4. Objetivo

Identificar el inicio de transcripción y la secuencia promotora de de las glicosiltransferasas (GT) que se expresan en las cepas de *Leuconostoc mesenteroides* B-512, IBT-PQ, B-1299 y B-1355.

4.1 Objetivos particulares

- Realizar la extracción del ARN total de buena calidad en las cepas IBT-PQ, B-1299, B-1355 y B-512 de *L. mesenterodes*.
- Obtener la secuencia del extremo 3' del ADNc sintetizado a partir de los ARNm de los genes de cada una de la GT de las cepas en estudio.
- Identificar el inicio de transcripción de los genes *dsr-T*, *dsr-P*, *dsr-C*, *asr*, *dsr-A*, *dsr-B*, *dsr-E* y *lev-S* por el método de 5'-RACE.

5. Estrategia experimental



6. Materiales y métodos

6.1 Microorganismos y medio de cultivo

Las cepas de *Leuconostoc mesenteroides* B-512F, B-1299 y B-1355 se obtuvieron de la colección del Northern Regional Research Laboratory (NRRL) Peoria, Illinois. Mientras que la cepa IBT-PQ pertenece a la colección de cepas asiladas a partir de la bebida fermentada tradicional mexicana (Pulque) del Dr. López-Murguía. Las células se encontraban en una solución de glicerol al 15% (v/v) a -4 °C contenidas en frascos viales, las cuales sirvieron como inóculos para las fermentaciones a nivel matraz realizadas. La composición del medio de cultivo para el crecimiento del microorganismo se presenta en la Tabla 6.1.

Tabla 6.1
Composición del medio de cultivo para las cepas de
Leuconostoc mesenteroides

<i>Componente</i>	<i>Concentración (g/L)</i>
Sacarosa	40
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

6.2 Cinética de crecimiento

Con la finalidad de caracterizar el crecimiento de los microorganismos, se realizó para cada uno, una fermentación en lote, para lo cual se prepararon 50 mL de medio de cultivo, el cual se esterilizó en matraces de 250 mL para ser inoculado con 3 mL de las células almacenadas en glicerol. Se incubó a 30°C con agitación orbital a una velocidad de 200 r.p.m. Para determinar la cinética de crecimiento del microorganismo se determinó la turbidez del medio a 600 nm (D.O.₆₀₀

nm), en un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo Lambda 3A UV/VIS. El aumento en la densidad óptica del medio se correlaciona directamente con el crecimiento del microorganismo. Adicionalmente se midió el pH del medio a lo largo de la fermentación, por medio de un potenciómetro Beckman.

6.3 Actividad GT durante la fermentación

Para el caso de la cepa B-512 en cada alícuota se separaron las células del sobrenadante por centrifugación a 17000 xg durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante de cada fermentación, conteniendo a las enzimas, actividad GT soluble, se recuperó y se tomaron las muestras requeridas para la cuantificación de proteína total y al resto se le ajustó el pH adicionándole buffer de acetatos en una concentración final de 20 mM. Después de esto, el sobrenadante se almacenó en refrigeración para su cuantificación posterior. En los casos de la cepa B-1299 y B-1355 se realizó el mismo tratamiento, solamente que en este caso si se conservó el paquete celular que se obtuvo en la centrifugación antes mencionada, ya que en estas cepas la actividad GT también se encuentra asociada a la membrana celular, actividad GT en la fase insoluble.

6.3.1 Concentración-purificación de la actividad extracelular

Debido a que las primeras alícuotas obtenidas del cultivo de la cepa B-512 y todas las alícuotas de los extractos enzimáticos extracelulares de las cepas B-1299 y B-1355 poseían baja actividad GT, se procedió a realizar un proceso de concentración de las enzimas, para que de esta forma la medición de actividad enzimática pudiera ser evaluada por la técnica tradicional de producción de reductores. A partir del sobrenadante libre de células se agregó un mismo volumen de polietilenglicol (PEG) 50% (PM 1500), con la finalidad de formar dos fases, debido a la incompatibilidad de los dos polímeros, ya que termodinámicamente no pueden estar disueltos en la misma fase. Cuando la enzima se encontró en este sistema, migró junto con la dextrana a una de las dos fases, mientras que los restos del medio de cultivo, que contienen otras proteínas y carbohidratos permanecieron en la fase del PEG. De esta manera, la fase inferior rica en dextrana, unida a la GT, se separó por centrifugación, la pastilla obtenida se resuspendió en buffer de acetatos 20 mM y se conservó en refrigeración para su posterior cuantificación.

6.3.2 Medición de actividad GT por aparición de reductores

La medición de la actividad glicosiltransferasa por aparición de productos reductores se llevó a cabo en un medio de reacción cuya composición se muestra en la Tabla 6.2.

Tabla 6.2
Composición del medio de reacción para la medición de actividad GT

<i>Componente</i>	<i>Concentración final</i>
Buffer de acetatos (pH 5.4)	20 mM
Sacarosa	100 g/L
CaCl ₂	0.05 g/L
NaN ₃	1 g/L

Se utilizaron dos variantes de esta técnica, la tradicional que involucra un volumen final de 10 mL y una técnica a escala reducida, en la que el volumen final de reacción fue de 1.6 mL. La técnica con un volumen normal se utilizó para la cuantificación de la actividad GT en cepa 512, mientras que la técnica a escala reducida se utilizó en la medición de actividad tanto celular como extracelular de las cepas 1299 y 1355.

En el primer caso, la reacción se llevó a cabo al poner en contacto 5 mL de una solución de sacarosa (200 g/L) al medio de reacción que contiene entre 500 µL a 2000 µL de sobrenadante según la cantidad de actividad enzimática presente. Los azúcares reductores liberados se determinaron por la técnica del ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS), reportada por Sumner y Howell, 1935.

En el segundo caso, la reacción se lleva a cabo al adicionar 400 µl de una solución de sacarosa 400 g/L, al medio de reacción que en este caso contiene un volumen de 400 µl de la solución obtenida a partir del proceso de purificación antes señalado.

Finalmente, la medición de actividad GT asociada a las células se llevó a cabo por medio de la misma técnica de medición de azúcares reductores, sólo que en lugar de los 400 µl de solución de dextrana se colocó una cantidad conocida de células húmedas y se adicionó agua para

alcanzar el volumen final de 1.6 mL. Una unidad de actividad glicosiltransferasa (UGT) será definida como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol de azúcar reductor por minuto a pH 5.4 y a 30°C, en una solución con 100 g/L de sacarosa, 0.05 g/L de CaCl_2 y 1 g/L NaN_3 en buffer de acetatos 0.02 M.

6.4 Extracción del ARN total

Para la extracción de ARN total se utilizó soluciones y material libre de ARNasas, para lo cual todo el material se esterilizó en autoclave a 121°C por 1.5 h, mientras que el agua utilizada fue tratada con Dietil Pirocarbonato (DEPC, Sigma®) al 0.1 % y a autoclaveada por 1.5 h ($\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$). Se trabajó con guantes en todo momento.

Una vez que se alcanzó la densidad óptica deseada para cada cepa, se tomó del medio de cultivo el volumen correspondiente para obtener $\sim 1 \times 10^8$ células. Para obtener el paquete celular se centrifugó el medio de cultivo requerido a 10000 xg por 10 min a 4°C. Para realizar la lisis de las células se llevaron a cabo los siguientes pasos:

- a) En microtubos de 2 mL, lavar la pastilla celular con 300 μL buffer de PBS (NaCl 8 g/L, KCl 0.2 g/L, Na_2HPO_4 1.44 g/L y KH_2PO_4 0.24 g/L). Colectar las células por centrifugación.
- b) Resuspender las células en 300 μL de $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$.
- c) Adicionar lisozima en polvo a una concentración final de 5 mg/mL. Incubar por 20 min a 37°C.
- d) Agregar 2 μL de proteinasa K (Boehringer-Manheim). Colocar en hielo 1 min.
- e) Agregar 2 μL SDS al 10%. Incubar 30 min a 37°C.

Una vez realizada la lisis celular, para la extracción del ARN total se utilizó el reactivo de TRIZOL® (Invitrogen), de acuerdo al siguiente protocolo:

1. Dividir la preparación que contiene las células lisadas en dos fracciones, colocar en tubos de 2mL nuevos. Para cada alícuota de células lisadas seguir el mismo protocolo por duplicado.
2. Adicionar 1 mL del reactivo de TRIZOL, se agita con vortex (15-20s) e incubar por 10 min a 30°C.

3. Adicionar 200 μ L de Cloroformo y agitar con vortex (15-20s). Incubar 3 min a 30°C y centrifugar a 12000xg por 15 min a 4°C.
4. Tomar la fase acuosa (superior) y transfirir a un tubo nuevo de 1.5 mL. con el cuidado de no tomar nada de la interfase, ya que ahí se encuentran proteínas y ADN.
5. Agregar 0.5 mL de isopropanol, agitar con la mano e incubar 30 min a T ambiente y centrifugar a 12000xg por 10 min a 4°C.
6. Se retira el sobrenadante y se agrega 1 mL de Etanol al 75%. Agitar.
7. Para colectar la pastilla de ARN a partir de la solución con etanol, se centrifugó a 7500xg por 5min a 4°C. En este paso se puede guardó la pastilla de RNA a -70°C.
8. Desechar el sobrenadante y se resuspende la pastilla en el volumen deseado, utilizando H_2O_{DEPC} .

6.4.1 Cuantificación y evaluación de la calidad del ARN obtenido

Para evaluar la calidad e integridad del ARN total obtenido, se realizó una electroforesis en gel de agarosa (1%) en condiciones no desnaturalizantes y otro en condiciones desnaturalizantes. Para generar las condiciones desnaturalizantes se llevó a cabo el siguiente protocolo:

Para 100 mL de agarosa al 1%:

- I. Se disuelve 1g de agarosa en 85 mL de H_2O_{DEPC} .
- II. Cuando se alcanza la T de 60°C y se añaden 10 mL de Buffer de MOPS10X y 5.5 mL de Formaldehído al 37%.
- III. Se carga el gel en la cámara y se utiliza Buffer de MOPS 1X para llevar a cabo la electroforesis.

Para preparar la muestra:

- A. Al tubo de extracción de RNA se adiciona 4.7 mL de H₂O_{DEPC}, 2 μL de Buffer de MOPS 5X, 3.3 μL de Formaldehído al 37% y 10 μL de Formamida.
- B. Se calienta la muestra a 55°C por 15min, para desnaturalizar todo el ARN, y se carga en el gel.

Para visualizar el ARN desnaturalizado se sumerge el gel en una solución de Bromuro de Etidio (BE, 1μg/mL) o bien y sólo si la finalidad es evaluar la integridad de ARN obtenido, se puede adicionar el BE directamente en la muestra, con la finalidad de disminuir el fondo luminescente que se produce cuando se mezcla el BE y el formaldehído dentro del gel de agarosa. Si se requiere utilizar el ARN posterior a su visualización, por ejemplo en un ensayo de hibridación del tipo Northern, el BE se adiciona en el gel y para eliminarse, se realizan lavados con Buffer de Acetato de amonio.

6.5 Diseño de cebadores

Para encontrar los cebadores más específicos se emplearon los programas *DNASTAR* (Editseq 5.02 y PrimerSelect 5.01), *ClustalW* (<http://align.genome.jp/>) y *BLAST*. El programa *Editseq* sirvió para almacenar y delimitar la distancia en bases nucleotídicas de la región 5' de los genes de interés. Para diseñar los cebadores se utilizó el programa *PrimerSelect*. El programa *ClustalW* se utilizó para verificar la especificidad de los cebadores obtenidos. Mientras que el programa *BLAST* sirvió para verificar que el cebador construido no se alineara en más de un sitio dentro del propio gene, los cebadores construidos se muestran en la Tabla 6.3.

Tabla 6.3
Cebadores contruidos para la síntesis y amplificación
del extremo 5' del ADNc de GT

<i>Gene</i>	<i>Cebador</i>	<i>Secuencia de 5' a 3'</i>	<i>P.B.</i>	<i>Tm*</i>
<i>dsr-T</i>	GSP T	GTT-GAA-TTG-TTA-TTA-TCA-GAT-GTG-CC	26	53.2
	GSP1T	TTG-TTG-CTG-TTT-TAT-CAT-CCG-TT	23	51.6
	GSP2T	ACT-GCC-GTG-GCC-ACT-ACT-ACC-C	22	65.7
	PVT	TGT-TAG-TCA-TTG-CAG-GGA-GTG-TT	23	53
<i>dsr-P</i>	GSP P	GTT-GAA-TTG-TTA-TTA-TCA-GAT-GTG-CC	26	53.2
	GSP1P	TCA-GAT-GTG-TCG-GCT-GTT-GTT-GC	23	53.2
	GSP2P	CCG-AAT-TCG-ATT-GAT-TGA-CTG-C	22	56
	PVP	TTT-CCG-GAA-AAA-GAT-GTA-T	19	44
<i>dsr-C</i>	GSP C	GGC-CTT-TTG-CCT-GCA-CGC-CAT-TGT-TG	26	62.7
	GSP1C	TGC-CTG-CAC-GCC-ATT-GTT-GTC-A	23	60.3
	GSP2C	GGT-GGC-ATT-TGC-GGC-GAT-TTG-TTG	24	67.4
	PVC	GCC-ACC-CAA-GCA-GAA-AAA-GTA-AAA	24	58.5
<i>asr</i>	GSP asr	CAG-TGA-TGG-GAT-CAG-ATA-AAT-TAC-TG	26	54.8
	GSP1asr	TGG-TAG-TCA-GGC-CTT-TAG-CAG-TA	23	54
	GSP2asr	TGC-CGT-CTG-AAT-CAT-ACC-AAA-AAC-C	25	60
	PV asr	TTG-CGG-TAT-TGG-GGG-TTT-C	19	54.6
<i>dsr-A</i>	GSP A	GCC-TGC-ATG-GCA-GCT-GCC-GTT-AAG-G	25	64.2
	GSP1A	CCG-TTA-AGG-TCC-GCA-TAT-TTT-CAT	24	55.7
	GSP2A	GTG-CCC-AAC-GTT-TAC-CAT-TTT-TCA	24	58.8
	PVA	AAC-GCC-GTC-TAT-AAC-ACA-TCA-TCA	24	55.3
<i>dsr-B</i>	GSP B	GTG-GTT-GTC-AAC-AGT-AGT-CAA-CCC-C	25	59.3
	GSP1B	GTT-AGT-GTT-GTT-TGC-CGT-TTC-AG	23	53
	GSP2B	CAT-TTG-CGG-CGA-TTT-GTT-GTG	21	58.6
	PVB	TTG-GGT-TAT-TGG-GGG-ACT-CAT-TTT	25	58.6
<i>dsr-E</i>	GSP E	GCT-ACC-GCC-TTA-TCT-GTT-GCA-GCG-G	25	62.6
	GSP1E	TGG-CGT-TGT-ATC-TAC-TGC-TTT-ATT	24	52
	GSP2E	GTG-TCG-CTG-GCG-TTG-TGG-CTA-C	22	61.4
	PVE	CAG-CCG-GTA-TTT-TTG-CTT-TGA-TGA-TG	26	61.5
<i>lev-S</i>	GSP LS	CTG-ACT-AGA-CGC-ATC-ATT-TAC-TTT-TG	26	53.6
	GSP1LS	TGG-TTT-CAG-CTT-TTA-TTG-CCT-CAT-CCT	27	61.2
	GSP2LS	TCG-ATT-CGG-TCG-CGC-TAG-ATG-TTG-TA	26	64.6
	PVLS	CTA-GCG-CGA-CCG-AAT-CGA-GTA-TTT-CC	26	63.7

* El valor de la Tm se obtuvo a partir del programa DANSTAR (PrimerSelect)

6.6 Síntesis y amplificación de ADNc

En todos los casos se utilizó el Sistema para Amplificación Rápida de Extremos 5' de ADNc (5'-RACE, Invitrogen), en la Figura 6.1 se muestra el diagrama general para este protocolo. Es necesario establecer la nomenclatura de los cebadores utilizados, debido a que para cada gene se diseñó:

- Un cebador específico para la síntesis de ADNc, el cual se localizó a una distancia mínima de 300 pb, y un máximo de 700 pb, el cual se identificó como **GSP**.
- Un cebador para la amplificación del ADNc, el cual se denotó como **GSP1** y se localizó justo río abajo o dentro de la secuencia del cebador GSP. El cebador **AAP**, homologo a la secuencia de Citocinas adicionadas al extremo 3', se utilizó como cebador *directo*.
- Un cebador anidado para obtener un producto de amplificación más específico, el cual se nombró como **GSP2**. Este cebador se utilizó junto con los cebadores **AUAP** o **AAP**.
- Un cebador adicional al protocolo 5' RACE para la verificación de síntesis de ADNc, el cual se nombró como **PV**, y se localizó justo río arriba de la secuencia del primer codon de inicio. Junto con el cebador PV se utilizó el cebador GSP1 o GSP2.

Para nombrar el cebador que se utilizó en cada gen, simplemente se añadió la letra del gene al cual se alinearía, las secuencias de los cebadores diseñados se muestran en la Tabla 6.3. Cabe señalar que los cebadores AAP y AUAP forman parte del sistema 5'RACE.

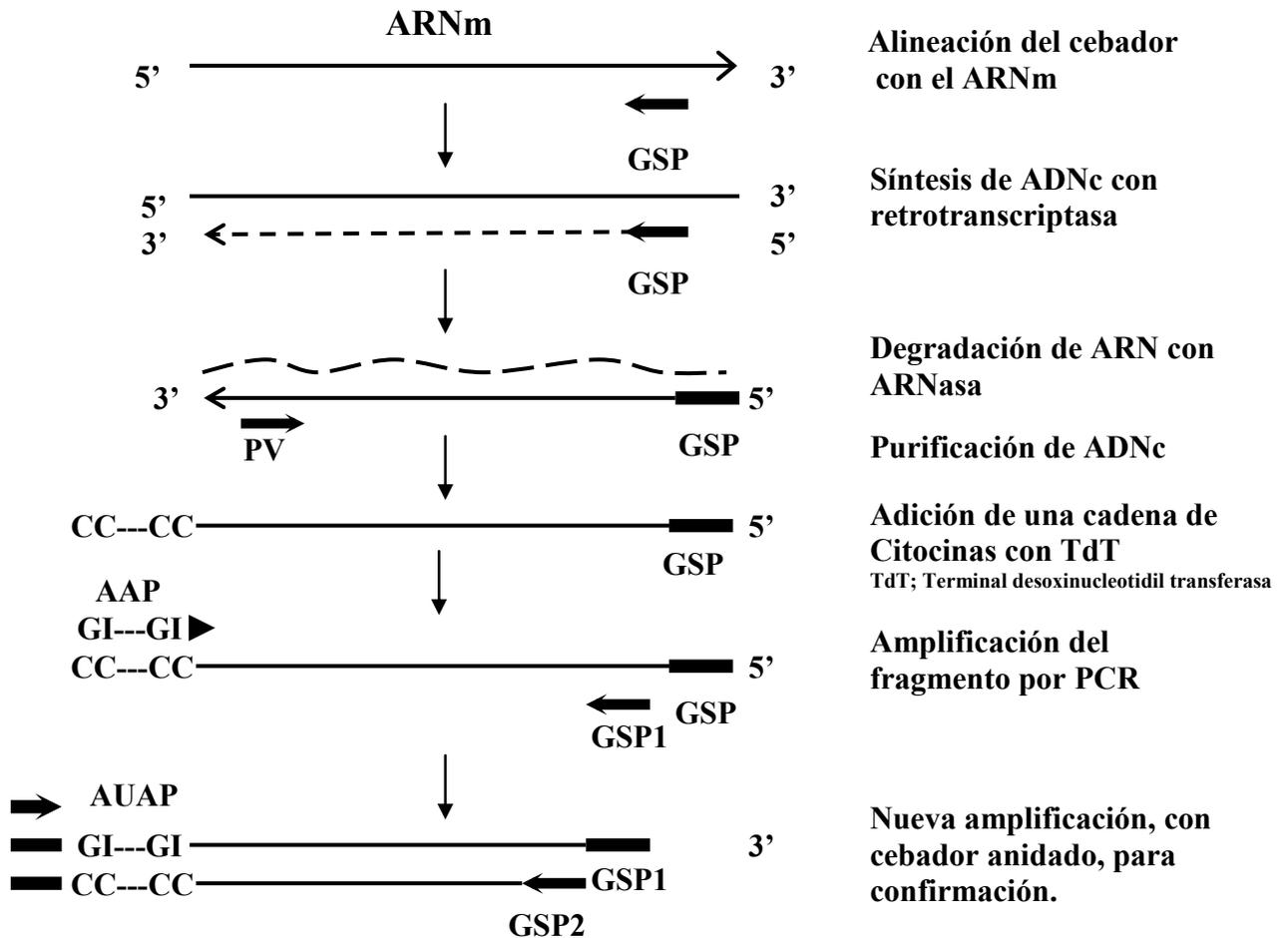


Figura 6.1
Diagrama general para la Amplificación Rápida de
Extremos 5' de ADNc (5'-RACE, Invitrogen)

6.7 Condiciones de PCR

Todas las reacciones se llevaron a cabo utilizando 2.5 U de Taq (Platinum, Invitrogen). En el programa de amplificación sólo se mantuvo constante: el ciclo inicial de desnaturalización de 94°C por 2 min, la temperatura de desnaturalización de las cadenas de ADN en cada ciclo, 94°C y la temperatura óptima de la Taq, 72°C. La temperatura de hibridación y tiempo de extensión de la polimerasa se modificaron para la amplificación de ADNc de cada gene estudiado, las condiciones finales utilizadas se detallan en la Tabla 6.4.

Tabla 6.4. Condiciones de PCR utilizadas

Gene	<i>asr</i>				<i>dsr-P</i>				<i>dsr-T</i>			
Reacción	Extension 5'		Verificación de ADNc		Extension 5'		Verificación de ADNc		Extension 5'		Verificación de ADNc	
MgCl₂ (mM)	1.5		1.5		1.5		1.5		1.5		1.5	
dNTPs (μM)	200		200		200		200		200		200	
Cebador (nM)	GSP2 _{asr}	200	GSP1 _{asr}	400	GSP2 _P	200	GSP2 _P	300	GSP2 _T	200	GSP2 _T	400
	AUAP	200	PV _{asr}	400	AUAP	200	PVP	300	AAP	200	PVT	400
No. de Ciclos	35		40		35		38		35		40	
Hibridación	51°C / 30 s		45°C / 45 s		48°C / 30 s		45°C / 40s		54°C / 30 s		51°C / 40s	
Periodo de extensión	72°C / 1 min		72°C / 50 s		72°C / 1 min		72°C / 45s		72°C / 50°C		72°C / 45s	
Extensión final	3 min		5 min		3 min		5 min		4 min		5 min	

Tabla 6.4 (continuación). Condiciones de PCR utilizadas

Gene	<i>dsr-C</i>				<i>dsr-B</i>				<i>lev-S</i>			
Componente	Extension 5'		Verificación de ADNc		Extension 5'		Verificación de ADNc		Extension 5'		Verificación de ADNc	
MgCl₂ (mM)	1.5		1.5		1.5		1.5		1.5		1.5	
dNTPs (μM)	200		200		200		240		240		240	
Cebador (nM)	GSP2 _C	200	GSP1 _C	400	GSP2 _B	300	GSP2 _B	400	GSP2 _{LS}	300	GSP2 _{LS}	300
	AAP	200	PVC	400	AAP	300	PVB	400	AAP	300	PVLS	300
No. de Ciclos	38		40		38		40		35		35	
Hibridación	55°C / 30 s		45°C / 45 s		47°C / 35 s		47°C / 40s		55°C / 35 s		54°C / 35 s	
Periodo de extensión	72°C / 1 min		72°C / 50 s		72°C / 45 s		72°C / 50 s		72°C / 50°C		72°C / 50 s	
Extensión final	4 min		5 min		5 min		5 min		5 min		5 min	

6.8 Secuenciación de los amplicones

Los amplicones obtenidos se purificaron por columna (ROCHE) y se enviaron a secuenciar al Departamento de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, se utilizó el equipo de Applied Biosystem modelo 3100.

7. Resultados y discusión

7.1 Cultivo de *L. mesenteroides*

Con la finalidad de establecer el tiempo de cultivo en el que se encuentra el máximo de actividad GT y así obtener la mayor cantidad del ARNm correspondiente, fue necesario caracterizar la cinética de crecimiento y la producción de la actividad total GT en las cepas de *L. mesenteroides* B-512, B-1299 y B-1355. Cabe mencionar que las cepas B-1299 y B-1355 producen actividad GT asociada a las células, mientras que la B-512 y la IBT-PQ tienen actividad extracelular exclusivamente, por lo cual en el caso de la cepa IBT-PQ se tomó como referencia la gráfica de la cepa B-512. Las tres cepas mencionadas se cultivaron en condiciones habituales de producción de DS, se tomaron alícuotas por duplicado a lo largo del tiempo de fermentación, en intervalos variables, dependiendo de la velocidad de crecimiento. Se evaluó la biomasa por Abs a 600nm, el pH, la concentración de proteína total y se cuantificó la actividad GT por aparición de reductores. Los resultados se muestran en las Figuras 7.1, 7.2 y 7.3, en donde se observa que la actividad GT en una fermentación de *L. mesenteroides* está asociada a su crecimiento, obteniéndose un máximo de actividad al final de la fase exponencial para posteriormente presentar una caída después de ese punto. En todos los casos se corroboró este comportamiento, excepto en la cepa 1355, donde la fracción insoluble presentó el máximo de actividad casi al principio de la fermentación. Posiblemente la disminución de la actividad GT soluble a partir de las cuatro horas de fermentación se debió a que al separar las células del sobrenadante, el polímero insoluble de alternana haya sido arrastrado junto con las células, lo cual provocó que al ir aumentando la cantidad de alternana producida ésta aumentara, a su vez, la masa molecular del paquete celular, con lo que se subestimó el valor real de la actividad específica referida a la biomasa. Sin embargo, se consideró que con una D.O._{600nm} de 7-8 se tendría una buena cantidad de mensajero de ambas actividades.

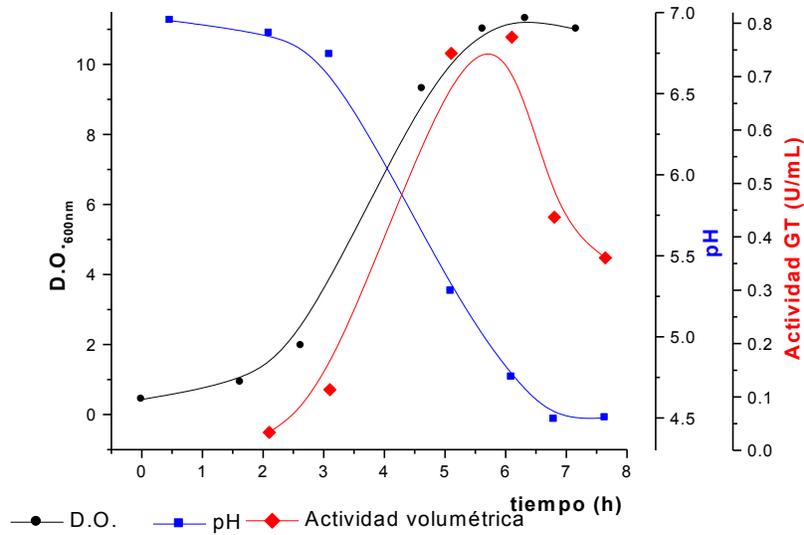


Figura 7.1
Cinética de crecimiento y producción de actividad GT en
***L. mesenteroides* B-512 en una fermentación en matraz**
 Cultivo en condiciones habituales de producción de DS
 (30°C, agitación orbital 200 rpm y 117 mM de sacarosa)

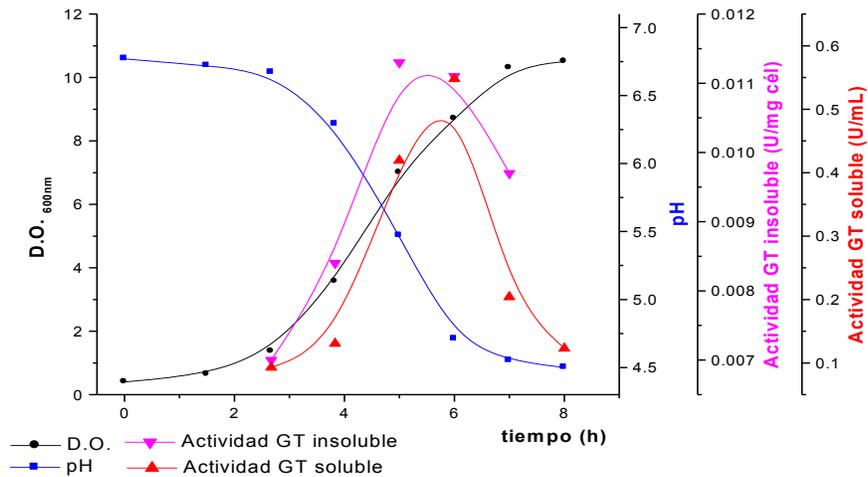


Figura 7.2
Cinética de crecimiento y producción de actividad GT
en la fracción soluble e insoluble de *L. mesenteroides* B-2199
en una fermentación en matraz.
 Cultivo en condiciones habituales de producción de DS
 (30°C, agitación orbital 200 rpm y 117 mM de sacarosa)

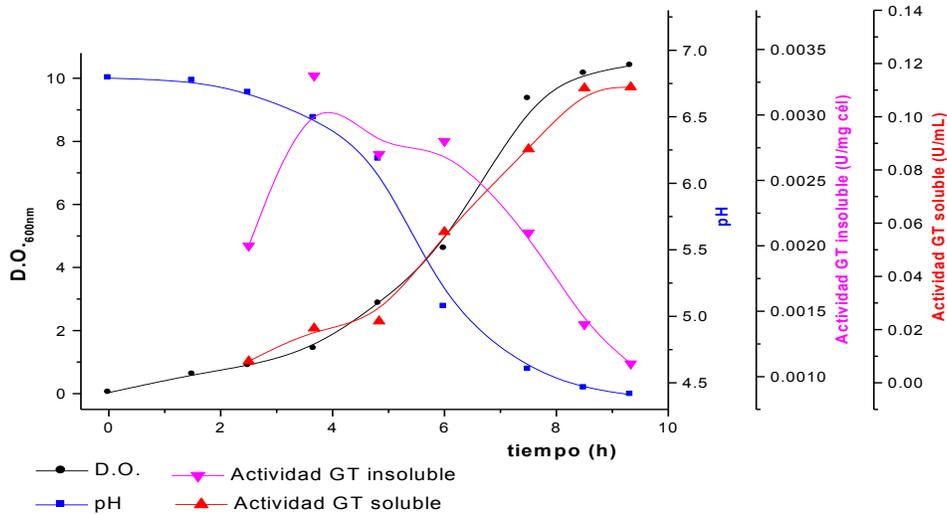


Figura 7.3
Cinética de crecimiento y producción de actividad GT
en la fracción soluble e insoluble de *L. mesenteroides*
B-1355 en una fermentación
 Cultivo en condiciones habituales de producción de DS
 (30°C, agitación orbital 200 rpm y 117 mM de sacarosa)

7.2 Diseño de los cebadores para la síntesis de ADNc y reacción de 5'RACE

Para determinar el inicio de la transcripción a través del sistema 5'RACE, se requiere sintetizar en primer lugar el ADNc a partir de la preparación de ARN total obtenida, donde habrá una mezcla de todos los mensajeros presentes en el momento de la extracción. En el caso de las cepas que producen más de una GT, se requirió diseñar oligonucleótidos específicos para cada uno de los genes presentes y así poder sintetizar el ADNc del mensajero de solo uno de los genes a la vez.

Durante el diseño de los cebadores se presentaron diversos obstáculos para encontrar aquellos que sólo se alinearán específicamente al gene que se deseaba amplificar. Con el fin de obtener los cebadores que presentaran las características necesarias para la obtención del cDNA a partir de los ARNm de interés, para cada gene se seleccionó una región de 600 pb río arriba del primer codon de inicio de la traducción (ATG), debido a que el sistema 5'RACE requiere de la síntesis de ADNc de un tamaño mínimo de 300 pb. Mediante el programa *ClustalW* se realizaron los alineamientos entre los genes de DS pertenecientes a una misma cepa, de tal manera que se

localizaron aquellas regiones en las que se presentó la menor similitud en secuencia, para de esta forma diseñar un cebador con alta especificidad para cada gene. Mediante el programa BLAST se buscó que dicho cebador no presentara varios sitios de hibridación dentro del propio gene, debido a que en varios casos cuando se identificó una posible secuencia, ésta se repetía varias veces dentro del mismo gene o en otro gene de DS en la misma cepa, por ejemplo en el gene *dsr-T* (Figura 7.4).

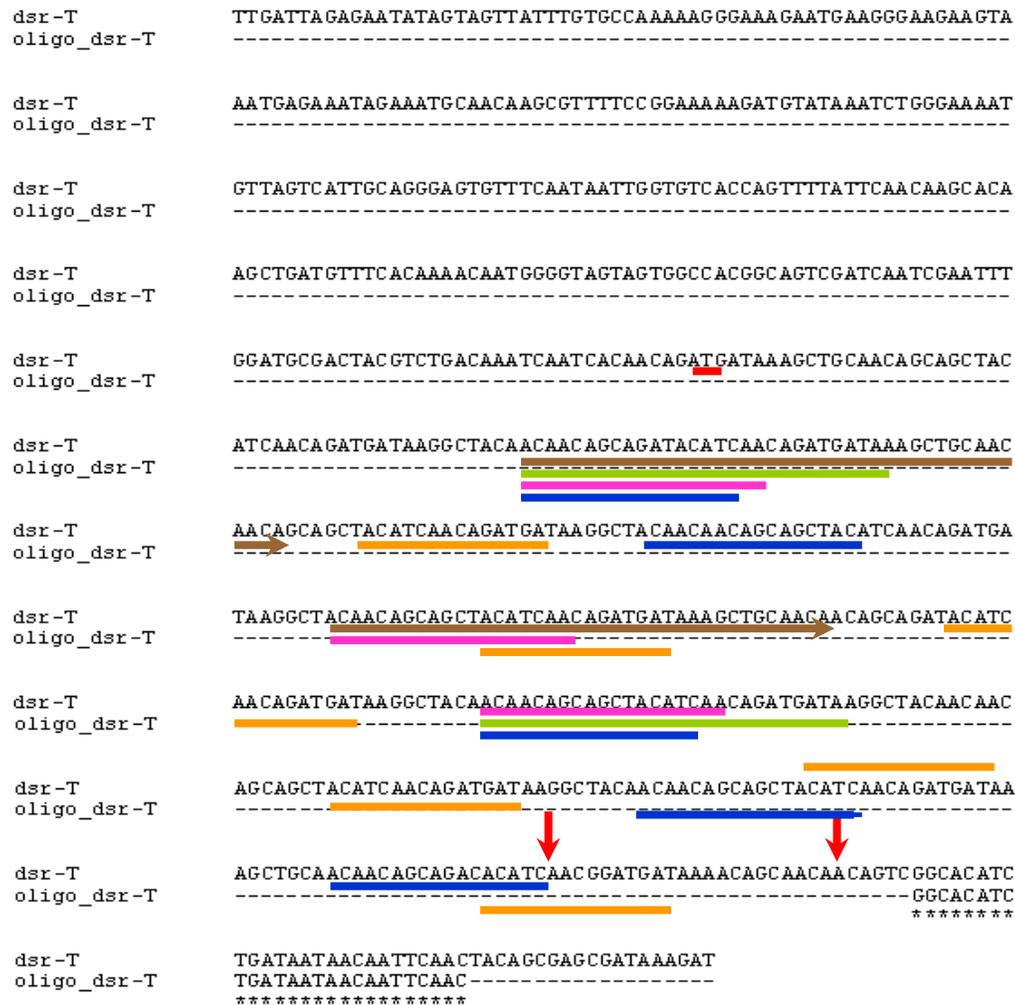


Figura 7.4
Región 5' del Gen *dsr-T*

* Indica la secuencia del cebador utilizado en la síntesis de ADNc. Las flechas rojas indican la secuencia del cebador GSP1. Las líneas de colores muestran las secuencias repetidas a lo largo de la región 5' del gen *dsr-T*

En el gen *dsr-T* de la cepa B-512 se localizaron varias secuencias repetidas dentro de la región en la que se deseaba obtener el cebador para la síntesis del ADNc. En la Figura 7.4 se observa

el gran número de secuencias repetidas encontradas en la región donde se diseñaron los cebadores específicos para la síntesis del ADNc. Cabe mencionar que dicha región corresponde a la secuencia que codifica para el amino terminal de esta enzima. Dichas secuencias varían en cuando al tamaño sin encontrarse aún, algún patrón que defina el motivo de tales repeticiones, ya que cuando se realiza este análisis en el producto del gen traducido, también se encuentran secuencias repetidas de aminoácidos, que corresponden a la región N-terminal donde se localiza el péptido señal y la región variable de todas las DS.

Una vez que se seleccionaron los cebadores para la síntesis de ADNc se procedió a diseñar los cebadores para las reacciones de PCR, para lo cual se trabajó con el programa DNASTAR. En este caso sólo se tomó en cuenta la secuencia del gene de interés y se seleccionaron aquellos oligonucleótidos que no presentaran dímeros entre ellos y mostraran el mayor rendimiento en el ensayo *in silico* de PCR.

7.3 Extracción y evaluación del ARN total

Para todas las cepas, la extracción del RNA total se realizó a la mitad de la fase exponencial de crecimiento (D.O._{600nm} 8-10), debido a que se ha reportado (Quirasco *et al.*, 1999) que es ahí donde se encuentra la mayor producción de RNA mensajero que codifica a la DS en la cepa B-512. El ARN total se extrajo a partir de $\sim 3.7 \times 10^8$, 5.7×10^8 , 3.3×10^8 y 5.6×10^8 células de las cepas B-512, IBT-PQ, B-1299 y B-1355 respectivamente. Los resultados para la extracción de RNA total se muestran en la Figura 8.5 y 8.6, donde se observa la alta calidad y concentración obtenida del RNA total en las cuatro cepas de *L. mesenteroides*. La calidad del ARN ribosomal indica la del ARNm, el cual no se observa por estar en una menor concentración. En la Figura 7.5 se muestra el resultado para una electroforesis en condiciones no desnaturizantes y en la Figura 7-6 para una en condiciones desnaturizantes, en ambos ensayos se puede observar muy buena definición de las bandas de los RNAs ribosomales 23S y 16S, con un peso aproximado de 3 y 1.5 kb respectivamente.

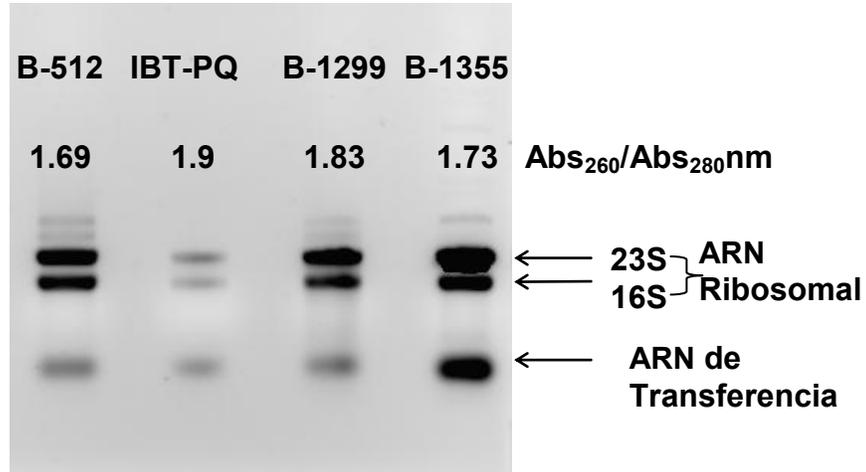


Figura 7.5
Electroforesis del RNA extraído en cepas de *L. mesenteroides*
 Gel de agarosa al 0.9% y tinción con bromuro de Etidio

La electroforesis en condiciones desnaturalizantes se realizó para eliminar o disminuir las bandas de menor migración que se observan arriba de las bandas correspondientes a los ARNr 23S de la Figura 15, sin embargo, las bandas aparecieron nuevamente, por lo cual se podría tratar de estructuras secundarias de ARN que no lograron ser desnaturalizadas en su totalidad en las condiciones realizadas. Se descartó la posibilidad de una contaminación con ADN debido a que las bandas de DNA genómico aparecen con una distancia de migración mucho menor.

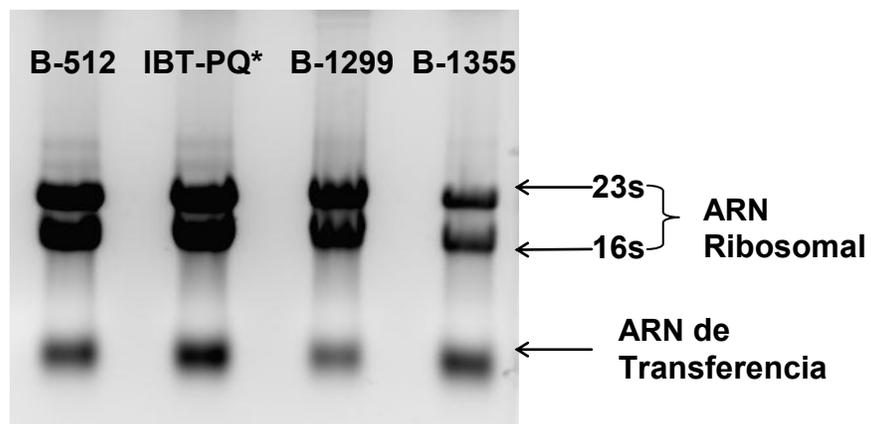


Figura 7.6
Electroforesis desnaturalizante de RNA total extraído
a partir de las cepas de *L. mesenteroides*
 Gel de agarosa al 1%. Formaldehído-formamida al 1%
 y tinción con bromuro de etidio

Para evaluar una posible contaminación del ARN obtenido con ADN genómico, se realizaron reacciones de PCR en las que se utilizaron los cebadores diseñados para la amplificación de los genes correspondiente a cada cepa, si la reacción producía amplificación alguna se consideraría como contaminación por ADN genómico en las extracciones de ARN total, los resultados en todas las reacciones fueron negativos.

Con base en los resultados anteriores, se estableció que la metodología desarrollada en este trabajo para la extracción de ARN total en cepas de *L. mesenteroides* logró ser rápida y eficiente, la cual resultará sumamente útil en estudios posteriores basados en el análisis de los transcritos de este microorganismo.

8.4 Determinación del inicio de la transcripción

8.4.1 Gene *asr*

Se determinó el inicio de la transcripción del gene *asr*, en la Figura 7.7 se muestran los productos de PCR para lograr la amplificación del extremo 5' de este gene. Para llevar a cabo esta determinación, se realizó un PCR con los cebadores AAP y GSP1*asr* (carril 1), en la que se obtuvo poca especificidad en el producto de reacción, a pesar de esto sí se observó una banda con un tamaño cercano al del producto esperado entre estos dos cebadores (~500pb). Se prosiguió a aislar las bandas de ~500 y 350pb y se realizó la reamplificación de cada una por separado utilizando los mismos cebadores. La amplificación con mayor rendimiento se obtuvo a partir de la banda de ~500 pb (carril 2), por lo cual se decidió purificar dicha banda para mandar secuenciar. Sin embargo, después de purificar la reacción de PCR, se observó nuevamente la aparición de un fragmento de ~300pb (carril 4). Debido a esto se realizó un PCR con el cebador anidado GSP2*asr* (carril 5), del cual se obtuvo dos productos, pero la banda con mayor rendimiento es la que coincidió con el producto esperado. Se prosiguió a purificar dicha banda a partir del gel, se reamplificó y se mandó secuenciar. Finalmente en el Carril 7 se observa el producto de PCR para la verificación del ADNc el cual coincide perfectamente con el tamaño esperado. Cabe resaltar que dicho producto se obtuvo en el primer ensayo realizado y además sólo generó un producto de amplificación.

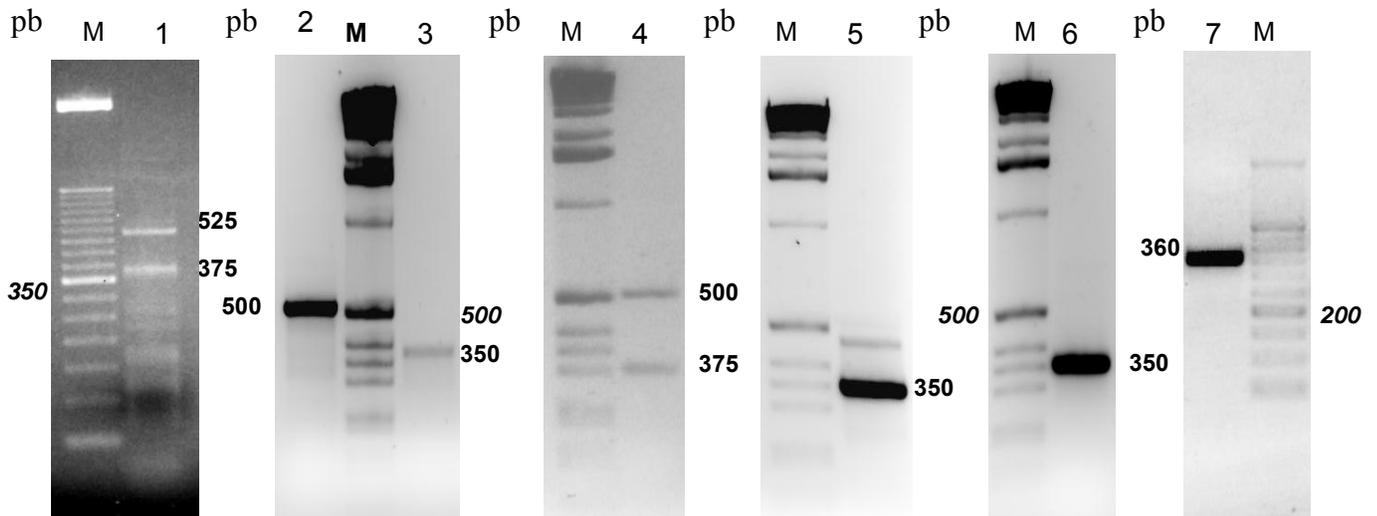


Figura 7.7

Productos de PCR obtenidos para la amplificación de ADNc sintetizado a partir del ARNm del gene *asr*

Carriles M, Marcador de Peso Molecular. Carriles 1, 2, 3 y 4, amplificación con cebadores AAP y GSP1asr. Carriles 5 y 6, amplificación con cebadores AUAP y GSP2asr. Carril 7, amplificación con cebadores GSP1asr y PVasr. Electroforesis en geles de agarosa al 2.5 % y tinción con bromuro de etidio

Con la secuencia obtenida, la cual se muestra en el Anexo (Figura asr), se logró identificar el inicio de la transcripción del gene *asr*. En la Figura 7.8 se muestra el extremo 5' del gene *asr*, se determinó un residuo de G (el nucleótido +1), el cual se encontró a 58 pb río arriba (RAR) del primer codon de inicio. Hacia arriba del +1, de la base -8 a la -14, se encontró la región del -10, la cual sólo difiere en una sola base de la secuencia consenso en los procariontas.

Para establecer la región del -35 se contaron exactamente 17pb RAR de la primera base del -10, debido a que esta distancia corresponde a lo observado en los promotores procariontas, por ejemplo en *E. coli* (Malhotra, *et al.*, 1996), *B. subtilis* (Helmann, 1995) y *L. lactis* (Jensen and Hammer, 1998). Se encontró que esta secuencia es muy diferente tanto a la consenso del -35 en los procariontas, como al -35 del gene *dsr-S*. Sin embargo, la secuencia establecida como -35 posee mayor similitud con el consenso del -10, lo cual es una característica que no se ha observado en otras secuencias promotoras.

de ~520 pb, la cual correspondería al producto de amplificación mínimo esperado de 427 pb. Se prosiguió a aislar la banda de ~500, se reamplificó con los mismos cebadores (carril 2). De esta reacción sólo se produjo un amplicon y con muy buen rendimiento, por lo cual se decidió purificarlo para secuenciar, sin embargo la secuenciación no fue exitosa (no hubo resolución suficiente), el resultado se muestra en la Figura dsr-P del Anexo. Debido a esto, a partir de esta banda se realizó un PCR con el cebador anidado GSP2P (carril 3). Con dicha reacción se logró obtener un amplicon que coincidió con el tamaño esperado, se prosiguió a purificar dicha banda, se reamplificó (carril 4) y se mandó secuenciar. En el carril 5 se observa el producto de PCR para la verificación de la síntesis de ADNc.

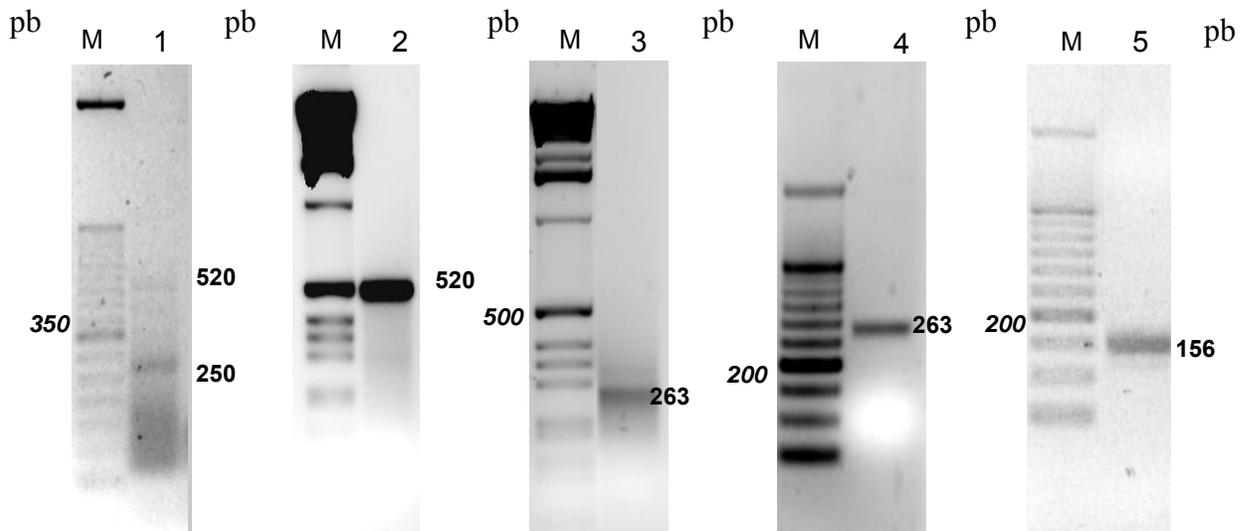


Figura 7.9

Productos de PCR obtenidos para la amplificación de ADNc sintetizado a partir del ARNm del gene *dsr-P*

Carriles M, Marcador de Peso Molecular. Carriles 1 y 2, amplificación con cebadores AAP y GSP1P. Carriles 3 y 4, amplificación con cebadores AUAP y GSP2P. Carril 5, amplificación con cebadores GSP2P y PVP. Electroforesis en geles de agarosa al 2.5 % y tinción con bromuro de etidio

Con la secuencia obtenida (Anexo, Figura dsr-P2) se logró identificar el inicio de la transcripción del gene *dsr-P*. En la Figura 7.10 se muestra el extremo 5' del gene *dsr-P*, se determinó el nucleótido +1, el cual se encontró a 68 pb río arriba del primer codón de inicio. Río arriba del +1, de la base -11 a la -17 se encuentra la región del -10, la cual difiere en una sola base, Guanina por Timina, de la secuencia consenso en los procariotas.

Para establecer la región -35 se contó exactamente 17pb RAr después de la última base de la caja -10. El -35 establecido posee una sola base que coincide con el consenso del -35 de los procariotas.

AAATATTTGTTTCATTATATATTTAAAAGAGTTAATTTTAATGATTAACGTTTGT

AAAAACAATTGCTGACAAAGTATTCTTAGTCGCAAATGTT TATGATCTCACAA
-35 -10

GCACAAATAACCATTTTACTCAAAGAATAGTCACTTATGTCAGAGAGGGAAAGA
└─┬─┘ +1 +1-68pb-ATG

ATGAAG GGGAAGAAGTAAAT TGAGAAATAGAAATGTAACAAGCGTTTTCCGAAAA
SD M

AGATGTATAAATCTGGGAAAATGTTAGTCATTGCAGGAAGTGTTTCGATAATTG...

Figura 7.10
Secuencia del extremo 5' del gene *dsr-P*
 SG, Secuencia Shine-Delgarno

Por otro lado, el amplicon de menor tamaño (~250 pb) y de mayor intensidad en el carril 1 de la Figura 7.9, que no se analizó, sugiere que la cepa IBT-PQ tiene más de un gene de DS, en su cromosoma y que éste podría expresarse más eficientemente y por tal motivo se logre una mayor amplificación. Dicha hipótesis se fundamenta en el hecho de que el cebador utilizado para la síntesis de ADNc del gene *dsr-P* es el mismo que se utilizó para el gene *dsr-T* de la cepa B-512, ya que se encontró que el cebador para la síntesis del ADNc del gene *dsr-T* podía alinearse también al gene *dsr-P*. Este mostraba las características de especificidad requerida, ya que sólo no coincidía en 3 bases con la secuencia blanco (Figura 7.11). Se propone que dicho cebador logró amplificar el extremo 5' del gene *dsr-P* y posiblemente el de algún gene que codifique para otra DS dentro de esta cepa. También hay que considerar que en las cepas B-1299, B-1355 y B-512 existe más de un gene que codifica para DS, mientras que en la cepa IBT-PQ sólo se ha identificado un gene, de tal forma que resultaría interesante investigar si esta cepa posee más de un gene que codifique para la síntesis de DS.

```

dsr-P_cds      AATAAGGCTACAACAACAGCCGATACATCAACGAACAATAAGGCTGCAACAACAGCCGAC
oligo_dsr-T    -----GGC
                                     * *

dsr-P_cds      ACATCTGATAATAATAATTTCAGCTACGACAAGCGATAAAGATGTGAGCTCATTGGCACAA
oligo_dsr-T    ACATCTGATAATAACAATTCAAC-----
                ***** *

```

Figura 7.11
Alineamiento entre el cebador GSPT y el gene *dsr-P*

7.4.3 Gene *dsr-T*

En la Figura 7.12 se muestran los productos de PCR para lograr la amplificación del extremo 5' del gene *dsr-T*. Se realizó una reacción PCR con los cebadores AAP y GSP1T (carril 1), en la cual se obtuvo poca especificidad en el producto de reacción, sin embargo se observaron bandas que podían coincidir con el tamaño del producto esperado de ~500 pb. A partir de esta reacción se llevó a cabo una reamplificación con los cebadores AAP y GSP2T, en la cual se logró obtener un producto altamente específico y del tamaño esperado (Carril 2), se purificó y se mandó secuenciar. En el carril 3 se observa el producto de PCR para la verificación del ADNc, el cual coincide perfectamente con el tamaño esperado.

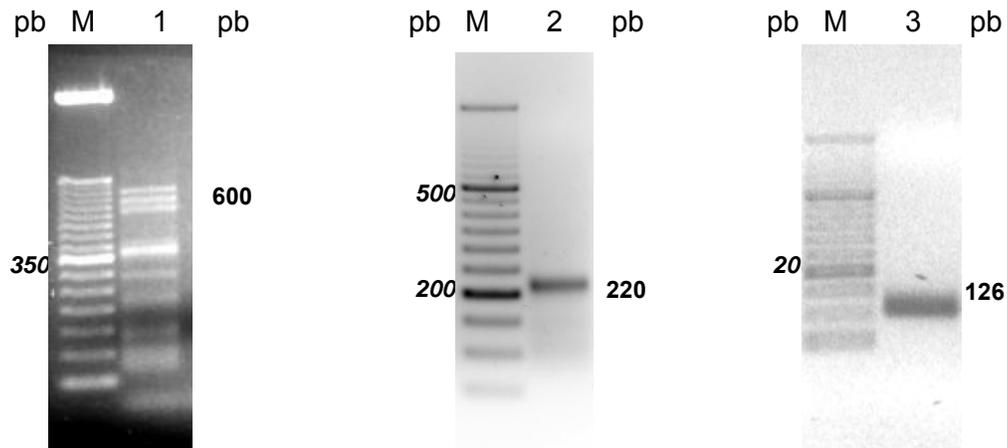


Figura 7.12
Productos de PCR obtenidos a para la amplificación del ADNc sintetizado a partir del ARNm del gene *dsr-T*

Carriles M, Marcador de Peso Molecular. Carril 1, amplificación con cebadores AAP y GSP1T. Carril 2, amplificación con cebadores AAP y GSP2T. Carril 3, amplificación con cebadores PVT y GSP2T. Geles de agarosa al 2.5 % y tinción con bromuro de etidio

Con la secuencia obtenida (Anexo, Figura dsr-T) se logró identificar el inicio de la transcripción del gene *dsr-T*. En la Figura 7.13 se muestra el extremo 5' del gene *dsr-T*, se determinó el nucleótido +1, el cual se encontró a 48 pb RAr del primer codón de inicio. De la base -7 a la -12 se encuentra la región del -10, la cual difiere en dos pb de la secuencia consenso en los procariotas, Adenina por Timina y Guanina por Timina. En este caso la región -10 se localizó exactamente a 7 pb RAr del +1, dicha distancia es la observada en la mayoría de los promotores procariotas (Jensen and Hammer, 1998, Malhotra, *et al.*, 1996 y Helmann, 1995). La región del -35 nuevamente se estableció a 17pb RAr después de la última base del -10.

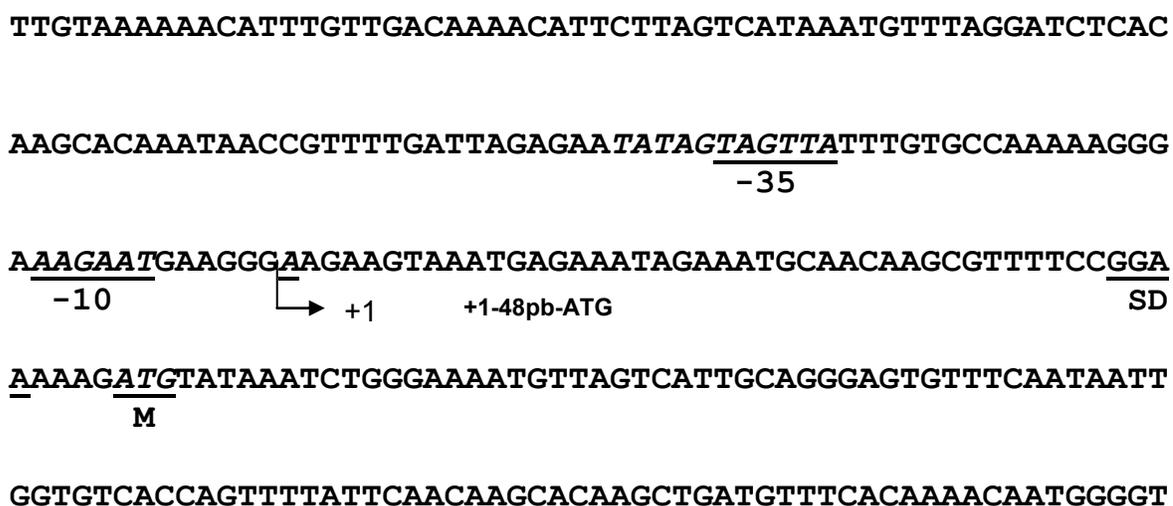


Figura 7.13
Secuencia del extremo 5' del gene *dsr-T*

Existe la duda de que el gene *dsr-T* se transcriba, Funane *et al.* en el 2000 reportaron la existencia de dicho gen, sin embargo, no se ha encontrado la proteína correspondiente a ese gene. Con base en los resultados experimentales obtenidos se corrobora que el gene *dsr-T* sí se transcribe, pero proponemos que no se traduce, debido a que el análisis realizado para identificar la posible secuencia señal de unión a ribosoma mostró que ésta se localiza a 6 pb RAr del primer codón de inicio de la traducción. Por lo tanto se encuentra a una distancia tal que no corresponde al óptimo establecido (8-10pb) para el comienzo de la traducción (Ma *et al.* 2002), en consecuencia el proceso de inicio de la traducción podría ser ineficiente, de tal manera que la cantidad de proteína producida es indetectable por los métodos de análisis de GT utilizados hasta el momento. El análisis general de las secuencias SD propuestas para GT se discutirá más

adelante. También habría que decir que otra posible explicación a que no se haya identificado a la proteína activa es que el gene posee una mutación que provoca la pérdida del sitio activo de la enzima, por lo cual no se ha podido detectar la actividad correspondiente a este gene (Funane *et al.* 2000).

Por otra parte, Funane *et al.* realizaron un análisis del tipo Northern, en el cual se observó, por densitometría, que el ARNm del gene *dsr-T* se produce un 80% menos con respecto al gene *dsr-S*, lo cual se podría explicar con base en la región promotora de ambos genes, ya que el gene *dsr-S* posee un -10 canónico, mientras que el gene *dsr-T* difiere en dos bases, lo cual puede ocasionar una menor eficiencia en el inicio de la transcripción de este gene.

De acuerdo a lo anteriormente expuesto el que no se detecte la actividad correspondiente en este gene puede deberse a: 1) La secuencia en la región promotora -10 difiere de la consenso en las GT y puede ocasionar un bajo nivel de transcripción del gene. 2) La secuencia señal de unión a ribosoma se localiza a una distancia no óptima para el comienzo de la traducción. 3) El gene *dsr-T* posee una mutación que provoca que la proteína sintetizada truncada en el sitio activo y por lo tanto no se detecte la actividad correspondiente a este gene.

Para obtener mayor información acerca de la expresión de este gene, resultaría interesante cuantificar la expresión de mensajeros en ambos genes, para establecer claramente el porcentaje de expresión de cada uno y de esta forma poder relacionar la estructura de la región promotora con el nivel de expresión respectivo.

7.4.4 Gene *dsr-C*

En la Figura 7.14 se muestran los productos de PCR para lograr la amplificación del extremo 5' del gene *dsr-C*. Se realizó un PCR con los cebadores AAP y GSP1C (carril 1), en la cual se obtuvo poca especificidad en el producto de reacción y no se logró observar un producto que coincidiera con el tamaño esperado (~330pb), a pesar de ello se realizó una reacción de PCR con el cebador anidado GSP2C y el cebador AAP. Se logró aumentar la especificidad de la reacción, ya que se encontró en mayor concentración el amplicón del tamaño esperado (carril 2), se purificó la banda de interés, se reamplificó (carril 3) y se mandó secuenciar. En el carril 4 se

observa el producto de PCR para la verificación del ADNc, el cual coincide con el tamaño esperado.

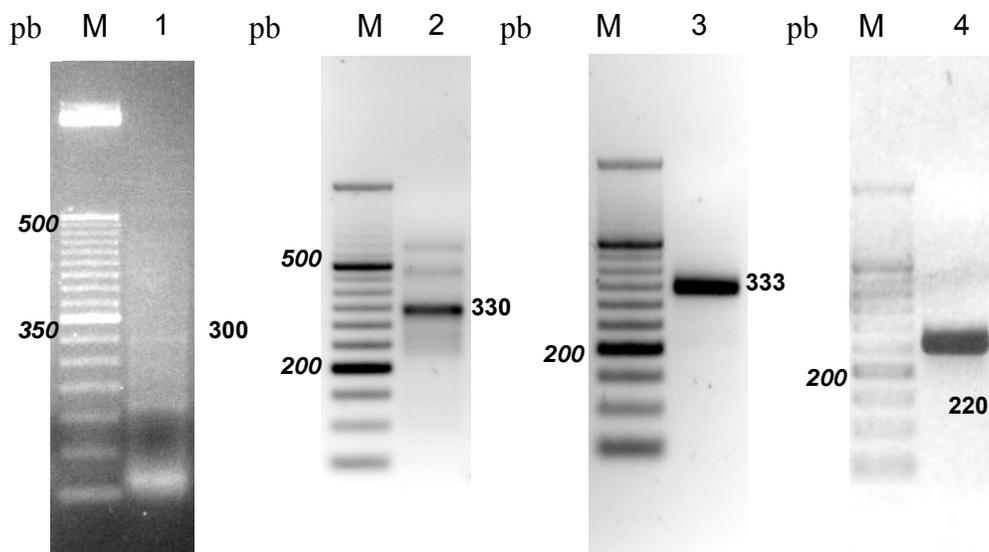


Figura 7.14
Productos de PCR obtenidos para la amplificación del ADNc sintetizado a partir del ARNm del gene *dsr-C*
Carriles M, Marcador de Peso Molecular. Carril 1, amplificación con cebadores AAP y GSP1C. Carriles 2 y 3, amplificación con cebadores AAP y GSP2C. Carril 4, amplificación con cebadores GSP1C y PVC. Geles de agarosa al 2.5 % y tinción con bromuro de etidio.

Cuando se reportó el gen *dsr-C* se propuso que éste no se expresaba debido a que el gene no poseía una región promotora parecida al consenso de los procariotas y por tanto no se iniciaba el proceso de transcripción (Argüello-Morales, 2000^b). Argüello-Morales realizó la búsqueda de la región promotora del gene *dsr-C* a través de un análisis *in silico*, y al no tener un +1 experimental, el análisis arrojó una región promotora inexacta. De ahí la importancia de determinar experimentalmente el inicio de la transcripción en los genes en estudio, para así poder conocer la región promotora real.

Con la secuencia obtenida (Anexo, Figura *dsr-C*) se logró identificar el inicio de la transcripción del gene *dsr-C* que se muestra en la Figura 8.15. De acuerdo con estos resultados se concluye que el gene *dsr-C* de la cepa B-1355 sí se transcribe, ya que se pudo sintetizar ADNc a partir del mensajero (Figura 7.14, carril 4). El inicio de la transcripción (nucleótido +1) obtenido de este

trabajo, se encontró a 121pb RAr del primer codón de inicio de la traducción, de acuerdo al marco de lectura abierto reportado (Agüello-Morales, 2000^b).

Por otra parte el gene *dsr-B* de la cepa B-1299 posee un 99.9% de identidad con el gene *dsr-C* (cepa B-1355). En la Figura 7.15 se muestra también el codón hipotético de inicio del *dsr-B*, reportado por Monchois *et al.* 1998, el cual se ubica a 86 pb RAr del codón de inicio reportado para el *dsr-C* por Argüello-Morales. Se hace notar que no coinciden los ORFs de ambos genes, y hay que recordar que la proteína producto del gene *dsr-C* no se ha encontrado, mientras que la correspondiente al gene *dsr-B* sí.



Figura 7.15
Secuencia del extremo 5' del gene *dsr-C*

La posible explicación a esto sería la siguiente: si se compara el ORF reportado para el gene *dsr-B* y el del gene *dsr-C*, la secuencia en el gene *dsr-C* presenta una delección de un nucleótido justo después del segundo codón con respecto al gene *dsr-B* (ver Figura 7.17), dicha pérdida provoca la formación de un codón de paro de la traducción. Por lo cual se propone que el gene *dsr-C* si se transcribe y comienza la traducción, pero la presencia de un codón de paro detiene la síntesis de la proteína en el tercer aminoácido. Además, la búsqueda de la señal Shine-Delgarno a partir del ORF reportado por Agüello-Morales no muestra ninguna posible señal de unión a

ribosoma, mientras que a partir ORF reportado por Monchois para el gene *dsr-B*, trasladado al gene *dsr-C* sí muestra una clara señal de unión a ribosoma. De esta manera se explica por que si se encontró el gene pero no se logró obtener la proteína correspondiente. Como resultado de este análisis, se concluye también que el ORF reportado para el gene *dsr-C* es incorrecto.

De acuerdo al inicio de transcripción determinado en este trabajo, la región del -10 se estableció de la base -7 a la -12, la cual es canónica. Inesperadamente, la secuencia que se estableció como la región -35 es muy similar a la secuencia consenso del -10, excepto por una base, Guanina por Timina, y además a una base RAr se encuentra los nucleótidos TG, motivo característico del EMDE. Con base en esta observación, se propone que el inicio de la transcripción en este gene esta determinado por la región -10, ya que ésta es canónica y se encuentra localizada a distancia óptima (7pb) con respecto al +1 (Harley and Reynolds, 1987), y debido a que la región -35 posee una secuencia alejada del consenso.

7.4.5 Gene *dsr-B*

Se determinó el inicio de la transcripción del gen *dsr-B* de manera muy eficiente, ya que sólo se requirió un ensayo para lograr tanto la amplificación del extremo 5' del gene *dsr-B* (carril 1), como la confirmación de síntesis de ADNc (carril 2). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 7.16.

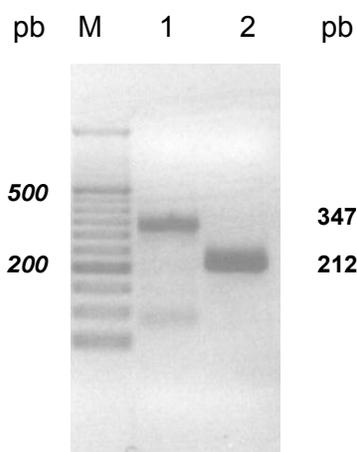


Figura 87.16.

Productos de PCR obtenidos para la amplificación del ADNc sintetizado a partir del ARNm del gene *dsr-B*

Carril M, Marcador de Peso Molecular. Carril 1, amplificación con cebadores AAP y GSP2B. Carril 2, amplificación con cebadores PVB y GSP2B. Gel de agarosa al 2.5 % y tinción con bromuro de etidio

El análisis de la secuencia obtenida (Anexo, Figura dsr-B), llevó a determinar el mismo inicio de la transcripción que para el gene *dsr-C* (Figura 7.17), como se mencionó antes, estos dos genes poseen un 99.9% de identidad. Sin embargo, en la región del -35 existe un cambio de bases con respecto al gene *dsr-C*, citosina por adenina, pero de igual forma presenta mayor similitud con el consenso del -10 en los procariotas. Nuevamente resultaría interesante cuantificar el nivel de expresión de los genes *dsr-C* y *dsr-B* para establecer si este cambió de nucleótidos en la región promotora, afecta la velocidad de inicio de transcripción y por lo tanto en su nivel de expresión.

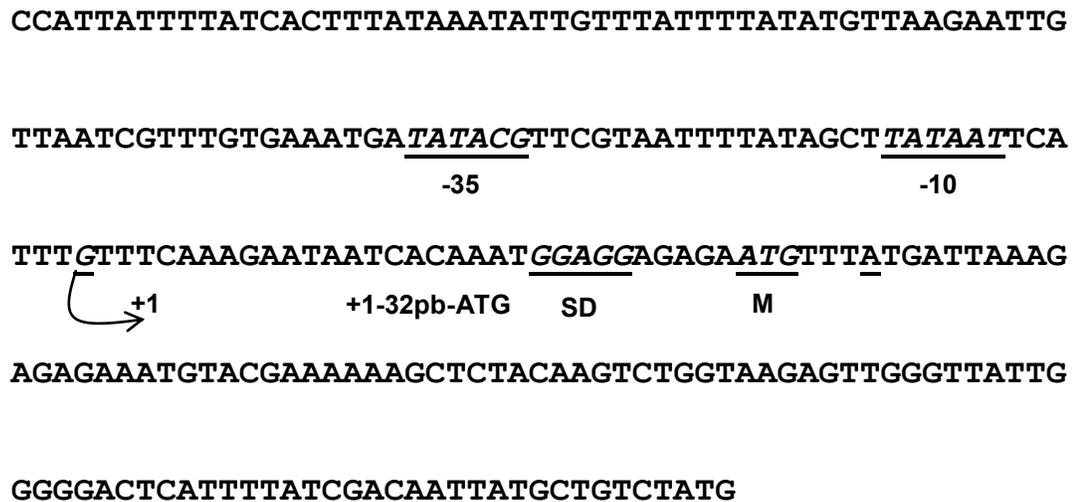


Figura 7.17. Secuencia del extremo 5' del gene *dsr-B*

7.4.6 Gene *lev-S*

Se determinó el inicio de la transcripción del gen *lev-S* los resultados obtenidos se muestran en la Figura 7.18. A pesar de que la enzima levansacarasa utiliza el mismo sustrato que las dextranacarosas (sacarosa) y sintetiza también a su vez un polisacárido, la estructura de ambas enzimas es muy diferente, por lo cual los genes también lo son. Sin embargo, como se observa en la Figura 7.19, la regulación en la expresión de dichas enzimas podría ser semejante, ya que la región establecida como -10 difiere en sólo un nucleótido del consenso en los procariotas, de manera similar a lo observado en la región -10 determinadas en este trabajo. Mientras que la región -35 establecida prácticamente no coincide con la región -35 consenso y tampoco con las regiones -35 de DS establecidas en el presente trabajo. Con el análisis de la región promotora de

este gene, se reafirma la hipótesis de que el reconocimiento de la región promotora en los genes de GT en *L. mesenteroides* por parte de un factor σ primario se centra en la región -10.

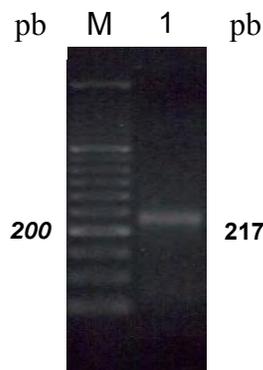


Figura 7.18. Productos de PCR obtenidos para la amplificación del ADNc sintetizado a partir del ARNm del gene *lev-S*

Carril M, Marcador de Peso Molecular. Carril 1, amplificación con cebadores AAP y GSP2LS. Gel de agarosa al 2.5 % y tinción con bromuro de etidio

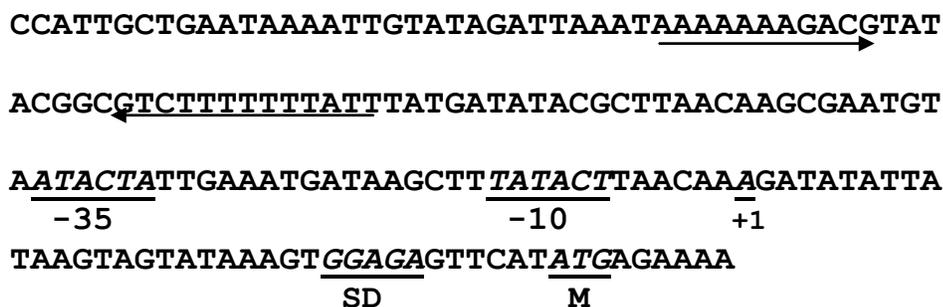


Figura 7.19. Secuencia del extremo 5' del gene *lev-S*

7.4.7 Gene *dsr-E*

Con la técnica utilizada, no se logró determinar el inicio de la transcripción en este gene, debido a que cuando se obtuvo un amplicón del tamaño esperado (Figura 7.20, carril 5) éste se secuenció, pero la secuencia obtenida no correspondió al gene en estudio. Sin embargo, cuando se realizó la reacción de PCR de confirmación de síntesis de ADNc, el resultado fue positivo y sólo produjo un amplicón (carril 2).

En la Figura 7.20, carril 1 se muestra la primera reacción en la que se obtuvo muy débilmente una banda aproximada al tamaño esperado (340pb), por lo que se procedió a purificar y reamplificar dicha banda. En los carriles 3 y 4 se muestra la obtención de sólo un amplicón con alto rendimiento, por lo cual se procedió a secuenciar dicha banda (carril 5), sin embargo, la secuencia que se obtuvo no correspondía al gene en estudio.

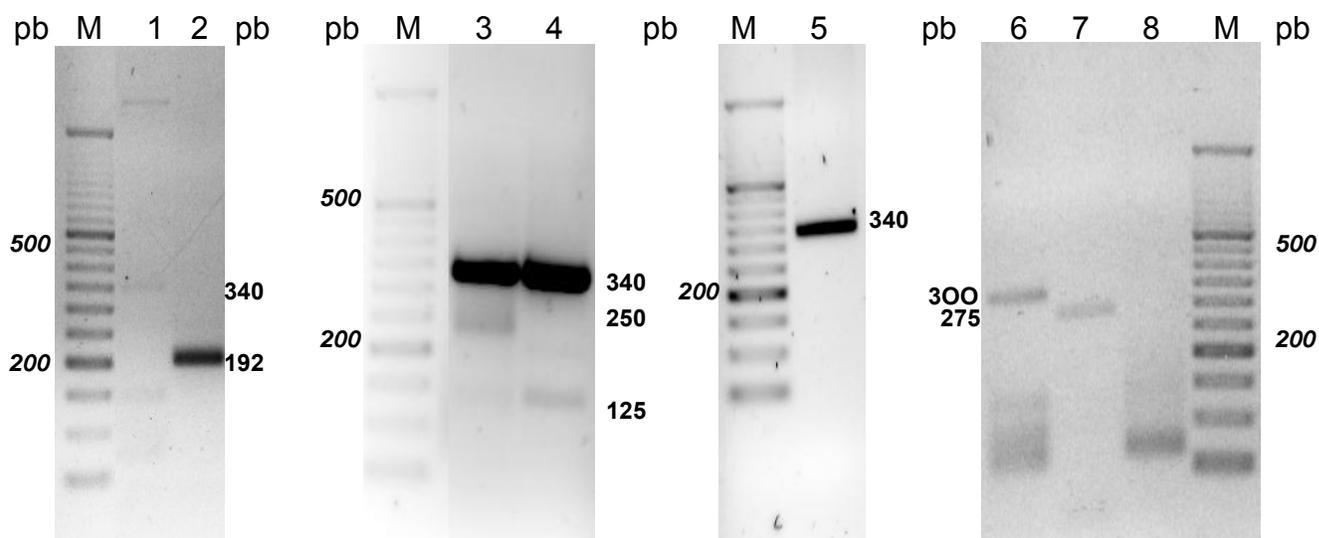


Figura 7.20

Productos de PCR obtenidos para la amplificación del ADNc sintetizado a partir del ARNm del gene *dsr-E*

Carriles M, Marcador de Peso Molecular. Carriles 1, 3, 5 y 6, amplificación con cebadores AAP y GSP2E. Carril 4, amplificación con cebadores AUAP y GSP2E. Carril 7 y 8, amplificación con cebadores AAP y GSP1E. Carril 2, amplificación con cebadores PVE y GSP2E. Geles de agarosa al 2.5 % y tinción con bromuro de etidio

En la Figura 7.21 se muestran los resultados para identificar si los amplicones obtenidos, a partir de una nueva síntesis y reamplificación de ADNc, correspondían al gene *dsr-E*. La prueba se realizó mediante un análisis de restricción, ya que el producto esperado posee un sitio de reconocimiento para la endonucleasa *HinF1*. El resultado de este ensayo mostró que el amplicón obtenido (carril 1), al mostrar un resultado negativo con la digestión de *HinF1* (carril 2), se concluyó que nuevamente no se logró obtener el producto esperado. En la misma prueba se sometió a digestión el producto de la reacción de confirmación de ADNc (Figura 7.21, Carril 4), el cual sí logró ser cortado por *HinF1*, produciendo los fragmentos de restricción esperados (Figura 7.21, carril 3). En el carril 7 se sometió a digestión una secuencia control en la que sí presentaba el sitio de reconocimiento para dicha enzima, ya que se conocía la secuencia. Con base en estos

resultados, se confirmó que si se obtuvo el ADNc del gene *dsr-E*, sin embargo la amplificación no se logró llevar a cabo en las condiciones óptimas para obtener el producto esperado.

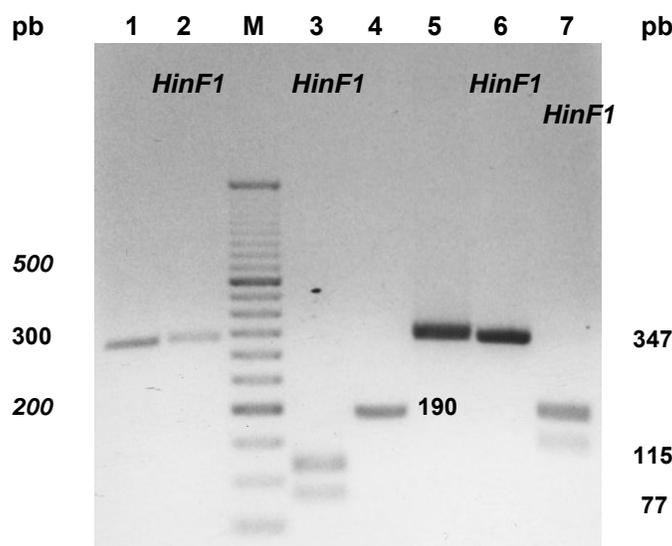


Figura 7.21
Digestión con *HinF1* de productos de PCR obtenidos para la amplificación del ADNc sintetizado a partir del ARNm del gene *dsr-E*

Carril M, Marcador de Peso Molecular. Carriles 1 y 2, amplificación con cebadores AAP y GSP2E. Carril 3, ADNc digerido. Carril 4, ADNc sin digerir -amplificación con cebadores PVE y GSP2E-. Carril 5 y 6, producto de PCR utilizando los cebadores AAP y GSP2E -secuenciado-. Carril 7, producto de PCR control. Gel de agarosa al 2.5 % y tinción con bromuro de etidio

7.4.8 Gene *dsr-A*

Finalmente, para el gene *dsr-A* tampoco se logró la determinación del inicio de la transcripción. Después de múltiples ensayos no se logró amplificar ningún producto que pudiera corresponder con el tamaño esperado, en todos los casos se ha obtenido un producto de ~75 (Figura 7.22, carriles 1, 2, 3 y 4). Sin embargo la reacción de verificación de ADNc sí logró obtener resultados positivos (carril 5), por lo que se descarta una posible falla en cuanto a la especificidad de los cebadores construidos. La falta de amplificación deseada podría radicar en la temperatura de hibridación (T_m) de los cebadores construidos, ya que la T_m de los cebadores utilizados para el gene *dsr-A* es mucho menor a la T_m del cebador AAP que incluye el sistema 5'RACE. Para solucionar este problema, se propone una modificación en el sistema utilizado, en la cual se adicionará el nucleótido Adenina o Timina al extremo 5', en lugar de Citosinas, para de esta forma disminuir la T_m del cebador directo y así aproximar el valor promedio de la T_m en ambos

cebadores. Consecuentemente, se tendría que construir el cebador complementario a esta secuencia.

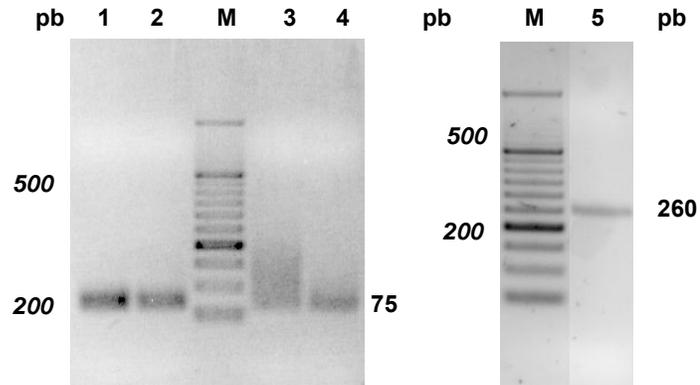


Figura 7.22

Productos de PCR obtenidos para la amplificación del ADNc sintetizado a partir del ARNm del gene *dsr-A*

Carriles M, Marcador de Peso Molecular. Carriles 1 y 2, amplificación con cebadores AAP y GSP1A. Carriles 3 y 4, amplificación con cebadores AAP y GSP2A. Carril 5, amplificación con cebadores PVA y GSP1A. Geles de agarosa al 2.5 % y tinción con bromuro de etidio

8. Análisis general de la región promotora

8.1 Región -10

Se realizó el alineamiento y cálculo de la frecuencia de aparición de las bases localizadas en las regiones -10 determinadas, en el análisis se incluye la región -10 reportada para los genes *dsr-S* y *dsr-D* (Quirasco *et al.*, 1999, Neubauer *et al.*, 2000). Los resultados se presentan en la Tabla 8.1, donde se observa claramente que la región -10 es muy conservada y que la secuencia consenso generada presentó el motivo de reconocimiento para los factores σ^{70} primarios, la caja TATAAT.

Tabla 8.1
Región promotora -10 en genes de GT en *L. mesenteroides*

Bacteria	Cepa	Gene	Región -10					
			T ₈₀	A ₉₅	T ₄₅	A ₆₀	A ₅₀	T ₉₆
<i>E. coli</i>	Consenso	-	T	A	T	A	A	T
	B-512	<i>dsr-S</i> ¹	T	A	T	A	A	T
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>		<i>dsr-T</i>	A	A	G	A	A	T
		<i>lev-S</i>	T	A	T	A	C	T
	Lcc-4	<i>dsr-D</i> ²	T	A	T	A	A	T
	B-1355	<i>dsr-C</i>	T	A	T	A	A	T
		<i>asr</i>	T	A	T	T	A	T
	B-1299	<i>dsr-B</i>	T	A	T	A	A	T
	IBT-PQ	<i>dsr-P</i>	T	A	T	G	A	T
Consenso			T	A	T	A	A	T
Frecuencia (%)			87.5	100	87.5	75	87.5	100

¹Quirasco *et al.*, 1999
²Neubauer *et al.*, 2000

Con los resultados obtenidos se confirma la hipótesis planteada, ya que la región promotora -10 en los genes de GT de *L. mesenteroides* es conservada y similar al consenso en los procariontes, la representación gráfica de la frecuencia de aparición de cada base (Figura 8.1), muestra con claridad estos resultados.

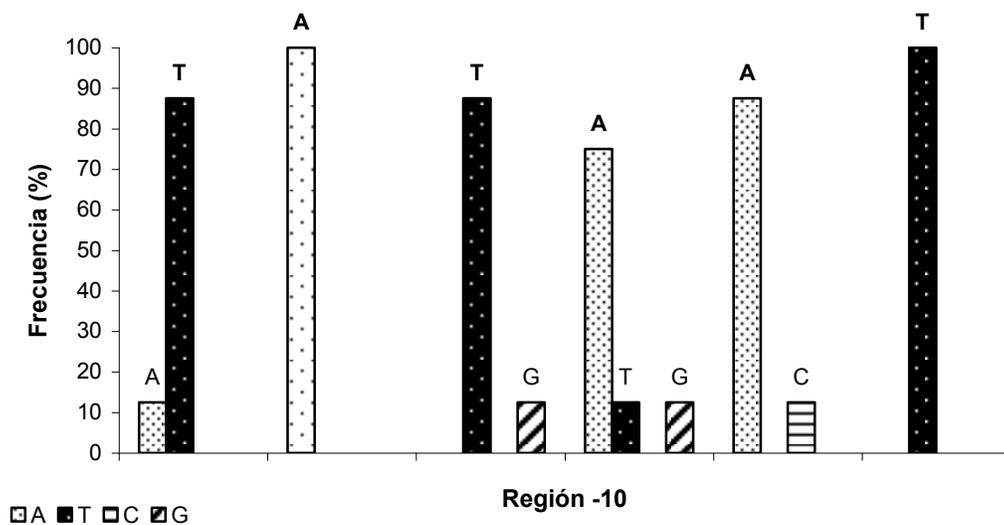


Figura 8.1
Frecuencia de bases en la región -10 en los genes de GT

8.2 Región -35

La región -35 se estableció estrictamente en todos los casos 17 pb río arriba de la caja -10, ya que es la distancia óptima reportada para los genes de *E. coli* y *B. subtilis*. El resultado del alineamiento de estas secuencias (Tabla 8.2 y Figura 8.2) mostró que esta región está menos conservada que la región -10 y presenta una alta frecuencia de aparición del nucleótido Timina. Este motivo rico en Timinas produce que la región -35 en genes de GT se aleje del consenso en los procariotas, el motivo TTGACA, y por lo tanto del sitio de reconocimiento de la región 4.2 de σ^{70} reportada hasta el momento.

Tabla 8.2
Región promotora -35 en genes de GT en *L. mesenteroides*

Bacteria	Cepa	Gene	Región -35					
<i>E. coli</i>	Consenso	-	T ₈₂	T ₈₄	G ₇₈	A ₆₅	C ₅₄	A ₄₅
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	B-512	<i>dsr-S</i> ¹	C	G	T	T	T	T
		<i>dsr-T</i>	T	A	G	T	T	A
		<i>lev-S</i>	A	T	A	C	T	A
	Lcc-4	<i>dsr-D</i> ²	C	G	T	T	T	T
		<i>dsr-C</i>	T	A	T	A	A	G
	B-1355	<i>asr</i>	G	T	T	A	A	T
		<i>dsr-B</i>	T	A	T	A	C	G
	IBT-PQ	<i>dsr-P</i>	A	A	G	T	A	T
Consenso			T	A	T	T	T	T
Frecuencia (%)			37.5	50	62.5	50	50	50

¹Quirasco *et al.*, 1999

²Neubauer *et al.*, 2000

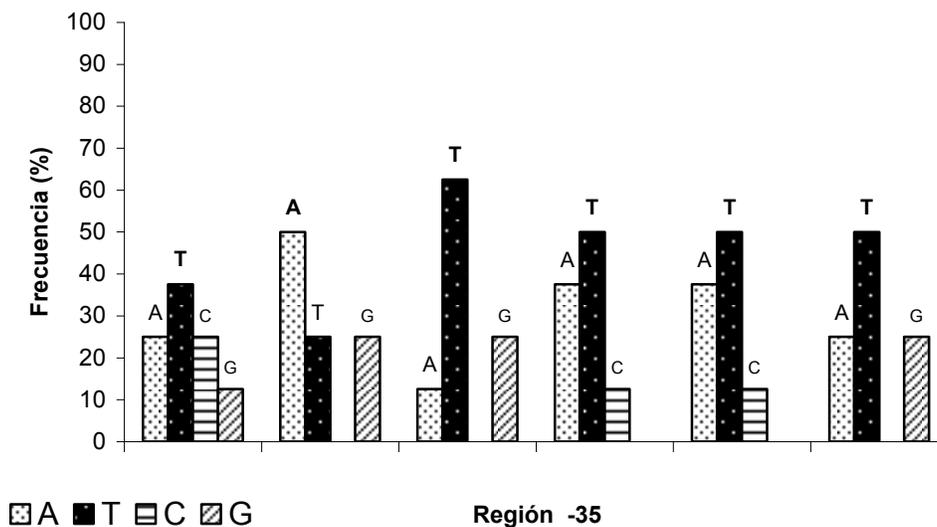


Figura 8.2
Frecuencia de base en la región promotora -35 en genes de GT

Los resultados anteriores muestran que la región -35 de los genes de GT se encuentra alejada del consenso en los procariontes, en consecuencia, se puede proponer que dicha región no sería determinante en la fuerza de la región promotora y/o que sólo la región -10 determinaría el inicio de la transcripción, como ha sido propuesto en genes cuya región -35 no es canónica.

8.3 Secuencias espaciadoras

El alineamiento de las secuencias espaciadoras entre la región -35 y -10 (Tabla 8.3) presentan secuencias ricas en nucleótidos de Adeninas y Timinas. El alineamiento y cálculo de la frecuencia de aparición de cada base (Figura 8.3), reveló que esta región puede poseer secuencias fundamentales para regular la velocidad de inicio de la transcripción en estos genes.

En primer lugar, resalta alta frecuencia de aparición del nucleótido Guanina en dos únicas posiciones a lo largo de toda la región promotora, las cuales se localizan justo a una base río arriba de la región -10. Esta región corresponde al sitio de reconocimiento de la región 3.0 de σ^{70} , es decir la región en el DNA donde se localiza el EMDE, si bien este elemento se caracteriza por poseer la secuencia TGn, se ha reportado la existencia de σ^{70} que presentan una mutación en la región 3.0, lo que provoca que el motivo conservado TGn se modifique, por ejemplo por TCn ó TTn (Barne *et al.* 1997). Por lo tanto, se puede realizar la hipótesis que la secuencia GGT justo río arriba de la caja -10 en los genes de estudiados, sea una señal reconocida por un σ^{70} expresado en *L. mesenteroides*, lo cual hasta ser estudiado experimentalmente podría ser afirmado.

Tabla 8.3
Secuencias espaciadoras entre las cajas -10 y -35
en genes de GT de *L. mesenteroides*

Cepa	Gene	-35 ← Secuencias espaciadoras → -10																	
		θ	π	\omicron	ν	μ	λ	κ	φ	ι	η	γ	ϕ	ϵ	δ	χ	β	α	
<i>L. mesenteroides</i>	<i>dsr-S</i>	T	T	A	C	A	A	A	T	A	A	A	T	T	A	A	G	T	
	B-512 <i>dsr-T</i>	T	T	T	G	T	G	C	C	A	A	A	A	A	G	G	G	A	
	<i>lev-S</i>	T	T	G	A	A	A	T	G	A	T	A	A	G	C	G	T	T	
	Lcc-4 <i>dsr-D</i>	T	T	A	C	A	A	A	T	A	A	A	T	T	A	A	G	T	
	B-1355	<i>dsr-C</i>	T	T	C	G	T	A	A	T	T	T	T	A	T	A	G	C	T
		<i>asr</i>	<u>A</u>	<u>A</u>	A	A	T	T	A	A	T	A	A	A	T	A	<u>T</u>	<u>G</u>	G
	B-1299 <i>dsr-B</i>	T	T	C	G	T	A	A	T	T	T	T	A	T	A	G	C	T	
	IBT-PQ <i>dsr-P</i>	T	C	T	T	A	G	T	C	G	C	A	A	A	T	G	T	T	
Consenso		T	T	A	G	A/T	A	A	T	A	A	A	A	T	A	G	G	T	
Frecuencia (%)		87.5	75	37.5	37.5	50	62.5	62.5	50	50	50	75	75	62.5	62.5	62.5	50	75	

La única excepción a esta observación se encuentra en el gene *asr*, donde sí se encuentra el EMDE conservado en *E. coli*. Sin embargo, resalta que los dos primeros nucleótidos río abajo de la caja -35 establecida, no se conserva dos bases de Timina como en el resto de los genes (Tabla 9.3). Esto sugiere que dichos nucleótidos podrían influir en la estructura de reconocimiento para el inicio de la transcripción o en su defecto, el motivo TT sea parte de una secuencia de reconocimiento para la RNAPol ó para una proteína activadora de la transcripción en estas enzimas. En la Figura 8.3 se observa claramente la secuencia conservada TT río abajo de la caja -35, la secuencia GGT justo antes de la caja -10 y, en general la abundancia de nucleótidos de Timina y Adenina en la región espaciadora de las cajas promotoras.

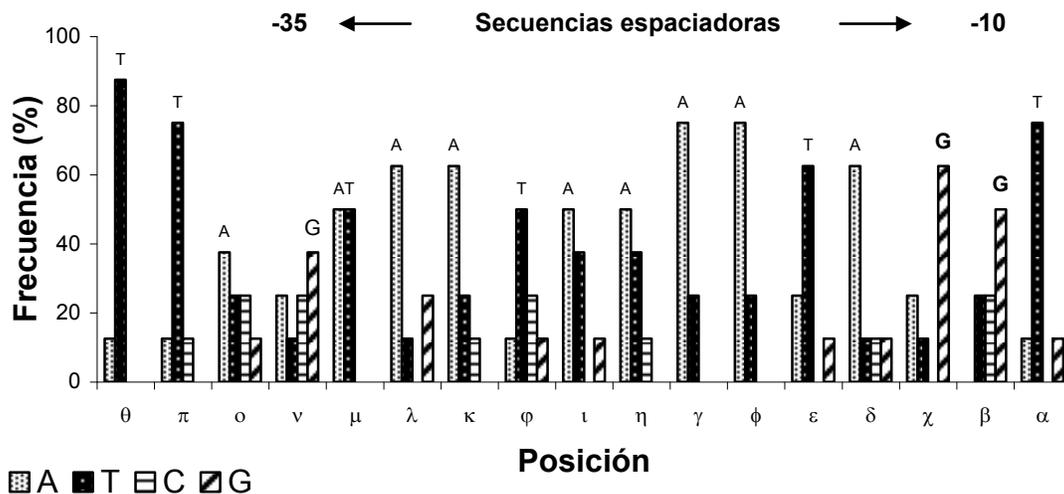


Figura 8.3
Frecuencia de bases entre la región -35 y -10 (17 pb)

Dadas las observaciones anteriores, se puede proponer la construcción de varios vectores de expresión en *L. mesenteroides* a partir de las secuencias consenso generadas, de tal manera que se pueda evaluar mediante una cuantificación de mensajeros por RT-PCR, la eficiencia de la transcripción de cada uno de ellos. Esto con el fin de relacionar la secuencia de bases en los nucleótidos espaciadores, con la velocidad de la transcripción.

8.4 Región río arriba de la caja -35

El alineamiento generado a partir de las secuencias río arriba de la caja -35 (Tabla 8.4 y Figura 8.4) mostró una zona rica en Adeninas y Timinas, las cuales podrían considerarse los como elementos UP (*upstream*) de la región promotora en estos genes. De manera general, se observó la alta frecuencia de aparición de Timinas, seguida por las Adeninas. Por lo cual se puede proponer que la subunidad α de la RNAPol en *L. mesenteroides* reconoce esta zona y contribuye a la eficiencia en el inicio de la transcripción, esto con base en las secuencias consenso de los elementos UP reportadas (Ross *et al.* 1998, Estrem *et al.* 1998, Gourse *et al.* 2000).

Tabla 8.4
Región río arriba de la caja -35 en genes de GT de *L. mesenteroides*

Bacteria	Cepa	Gene	Secuencias Río arriba de la región -35																														
			-60							-50							-40																
<i>L. mesenteroides</i>	B-512	<i>dsr-S</i>	A	A	A	T	A	T	G	T	C	G	A	T	T	G	T	G	T	A	T	T	G	A	A	A	T	T	T	T	T	A	G
		<i>dsr-T</i>	A	C	A	A	A	T	A	A	C	C	G	T	T	T	T	G	A	T	T	A	G	A	G	A	A	A	T	A	T	A	G
		<i>lev-S</i>	A	A	A	T	A	T	G	T	C	G	A	T	T	G	T	G	T	A	T	T	A	G	A	A	A	T	T	T	T	A	A
	Lcc-4	<i>dsr-D</i>	T	T	T	A	T	G	A	T	A	T	A	C	G	C	T	T	A	A	C	A	A	G	C	G	A	A	T	G	T	A	A
		<i>dsr-C</i>	T	T	A	A	A	G	A	A	T	G	T	T	A	A	T	C	G	T	T	T	G	T	G	A	A	A	T	G	A	A	
	B-1355	<i>asr</i>	T	A	A	T	A	G	C	G	T	G	T	T	A	C	G	A	T	T	C	T	A	C	T	A	T	T	T	A	A	T	
	B-1299	<i>dsr-B</i>	T	T	A	A	A	G	A	A	T	T	G	T	T	A	A	T	C	G	T	T	T	G	T	G	A	A	A	T	G	A	
	IBT-PQ	<i>dsr-P</i>	A	T	T	A	A	C	G	T	T	T	G	T	A	A	A	A	A	A	C	A	A	T	T	G	C	T	G	A	C	A	
Consenso			A/T	T	A	A	A	G	A	T	T	T	G	T	T	A	T	T/G	A/T	A	T	T	A/G	A/G	T	A/G	A	T	T	T	A		
Frecuencia (%)			50	50	75	63	88	50	50	50	50	50	88	63	38	50	38	38	50	63	63	38	38	50	50	50	63	50	63	38	75		

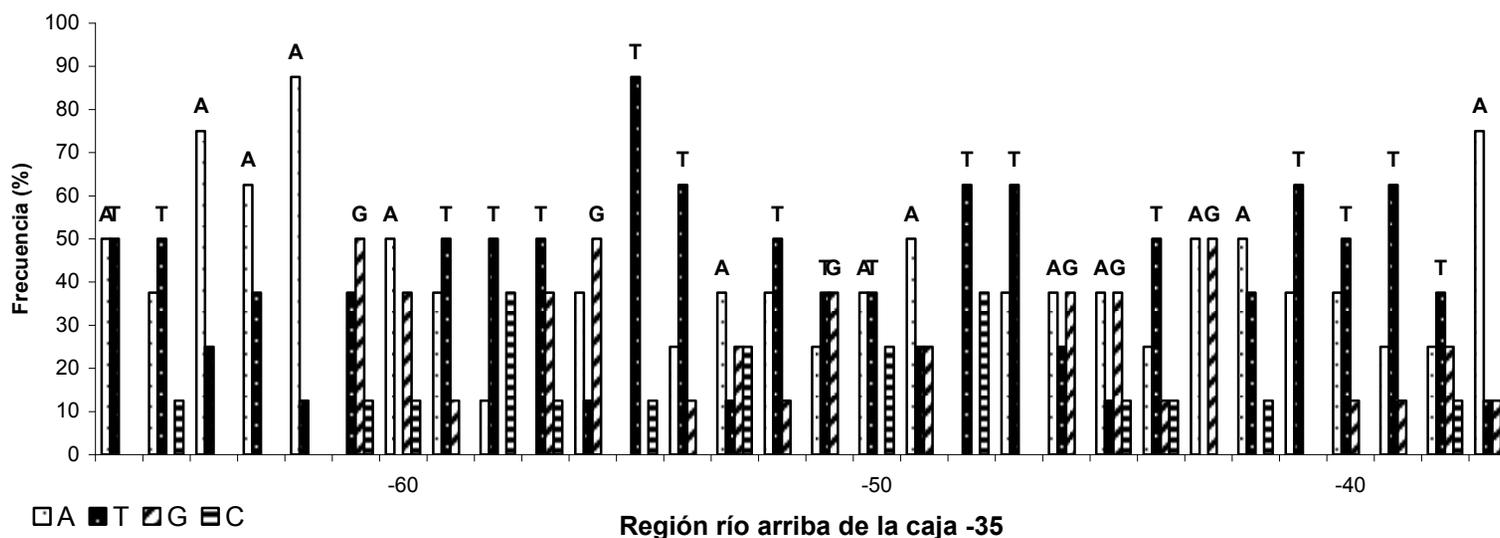


Figura 8.4
Frecuencia de bases río arriba de la caja -35

8.5 Región promotora de GT

En la Figura 8.5 se muestra la frecuencia de aparición de bases a lo largo de toda la región promotora, comenzando a partir de la caja -10, de los genes de GT de *L. mesenteroides* estudiados. De este análisis se observa que se tienen tres elementos de regulación que favorecen la alta expresión de un gene:

- Una región -10 muy conservada, que a su vez funciona como señal de reconocimiento para un factor σ^{70} primario, factor sigma que produce la mayor cantidad de ARNm en las células bacterianas.
- Existe la posibilidad de una secuencia que pueda funcionar como EMDE.
- Una región río arriba de la región -35 rica en nucleótidos de Adeninas y Timinas que sirva como reconocimiento para la subunidad α de la ARNpol.

Por lo tanto se puede concluir que la región promotora de estos genes posee fuertes señales de reconocimiento para que la ARNpol comience la transcripción, y por primera vez, aporta elementos para explicar con bases moleculares y con analogía a lo estudiado en otras bacterias, el mecanismo por el cual existe una alta expresión de estas enzimas en *Leuconostoc mesenteroides*. Sin embargo, se requiere aún atribuir una función exacta tanto a las bases localizadas en las secuencias espaciadoras y río arriba de la región -35. Esto último abre la posibilidad de que pueda intervenir alguna proteína que active la transcripción en estos genes.

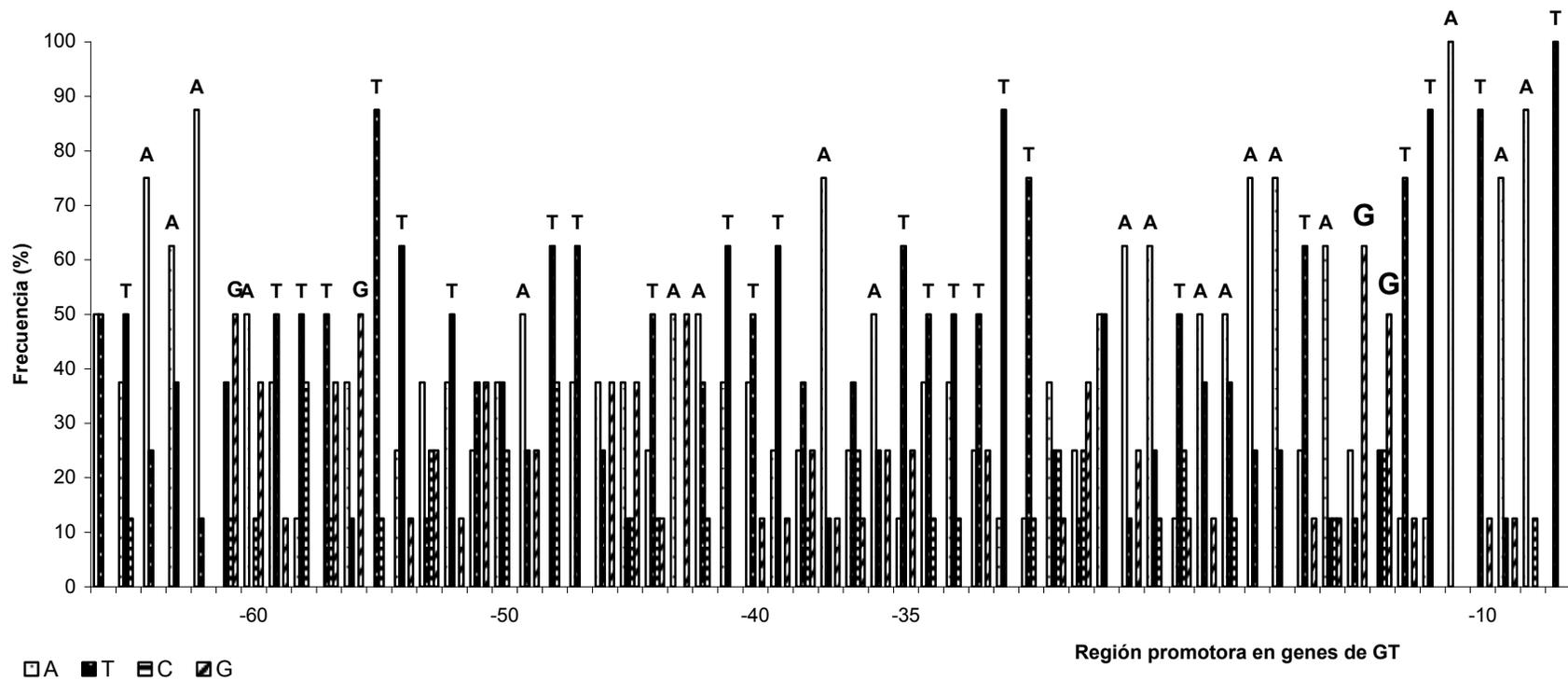


Figura 8.5. Frecuencia de bases en la región promotora de genes de GT expresados en *L. mesenteroides*

8.6. Análisis de la secuencia Shine-Dalgarno en genes de GT

La secuencia de unión a ribosoma o Shine-Dalgarno (SD) ha sido poco estudiada en los genes de GT identificados, en los casos en que esta señal se ha reportado, fue con base en un análisis *in silico* de la secuencia del gene. Con la finalidad de explicar con mayor certeza diversas incógnitas referentes a la expresión de los genes de GT en estudio, se realizó un análisis general de la señal de SD en los genes estudiados en este trabajo y en aquellos en los que se conocía el inicio de transcripción. Al igual que con la región promotora, se elaboró un alineamiento de las posibles secuencias SD, esto con base en un modelo del complejo de inicio de la traducción entre los ARNm de *E. coli* y la subunidad 30S ribosomal (Ma *et al.*, 2002). En la Figura 8.6A se observa un modelo simplificado del complejo de inicio de la traducción, mientras que en la Figura 8.6B se muestra el alineamiento obtenido para genes de GT estudiados.

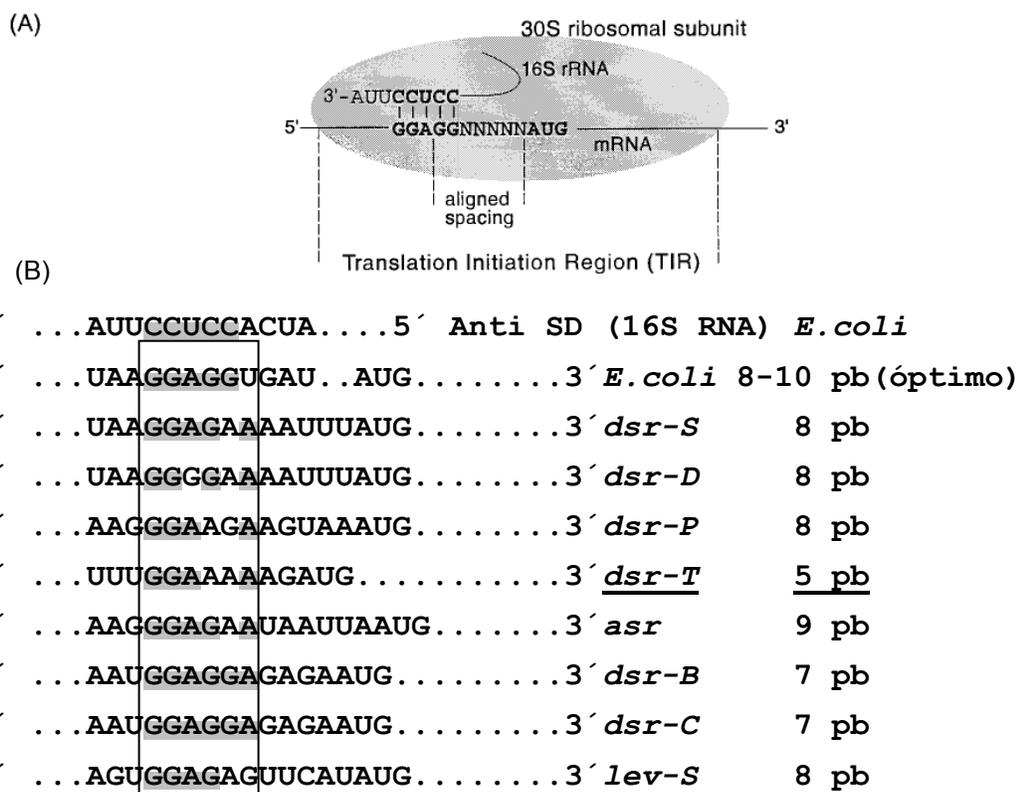


Figura 8.6. A, modelo simplificado del complejo de inicio de la traducción entre los ARNm de *E. coli* y la subunidad 30S ribosomal (Ma *et al.*, 2002). B, alineamiento de la posible señal SD en los genes de GT estudiados

Los resultados obtenidos mostraron que la señal SD, en los genes de GT, es conservada y similar a la secuencia SD en los genes de *E. coli*. Con base en este análisis se puede proponer que el mensajero del gene *dsr-T* no se logra traducir o se traduce con una muy baja eficiencia, ya que se encuentra a una distancia no óptima para comenzar el inicio de la traducción.

9. Conclusiones

- La región promotora del -10, en genes de Glicosiltransferasas expresadas en *L. mesenteroides*, es conservada con respecto al resto de las secuencias -10 reportadas para un reconocimiento por parte de un factor σ^{70} primario en bacterias.
- La región del -35 es menos conservada y presenta una secuencia rica en el nucleótido de Timina, alejada del consenso en los procariontas.
- Sólo en el gene *asr* existe la presencia del EMDE reportado para bacteria como *E. coli*, *B. subtilis* y *L. lactis*. Sin embargo, existe la posibilidad que la secuencia consenso GGT encontrada justo río arriba de la caja -10 pueda funcionar como EMDE en el resto de los genes.
- Se observó una región rica en adeninas y timinas río arriba de la caja -35 establecida, lo cual sugiere que la región promotora de estos genes posea un elemento UP, para el reconocimiento de la subunidad α de la ARNpolimerasa de *L. mesenteroides*.
- Los genes *dsr-T* y *dsr-C* sí se transcriben pero no se traducen en una proteína activa.

10. Perspectivas

Un promotor puede considerarse como la expresión mínima de regulación de un gene. Bajo este concepto, en este trabajo se comenzó a explorar la regulación en la expresión de los genes de GT de *L. mesenteroides*, ya que hasta el momento han sido el centro de atención en este microorganismo. Sin embargo, su estudio puede ser punto de partida para el análisis general de los mecanismos de regulación en esta bacteria, cuyo desconocimiento ha frenado el potencial uso biotecnológico de *Leuconostoc*. En consecuencia, la investigación en este microorganismo debe estar encaminada a obtener mayor información genómica de *Leuconostoc*, y de forma paralela, continuar con la búsqueda de usos biotecnológicos de esta bacteria. De los resultados obtenidos en este trabajo se formularon hipótesis acerca del papel que juegan las secuencias presentes en la región promotora de las GT, en especial aquellas se localizan río arriba de la caja -10. Para dar solución a estas incógnitas se propone:

Un primer acercamiento para evaluar la función de las secuencias presentes en la región promotora de cada gene, consistiría en la cuantificación de los mensajeros de las GT estudiadas, de tal manera que se pueda relacionar la secuencia con el nivel de expresión de cada mensajero.

Probar la fuerza de los promotores caracterizados en *L. mesenteroides*, mediante un vector de expresión que posea en la región promotora tanto las secuencias ricas en Timina en la región -35, así como la secuencia consenso obtenida a partir de las bases espaciadoras entre las cajas -10 y -35, así como un gene reportero. Hay que mencionar, que hasta el momento, en los diferentes grupos de trabajo, no se ha logrado una clonación eficiente de este microorganismo, debido a la pérdida del vector en las resiembras posteriores, por lo cual la clonación eficiente de *Leuconostoc* es pieza clave para elevar la investigación en esta bacteria.

En el caso del gene *dsr-C* resultaría interesante incorporar la base mutada en este gene, para producir la proteína correspondiente y poder hacer el estudio cinético de la enzima, así como caracterizar químicamente el glucano producido.

11. Bibliografía

- 📖 **Argüello-Morales M., Remaud-Simeon M., Pizzut S., Sarcabal P., Willemont R. and Monsad P. 2000^a.** Sequence analysis of the gene encoding alternansucrase, a sucrose glucosyltransferase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355. FEMS Microbiology letters 182:81-85.
- 📖 **Argüello-Morales Martha Alicia. 2000^b.** L'alternane-saccharase de *Luconostoc mesenteroides* NRRL B-1355: structure primaire et synthèse d'oligosides. Thèse Doctorat. L'Institut National Des Sciences Appliquées de Toulouse. Toulouse, France.
- 📖 **Axelsson Lars. 1993.** Lactic Acid Bacteria: Classification and physiology En: Von Wright A., Salminen, S. Lactic Acid Bacteria. Chap 1. 1st. Edt. Marcel Dekker, Inc. U.S.A. pág1-63.
- 📖 **Barne A., Bown A., Busby J.W. and Minchin D. 1997.** Region 2.5 of the *Escherichia coli* RNA polymerase σ 70 subunit is responsible for the recognition of the 'extended -10' motif at promoters. EMBO Journal Vol.16 No.13 pp.4034-4040.
- 📖 **Bekal S. C. Divies and H. Prévost. 1999.** Genetic Organization of the *citCDEF* Locus and Identification of *mae* and *clyR* Genes from *Leuconostoc mesenteroides*. J. Bacteriol. 181: 4411-4416.
- 📖 **Bozonnet S., Dols-Laffargue M., Fabre E., Pizzut S., Remaud-Simeon M., Monsan P. and Willemot R. 2002.** Molecular characterization of DSR-E, an α -1,2 Linkage-Synthesizing dextransucrase with two catalytic domains. Journal of Bacteriology. 184,20: 5753-5761.
- 📖 **Campbell E. A., Muzzin O., Chlenov M., Sun J. L., Olson C., Oren W., Trester-Zedlitz M. L. and Darst S. A. 2002.** Structure of the Bacterial RNA Polymerase Promoter Specificity σ Subunit. Molecular Cell, Vol. 9, 527-539.
- 📖 **Cases I., Ussery D. W. and Lorenzo V. 2003.** The σ^{54} regulon (sigmulon) of *Pseudomonas putida*. Environmental Microbiology. 5(12), 1281-1293.
- 📖 **Castillo E. and López-Munguía A. 2004.** Synthesis of levan in water-miscible organic solvents. Journal of Biotechnology. 114 : 209-217.
- 📖 **Djouzi Z. and Andrieux C. 1995.** Degradation and fermentation of α -glucooligosaccharides by bacterial strains from human colon: in vitro and in vivo studies in genobiotic rats, J. Appl. Bacteriol. 79, 117-127.
- 📖 **Estrem T., Gaal T., Ross W. and Gourse L. 1998.** Identification of an UP element consensus sequence for bacterial promoters. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 95, pp. 9761-9766.

- 📖 **Fernandez-Vazquez J.L., Lopez-Munguia A. and Olvera C. 2003.** Molecular characterization of a dextransucrase gene from *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ isolated from pulque. Gene Bank. NCBI.
- 📖 **Flickinger M. and Drew S. 1999.** Encyclopedia of Bioprocess Technology, Fermentation, biocatalysis and bioseparation, Vol. 2, A Wiley-Interscience Publication, pp 803-821.
- 📖 **Funane K., Mizuno K., Takahara H. and Kobayashi M. 2000.** Gene encoding a dextransucrase-like protein in *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. Biosci Biotechnol Biochem. 64(1):29-38.
- 📖 **Geszvain K. and Landick R. 2005.** The structure of bacterial RNA polymerase. Web Site Edition. <http://www.bact.wisc.edu/landick/>. 12 pp.
- 📖 **Gourse Richard L., Ross Wilma and Gaal Tamas. 2000.** UPs and downs in bacterial transcription initiation: the role of the alpha subunit of RNA polymerase in promoter recognition. Molecular Microbiology 37(4), 687-695.
- 📖 **Guggenheim B. 1970.** Enzymatic hydrolysis and structure of water-insoluble glucan produced by glycosyltransferases from a strain of *Streptococcus mutans*. Helv. Odontol. Acta 14:89–109.
- 📖 **Harley Calvin B. and Reynolds Robert P. 1987.** Analysis of E. coli promoter sequences. Nucleic Acids Research. Vol. 15 Number 5: 2343-2361.
- 📖 **Helmann John D. 1995.** Compilation and analysis of *Bacillus subtilis* σ^A -dependent promoter sequences: evidence for extended contact between RNA polymerase and upstream promoter DNA. Nucleic Acids Research, Vol. 23, No. 13 2351-2360.
- 📖 **Jana S. and Deb J. K. 2005.** Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 67: 289-298.
- 📖 **Jensen P. and Hammer K. 1998.** The Sequence of Spacers between the Consensus Sequences Modulates the Strength of Prokaryotic Promoters. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 64, No. 1 p. 82–87.
- 📖 **Murakami S., Masuda S., Campbell E., Muzzin O. and Darst A. 2002.** Structural Basis of Transcription Initiation: An RNA Polymerase Holoenzyme-DNA Complex. SCIENCE, Vol 296, p 1285-1290.
- 📖 **Kim C.H., Moon J. O. and Jang, E. K. 2003.** EMBL. Gen Bank. DDBJ databases. AY142210.
- 📖 **Ma J., Campbell A., and Karlin S. 2002.** Correlations between Shine-Dalgarno Sequences and Gene Features Such as Predicted Expression Levels and Operon Structures. Journal of Bacteriology. Vol. 184, No. 20, p. 5733–5745.

- 📖 **Malhotra A., Severinova E. and Darst. A. 1996.** Crystal Structure of a σ^{70} Subunit Fragment from *E. coli* RNA Polymerase. *Cell*, Vol. 87, 127–136, October 4.
- 📖 **Mathews K. and van Holde K. E. 1996.** Bioquímica. Segunda edición. Editorial McGraw-Hill. España. Pág. 1062-1075.
- 📖 **Miller A. and Robyt J. 1986.** Inhibition of dextransucrase by Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , and Tris. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 248: 579-586.
- 📖 **Monchois V., Willemot R., Remaud-Simeon M., Croux C. and Pierre M. 1996.** Cloning and sequencing of a gene coding for a novel dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 synthesizing only $\alpha(1-6)$ and $\alpha(1-3)$ linkages. *Gene* 182:23-32.
- 📖 **Monchois V., Remaud-Simeon M., Russell R.R.B., Monsan P. and Willemot R.M. 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.
- 📖 **Monchois V., Remaud-Simeon M., Monsan P. and Willemot R. 1998.** Cloning and sequencing of a gene coding for an extracellular dextransucrase (DSRB) from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 synthesizing only a $\alpha(1-6)$ glucan.
- 📖 **Monchois V., Willemot R. and Monsan P. 1999.** Glucansucrases: mechanism of action and structure-function relationships, *FEMS Microbiology Reviews*, 23: 131-151.
- 📖 **Monsan P., Bozonnet S., Albenne C., Joucla G., Willemot R. and Remaud-Simeon M. 2001.** Homopolysaccharides from lactic acid bacteria, *International Dairy Journal*, 11: 675-685.
- 📖 **Morales-Arrieta S., Rodríguez M., Segovia L., López-Munguía A. and Olvera-Carranza C. 2006.** Identification and functional characterization of *levS*, a gene encoding for a levansucrase from *L. mesenteroides* NRRL B-512 F. *Gene* 376 (2006) 59–67.
- 📖 **Murakami S., Masuda S., Campbell E., Muzzin O. and Darst Seth A. 2002.** Structural Basis of Transcription Initiation: An RNA Polymerase Holoenzyme-DNA Complex. *Science* Vol. 296. May 17. 1285-1290.
- 📖 **Neubauer H., Bauché A. and Beat M. 2003.** Molecular characterization and expression analysis of the dextransucrase *DsrD* of *Leuconostoc mesenteroides* Lcc4 in homologous and heterologous *Lactococcus lactis* cultures. *Microbiology* 149:973-982.
- 📖 **Newbrun, E., and S. Baker. 1968.** Physico-chemical characteristics of the levan produced by *Streptococcus salivarius*. *Carbohydr. Res.* 6:165–170.
- 📖 **Paget M. and Helmann J. 2003.** The σ^{70} family of sigma factors. *Genome Biology*, 4:203.
- 📖 **Quirasco M., A. López-Munguía A., Remaud-Simeon M, Monsan P. and Farrés A. 1999.** Induction and Transcription Studies of the Dextransucrase Gene in *Leuconostoc*

mesenteroides NRRL B-512F. Applied And Environmental Microbiology. Vol. 65, No. 12, P. 5504–5509.

- 📖 **Ross W., Aiyar E., Salomon J. and Gourse L. 1998.** *Escherichia coli* Promoters with UP Elements of Different Strengths: Modular Structure of Bacterial Promoters. Journal of Bacteriology. Oct. p. 5375–5383.
- 📖 **Ryu Hwa-Ja, Kim Doman, Kim Do-Won, Moon You-Youn & Robyt John F. 2000.** Cloning of a dextransucrase gene (*fmcmds*) from a constitutive dextransucrase hyper-producing *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMCM developed using VUV. Biotechnology Letters 22: 421–425.
- 📖 **Stiles ME and Holzapfel WH. 1997.** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int J Food Microbiol. Apr 29;36(1):1-29.
- 📖 **Summer J.B. and Howell. 1935.** A method of saccharasa activity. J. Biol. Chem. 108:51-54.
- 📖 **Tieking M., Korakli M., Ehrmann A., Ganzle M. and Vogel R. 2003.** In Situ Production of Exopolysaccharides during Sourdough Fermentation by Cereal and Intestinal Isolates of Lactic Acid Bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 69 (2): 945-952.
- 📖 **van Hijum S., Kralj S., Ozimek K., Dijkhuizen L. and van Geel-Schutten G. H., 2006.** Structure-Function Relationships of Glucansucrase and Fructansucrase Enzymes from Lactic Acid Bacteria. Microbiology And Molecular Biology Reviews, Mar. 70:1,157–176.
- 📖 **Wilke-Douglas M., Perchorowicz, J.T., Houck and Thomas, B.R. 1989.** Methods and compositions of altering physical characteristic of fruit products, US Patent WO 89/12386.
- 📖 **Wösten M.M.S.M. 1998.** Eubacterial sigma-factors. FEMS Microbiology Reviews 22, 127-150.
- 📖 **Young A., Gruber M. and Gross A. 2002.** Views of Transcription Initiation. Cell, Vol. 109, 417–420.

12. ANEXO

**Secuencias de los productos de amplificación
obtenidos
a partir de los extremos 3'
del ADNc de GT**

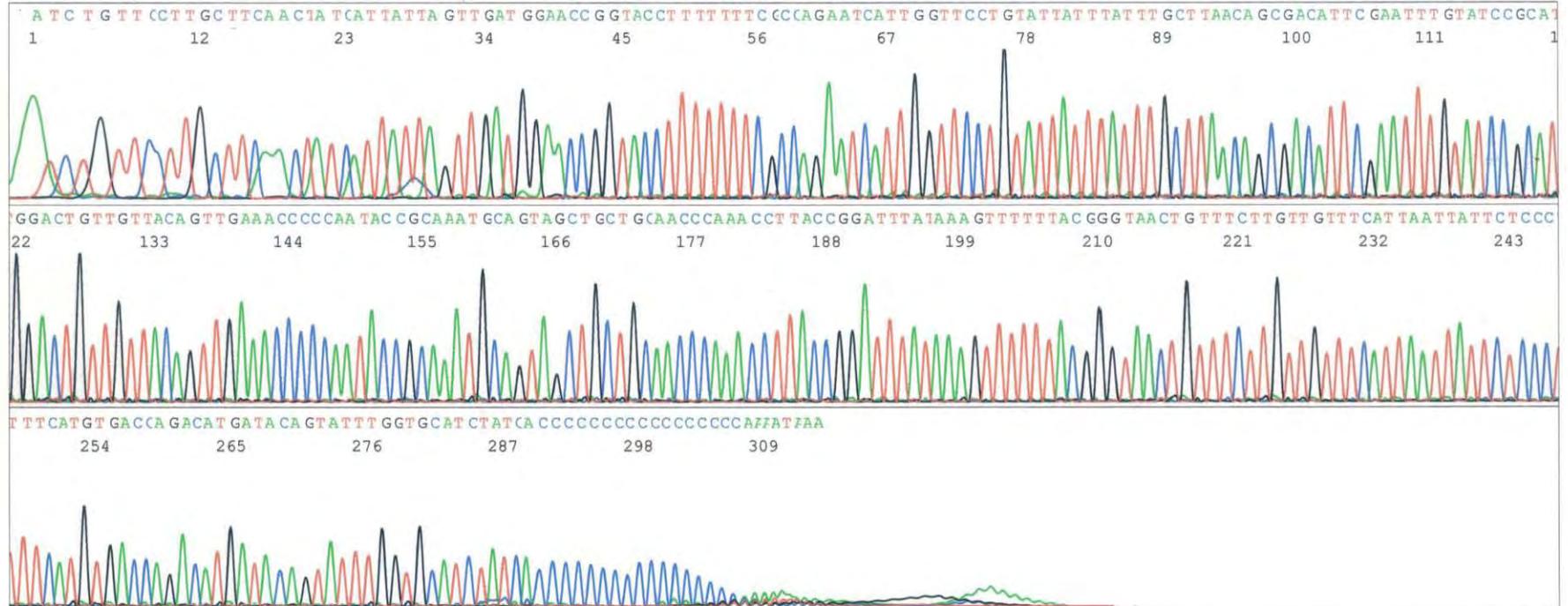
S/N G:951 A:577 T:1203 C:811
KB.bcp
KB 1.1.1 Cap:9

asr_asrfw
15635

KB_3100_POP6_BDTv3.mob
Pts 1270 to 6900 Pk1 Loc:1270

Version 5.1.1 HISQV Bases: 298 ABRAHAM ACATZI

Inst Model/Name 3100/FISIOLOGIACEL-1348-08
Mar 17,2006 04:11PM, PST
Mar 17,2006 04:47PM, PST
Spacing:17.04 Pts/Panel1500
Plate Name: PLATE127



S/N G:186 A:157 T:233 C:194
KB.bcp
KB 1.1.1 Cap:7

dsr-P_dsr-P
15648

KB_3100_POP6_BDTV3.mob
Pts 1280 to 9650 Pk1 Loc:1280

Version 5.1.1 HISQV Bases: 114 ABRAHAM ACATZI

Inst Model/Name 3100/FISIOLOGIACEL-1348-025
Mar 22,2006 12:20PM, PST
Mar 22,2006 01:04PM, PST
Spacing:17.27 Pts/Panel1500
Plate Name: PLATE127





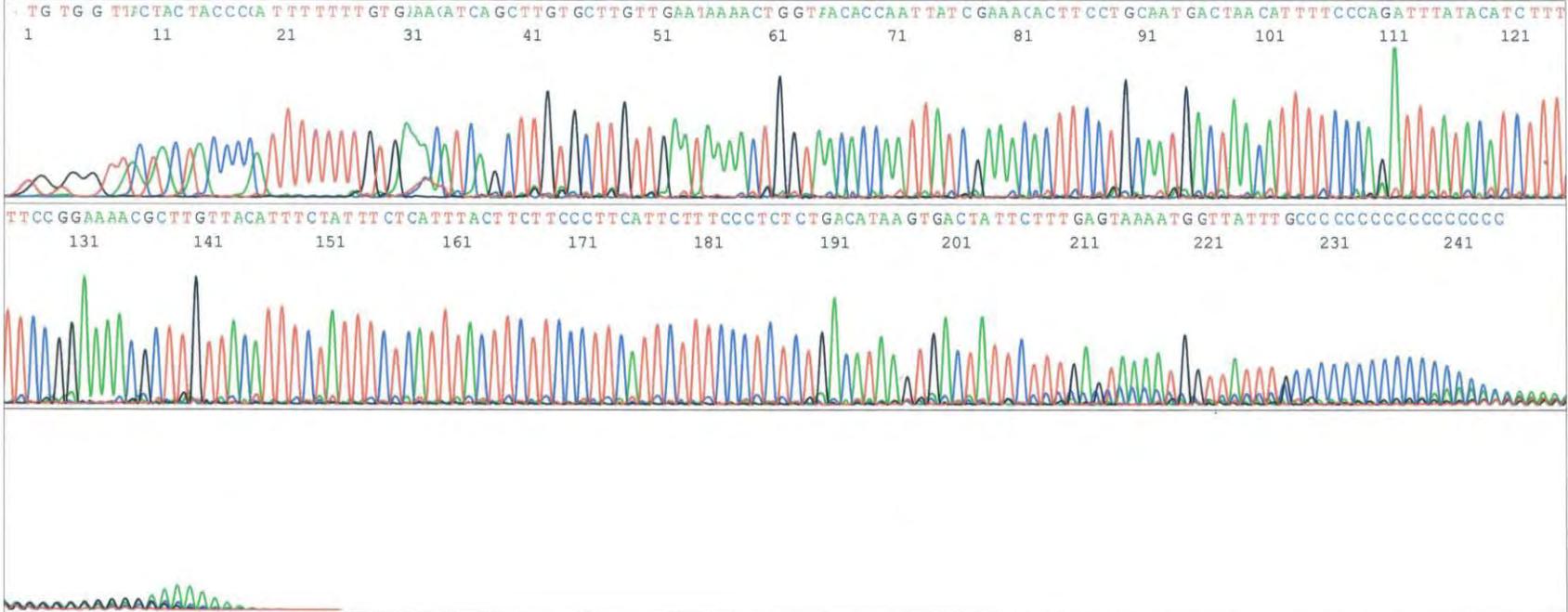
S/N G:289 A:199 T:432 C:324
KB.bcp
KB 1.1.1 Cap:8

dsr-P2_dsr-P2
15814

KB_3100_POP6_BDTv3.mob
Pts 1228 to 5950 Pk1 Loc:1228

Version 5.1.1 HISQV Bases: 221 ABRAHAM ACATZI

Inst Model/Name 3100/FISIOLOGIACEL-1348-025
Apr 03,2006 05:08PM, PDT
Apr 03,2006 05:52PM, PDT
Spacing:17.76 Pts/Panel1500
Plate Name: PLATE130





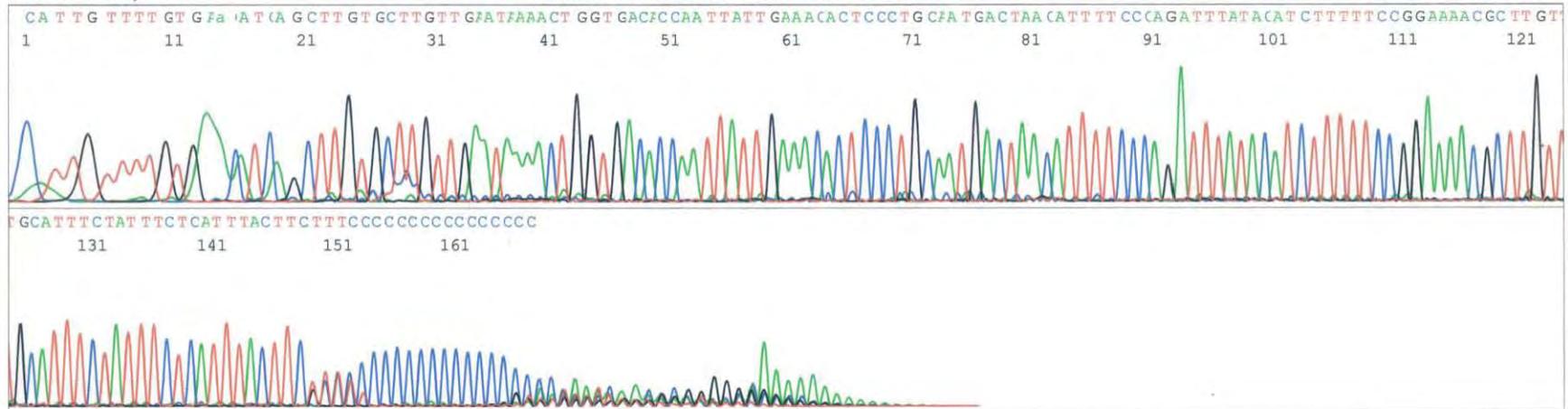
S/N G:253 A:141 T:305 C:225
KB.bcp
KB 1.1.1 Cap:10

dsr-T_dsr-T
15815

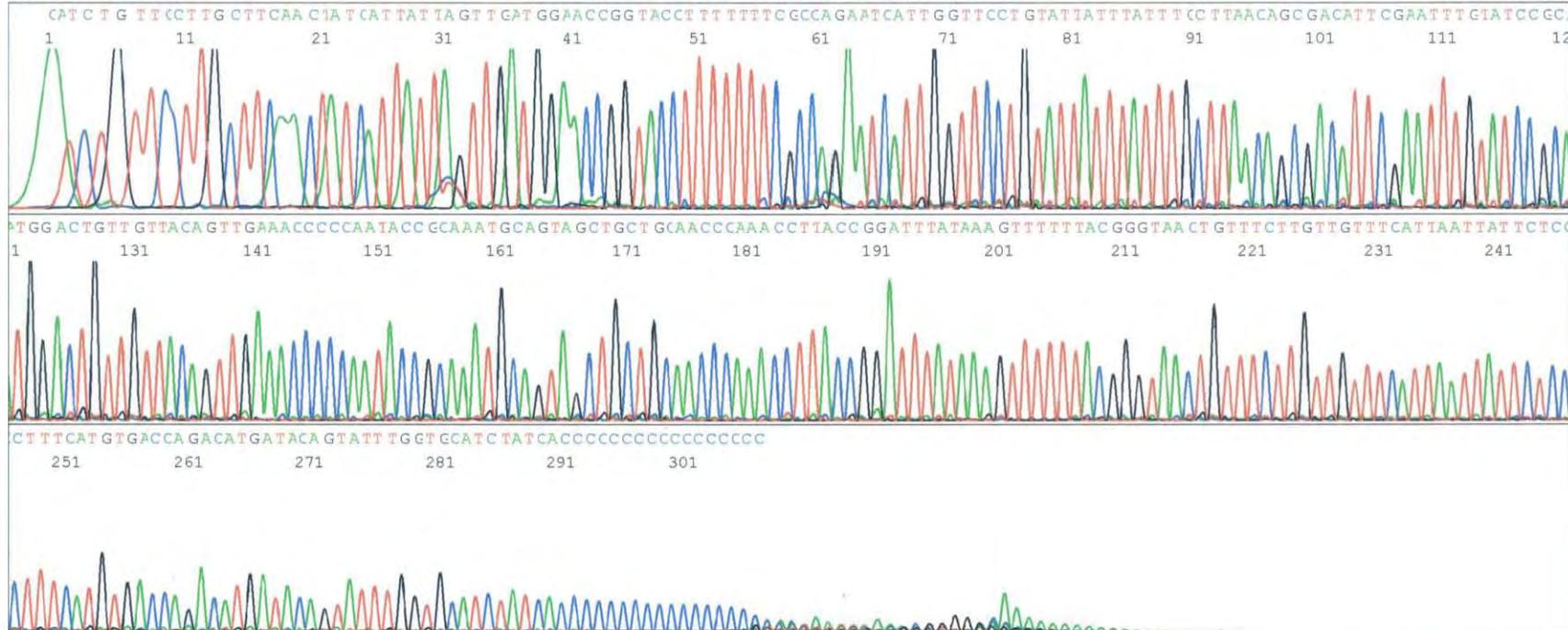
KB_3100_POP6_BDTv3.mob
Pts 1264 to 4725 Pk1 Loc:1264

Version 5.1.1 HiSQV Bases: 151 ABRAHAM ACATZI

Inst Model/Name 3100/FISIOLOGIACEL-1348-025
Apr 03,2006 05:08PM, PDT
Apr 03,2006 05:52PM, PDT
Spacing:18.03 Pts/Panel1500
Plate Name: PLATE130







Signal G:651 A:877 T:1216 C:493 AvSig:809
Basecaller-3100POP6SR.bcp
BC 1.5.1.0 Cap:3

placaB_B03_15967RR_03
dsr-E_dsr-E
DT3100POP6(BDv3)v1.mob
Pts 594 to 4400 Pk1 Loc:594

Version 5.1 HiSQV Bases: 0 ABRAHAM ACATZI

Inst Model/Name 3100/demo_3100
May 04,2006 10:46PM, CEST
May 04,2006 10:46PM, CEST
Spacing:11.63 Pts/Panel1500
Plate Name: Unassigned

