



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**“SÍNTESIS DE 2-FUCOSIL LACTOSA Y LACTODIFUCOTETRAOSA POR *E. coli*  
MODIFICADA POR INGENIERÍA GENÉTICA”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
Q.F.B. FERNANDO JAVIER ARTEAGA CABELLO

TUTOR:  
DR. GUILLERMO M. RUIZ PALACIOS Y SANTOS  
[Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas](#)

MÉXICO, D. F. DICIEMBRE, 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

OF. PMDCBQ/1023/2013

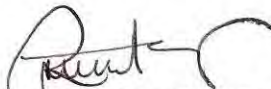
**DR. ISIDRO AVILA MARTÍNEZ**  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
**P r e s e n t e**

Por medio del presente me permito informar a usted que en la reunión del día 26 de Agosto del presente año, el Subcomité Académico acordó nombrar el siguiente Jurado para Examen de **MAESTRO EN CIENCIAS** del QFB. **FERNANDO JAVIER ARTEAGA CABELLO** con número de cuenta 8524744-6, con la tesis titulada "Síntesis de 2-Fucosil lactosa y Lactodifucotetraosa por *E. coli* modificada por ingeniería genética", dirigida por el Dr. Guillermo Miguel Ruiz-Palacios y Santos.

PRESIDENTE	Dr. Francisco Ruiz Terán
VOCAL	Dra. José Guillermo Jesús Aguilar Osorio
VOCAL	Dra. Norma Adriana Valdez Cruz
VOCAL	Dra. María Amanda Gálvez Mariscal
SECRETARIO	Dr. José Adelfo Escalante Lozada

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, D. F., a 19 de Noviembre de 2013.  
**EL COORDINADOR**



**DR. ROBERTO CORIA ORTEGA**

C.c.p. Archivo

RCO\*Igg

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Guillermo Miguel Ruiz Palacios y Santos en el Departamento de Infectología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y de los Institutos Nacionales de Salud de EUA.

Se reconoce la colaboración de Miriam Teresa Arciniega Fuentes en el trabajo experimental y de la Dra. Beatriz R. Ruiz Palacios en la revisión del manuscrito.

Al Dr. Guillermo Ruiz Palacios por hacerme partícipe de esta gran aventura. Gracias Dr. por su ejemplo y enseñanzas.

A todo el Departamento de Infectología-Investigación por su apoyo y ayuda.

A mi madre, un gracias es tan poco...

A mi padre. Te lo debía, una lástima que no lo hayas visto.

A mis hermanos por su cariño incondicional.

A mi esposa. Miriam, gracias por tu paciencia y ayuda.

A Rodrigo y Bruno, que fueron el combustible necesario para finalizar esta tesis.

A Luz, Pily, Viole, Gus, Julia y Fer Tuz, por su amistad y ayuda.

## CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
ANTECEDENTES.....	4
Leche humana.....	4
Carbohidratos de leche humana.....	4
Oligosacáridos de leche humana.....	6
Oligosacáridos fucosilados.....	9
Oligosacáridos fucosilados como inhibidores de adherencia.....	9
Síntesis de oligosacáridos.....	11
Síntesis de oligosacáridos fucosilados.....	13
Síntesis de GDP-fucosa.....	14
JUSTIFICACIÓN.....	18
HIPÓTESIS.....	20
OBJETIVO GENERAL.....	20
OBJETIVOS PARTICULARES.....	20
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	21
MÉTODOS.....	23
RESULTADOS.....	33
DISCUSIÓN.....	54
CONCLUSIONES.....	59
BIBLIOGRAFÍA.....	60
ANEXO I.....	67
ANEXO II.....	68

## ÍNDICE DE FIGURAS.

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Reacciones de glicosilación que participan en la elongación de las cadenas de oligosacáridos en leche humana. ....	7
<b>Figura 2.</b> Ejemplos de oligosacáridos de leche humana. ....	8
<b>Figura 3.</b> Lipopolisacáridos (LPS) fucosilados de <i>H. pylori</i> .....	13
<b>Figura 4.</b> Reacción general de glicosilación.....	14
<b>Figura 5.</b> Rutas de síntesis de GDP-fucosa. ....	17
<b>Figura 6.</b> Síntesis de 2-FL a partir de D-lactosa y L-fucosa en una cepa modificada de <i>E. coli</i> . ....	21
<b>Figura 7.</b> Cepa de <i>E. coli</i> JM107 modificada genéticamente. ....	22
<b>Figura 8.</b> OE-PCR para generar el gen $\Delta FucI$ . ....	33
<b>Figura 9.</b> Patrón de restricción del plásmido suicida pMARK- $\Delta FucI$ . ....	34
<b>Figura 10.</b> PCR para comprobar mutación del gen <i>fucI</i> . ....	35
<b>Figura 11.</b> OE-PCR para generar el gen modificado $\Delta LacZ$ . ....	36
<b>Figura 12.</b> Patrón de restricción del plásmido suicida pDS $\Delta LacZ$ . ....	37
<b>Figura 13.</b> Confirmación del genotipo <i>lacZ</i> y fenotipo <i>lac</i> <sup>-</sup> . ....	38
<b>Figura 14.</b> Comparación de secuencias de amino ácidos deducidas a partir de la secuencia nucleotídica del gen <i>futC</i> de diversas cepas de <i>H. pylori</i> silvestres. ....	40
<b>Figura 15.</b> Modificación del gen <i>futC</i> mediante OE-PCR.....	41
<b>Figura 16.</b> Región homopolimérica modificada del gen <i>futC</i> . ....	41
<b>Figura 17.</b> Comparación de secuencia de aminoácidos del gen <i>futC</i> . ....	42
<b>Figura 18.</b> Comparación de la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia nucleotídica del gen <i>fkp</i> entre la cepa INNSZ y 9343. ....	43
<b>Figura 19.</b> Patrón de restricción del plásmido pBBR3-Rfkp con EcoRI.....	45
<b>Figura 20.</b> TLC de cultivo de 48h (Cultivo en dos pasos). ....	46
<b>Figura 21.</b> Parámetros controlados durante el proceso de fermentación. ....	47
<b>Figura 22.</b> TLC de sobrenadante a diferentes tiempos de fermentación. ....	48
<b>Figura 23.</b> TLC de fracciones eluídas de una columna de carbón:celita. ....	49
<b>Figura 24.</b> TLC de muestras purificadas con columna de carbón:celita. ....	49
<b>Figura 25.</b> Estructura propuesta de 2-FL obtenida por RMN.....	50
<b>Figura 26.</b> Estructura propuesta para LDFT por RMN. ....	51
<b>Figura 27.</b> LC-MS de muestras purificadas.....	52
<b>Figura 28.</b> Modelo propuesto de síntesis de LDFT. ....	56

## ÍNDICE DE TABLAS.

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Composición de la leche humana.....	5
<b>Tabla 2.</b> Patógenos humanos que se adhieren a oligosacáridos.....	10
<b>Tabla 3.</b> Glicosiltransferasas bacterianas clonadas en <i>E. coli</i> y con actividad enzimática..	12
<b>Tabla 4.</b> Purificación final de 2-FL y LDFT de 3 diferentes fermentaciones.....	53



## LISTA DE ABREVIATURAS.

Abreviatura	Definición
<b>2-FL</b>	2-Fucosil lactosa.
<b>Ac. nal.</b>	Ácido nalidíxico.
<b>Cb</b>	Carbenicilina.
<b>Cm</b>	Cloranfenicol.
<b>D.O.<sub>600nm</sub></b>	Densidad óptica a 600 nm.
<b>HPLC</b>	Cromatografía de líquidos de alta eficacia (por sus siglas en inglés: High Performance Liquid Chromatography)
<b>IPTG</b>	Isopropil β-D-tiogalactopiranosido.
<b>LC-MS</b>	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (por sus siglas en inglés: Liquid Chromatography–Mass Spectrometry)
<b>LDFT</b>	Lactodifucotetraosa.
<b>Le<sup>x</sup></b>	Antígeno de grupo sanguíneo Lewis X.
<b>Le<sup>y</sup></b>	Antígeno de grupo sanguíneo Lewis Y.
<b>LNDFH</b>	Lacto-N-difucohexaosa.
<b>LNFP</b>	Lacto-N-fucopentaosa.
<b>OE-PCR</b>	PCR con extensión por sobreposición (por sus siglas en inglés: Overlap extension PCR).
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas in inglés: Polymerase Chain Reaction)
<b>RMN</b>	Espectrometría de resonancia magnética nuclear.
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto.
<b>Tc</b>	Tetracilina.
<b>TLC</b>	Cromatografía en capa fina (por sus siglas en inglés: thin layer chromatography).

## RESUMEN.

La leche de madres sanas y bien nutridas constituye la mejor forma de alimentación del recién nacido. Además de sus ventajas nutricionales, contiene moléculas bioactivas que tienen un efecto benéfico en el lactante. Dentro de este tipo de compuestos se han implicado a las estructuras oligosacáridas fucosiladas como inhibidores de procesos infecciosos al actuar como receptores análogos de diversos patógenos (1–4) y como posibles elementos prebióticos (5, 6).

La estructura 2-fucosil lactosa (Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1-4Glc) es la molécula más abundante dentro de la fracción oligosacárida fucosilada de la leche de madres secretoras y su enlace (Fuc $\alpha$ 1-2Gal) se encuentra en forma repetitiva en diversas estructuras que conforman esta fracción (7, 8). De aquí surge el interés por sintetizarla en cantidades suficientes para realizar ensayos *in vitro* e *in vivo* que puedan ayudar a dilucidar su función.

El objetivo principal del presente trabajo consistió en modificar una cepa de *E. coli*, mutándola en sus vías catabólicas de lactosa y fucosa y subclonando en ella las enzimas FutC ( $\alpha$ 1,2 fucosiltransferasa) de *Helicobacter pylori* y Fkp (L-fucosa cinasa/GDP-L-fucosa pirofosforilasa) de *Bacteroides fragilis*, para que adquiriera la capacidad de sintetizar 2-fucosil lactosa (2-FL) a partir de lactosa y fucosa. Una vez modificada la cepa se realizaron ensayos en bioreactor para producir 2-FL y por último se purificaron los oligosacáridos mediante columnas de carbón activado:celita.

Al final del presente trabajo se logró obtener un proceso de fermentación de alta densidad celular (D.O.<sub>600nm</sub> = 90 – 100), en donde alimentando el sistema con lactosa y fucosa (siempre en exceso con respecto a la lactosa) fue posible sintetizar 2-FL y lactodifucotetraosa (LDFT) obteniendo diferentes proporciones de producción que van de 20:1 hasta 5:1, dependiendo de las concentraciones iniciales de los sustratos, y con rendimientos finales del 33-66% y pureza del 97-98%.

Aunque la producción de LDFT como producto secundario de la reacción fue inesperada, agrega valor al proceso ya que también es uno de los principales oligosacáridos presentes en la leche de madres secretoras. El proceso se considera económicamente factible, con la posibilidad de ser modificado para incrementar los rendimientos de LDFT o sintetizar diferentes estructuras oligosacáridas fucosiladas mediante el uso de distintas fucosiltransferasas.

## INTRODUCCIÓN.

La leche humana es el alimento ideal para el recién nacido. Además de su indudable valor nutricional, también proporciona en forma exclusiva una gran variedad de componentes como factores de crecimiento, factores inmunológicos, hormonas, oligosacáridos, entre otros, que actúan como agentes antimicrobianos, inmunomoduladores, antioxidantes, etc. y que redundan en una mejor salud del recién nacido (1, 2, 7, 9).

Desde hace muchos años el Departamento de Infectología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ) ha realizado una amplia investigación relacionada con las propiedades anti-infecciosas de la leche materna en el recién nacido, demostrando que, además de los anticuerpos, la fracción oligosacárida juega un papel de gran importancia en dicha protección (10–13). Inclusive, se ha identificado a la fracción oligosacárida fucosilada como un componente importante de la inmunidad innata proporcionada por la leche capaz de proteger contra enfermedades diarreicas en niños amamantados (14).

Estudios adicionales para tratar de explicar el mecanismo por el cual se realiza esta protección demostraron que, por lo menos para el patógeno *Campylobacter jejuni*, los oligosacáridos fucosilados en posición  $\alpha$ 1,2 funcionan como inhibidores de la adherencia en cultivos celulares y disminuyen la colonización en modelos murinos (11), mecanismo que fundamenta el hecho de que niños amamantados con leche que contiene elevadas concentraciones de 2-fucosil lactosa presentan una mayor protección contra infecciones por *C. jejuni* (10).

Además de *C. jejuni*, también se ha demostrado que patógenos como Calicivirus, *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), *Salmonella fytis* y *Vibrio cholerae* inhiben su adherencia a diferentes modelos en presencia de estructuras fucosiladas similares a las encontradas en la leche humana (15–17), así como de protección en modelos de ratón lactante ante los efectos diarreogénicos de la toxina termoestable de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) (18).

La importancia de corroborar esta información con diferentes modelos así como de responder nuevas interrogantes relacionadas con este tipo de oligosacáridos ha dado lugar a la necesidad de contar con estos azúcares en cantidades suficientes para realizar dichos

estudios. Desafortunadamente, la principal fuente de estos azúcares es la misma leche humana, haciendo que su disponibilidad sea difícil y su purificación tenga altos costos.

Se han realizado intentos para su síntesis en forma química, pero el proceso es complejo y con bajos rendimientos debido a la gran cantidad de pasos de protección y desprotección necesarios (19). También se han desarrollado métodos quimioenzimáticos y biológicos a partir de bacterias y levaduras con diferentes grado de éxito (20–23).

Recientemente la descripción de la primera ruta biosintética de GDP-fucosa (intermediario indispensable en reacciones de síntesis de fucosiltransferasas que originan estos oligosacáridos) a partir de L-fucosa en la bacteria *Bacteroides fragilis* (24) dio lugar a la posibilidad de utilizar esta vía en *E. coli* para producir este tipo de oligosacáridos como método alternativo a los ya descritos.

## **ANTECEDENTES.**

### **Leche humana.**

La leche humana es el alimento ideal del recién nacido ya que contiene todos los nutrimentos necesarios para su desarrollo, por lo que diversos organismos de salud promueven su uso exclusivo durante los primeros seis meses de vida para posteriormente complementarlo con otro tipo de alimentos; se recomienda la lactancia al seno materno hasta el año de edad (25).

La leche humana es un fluido biológico complejo conformado por miles de compuestos distribuidos en diversas fases: una fase acuosa con solutos verdaderos (87%), una fase coloidal con moléculas de caseína (0.3%), emulsión de glóbulos de grasa (4%), glóbulos membranosos de grasa y células vivas (9).

Los principales componentes de la leche son: agua, proteínas, hidratos de carbono, grasas, minerales y vitaminas. También contiene microelementos, hormonas y enzimas (Tabla 1) (9).

La leche de cada especie es única y específica, y la leche humana no es la excepción. Además de sus propiedades nutricionales, tiene características propias que la diferencian significativamente de otras leches de mamíferos.

Independientemente del indiscutible valor nutricional de la leche, existen otros componentes “bioactivos” que ayudan a proporcionar una mayor protección contra diversas enfermedades. Dichos compuestos se encuentran involucrados a diferentes niveles, como son: agentes antimicrobianos, inmunomoduladores, agentes anti-inflamatorios, antioxidantes, citocinas, hormonas, etc., y están relacionados con patogénesis, efecto prebiótico, inflamación, desarrollo, regulación metabólica, digestión, etc., y redundan en una mejor salud del recién nacido (1–5, 26).

### **Carbohidratos de leche humana.**

El principal carbohidrato de la leche humana es la lactosa, disacárido formado por glucosa y galactosa, con un contenido aproximado de 70 g/L. Este azúcar se hidroliza en glucosa y galactosa por la lactasa del infante para poder ser absorbidas en el intestino.

Proveen el 40% de la energía que necesita el recién nacido, pero también la galactosa participa en la formación de galactolípidos indispensables en la formación del sistema nervioso central. Además de la lactosa, existe una fracción oligosacárida compuesta por más de 150 diferentes oligosacáridos que constituyen alrededor del 1.2% de su composición (comparado con el 0.1% en la leche de vaca) (9, 27).

**Tabla 1.** Composición de la leche humana.

**Proteínas.**

α-Lactoalbúmina  
β-Lactoglobulina  
Caseína  
Enzimas  
Factores de crecimiento  
Hormonas  
Lactoferrina  
Lisozima  
IgA secretora y otras inmunoglobulinas

**Compuestos nitrogenados no proteínicos.**

Creatina  
Creatinina  
Glucosamina  
Ácidos nucleicos  
Nucleótidos  
Poliaminas  
Urea  
Ácido Úrico

**Carbohidratos.**

Lactosa  
Oligosacáridos  
Glicopéptidos  
Factor Bífido

**Lípidos.**

Vitaminas liposolubles (A,D,E y K)  
Carotenoides  
Ácidos grasos  
Fosfolípidos  
Triglicéridos

**Vitaminas hidro-solubles.**

Biotina  
Colina  
Folato  
Inositol  
Niacina  
Ácido pantotenoico  
Riboflavina  
Tiamina  
Vitaminas B12 y B6  
Vitamina C

**Minerales y constituyentes iónicos.**

Citratos, Carbonatos, Fosfatos,  
Sulfatos, Ca, Cl, Mg, K y Na.

**Minerales traza.**

Cr, Co, Cu, F, I, Fe,  
Mn, Mo, Ni, Se y Zn

**Células.**

Células epiteliales  
Leucocitos  
Linfocitos  
Macrófagos  
Neutrófilos

Picciano MF. 2001. Nutrient composition of human milk. *Pediatr. Clin. North Am.* **48**:53–67.

### **Oligosacáridos de leche humana.**

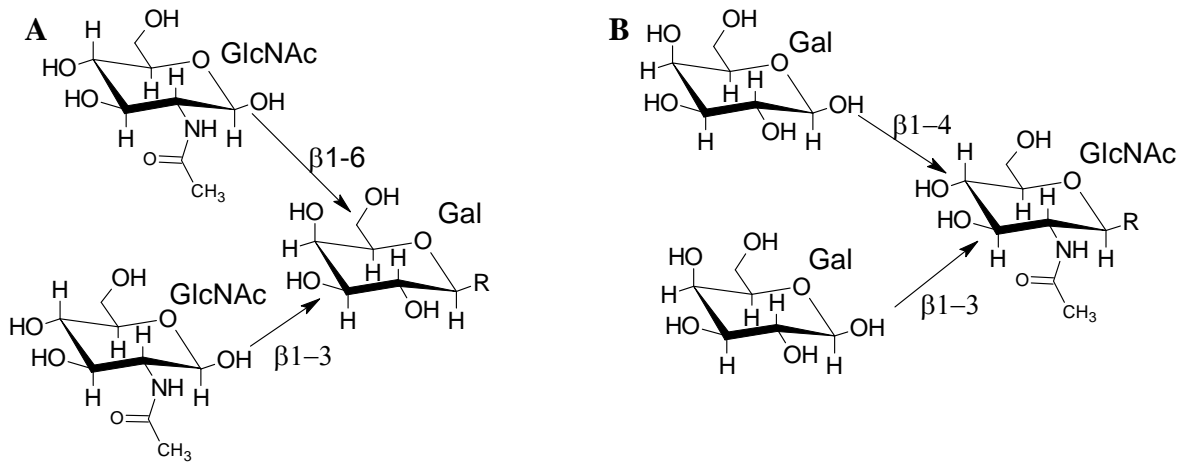
Los oligosacáridos de la leche humana representan una de sus tres fracciones sólidas más abundantes junto con los lípidos y la lactosa. Se encuentran en una concentración de 8-10 g/L y están constituidos por una gran variedad de estructuras que son prácticamente específicas de nuestra especie. A esta fracción se le han adjudicado diversas posibles funciones benéficas para la salud del lactante (3–5, 27, 29).

Dentro de estas funciones se encuentran:

1. Promotores de la microbiota benéfica en el intestino (bifidobacterias, *Bacteroides spp*, etc.).
2. Inhibidores de procesos infecciosos, al actuar como receptores análogos solubles de diversos patógenos.
3. Inmunomoduladores de los procesos inflamatorios, al presentar estructuras que comparten similitud con ligandos de diferentes selectinas (moléculas de adhesión celular, tipo lectina, que median los pasos iniciales del tráfico leucocitario y la formación de complejos plaquetas-neutrófilos).

La fracción oligosacárida de la leche humana está compuesta por más de 150 estructuras formadas por monómeros de D-glucosa (Glc), D-galactosa (Gal), N-acetilglucosamina (GlcNAc), L-fucosa (Fuc) y ácido siálico o ácido N-acetilneuramínico (NeuAc) y prácticamente en todos los casos contienen lactosa en su extremo reductor (7).

Las cadenas principales se van formando por la unión del monómero GlcNAc en posiciones  $\beta$ 1-3 y/o  $\beta$ 1-6 a la Gal y posteriores adiciones de Gal  $\beta$ 1-3 y/o  $\beta$ 1-4, de forma que una gran variedad de estructuras en tamaño y complejidad pueden llegar a sintetizarse (Fig. 1 y 2). Posteriormente, estas estructuras pueden ser “decoradas” con monómeros de Fuc, NeuAc o lactosamina en diferentes posiciones dando lugar a una mayor variación de estructuras. De esta manera se crea una fracción oligosacárida que es prácticamente única para la especie humana en cantidad y diversidad de estructuras (27, 30, 31).



**Figura 1.** Reacciones de glicosilación que participan en la elongación de las cadenas de oligosacáridos en leche humana.

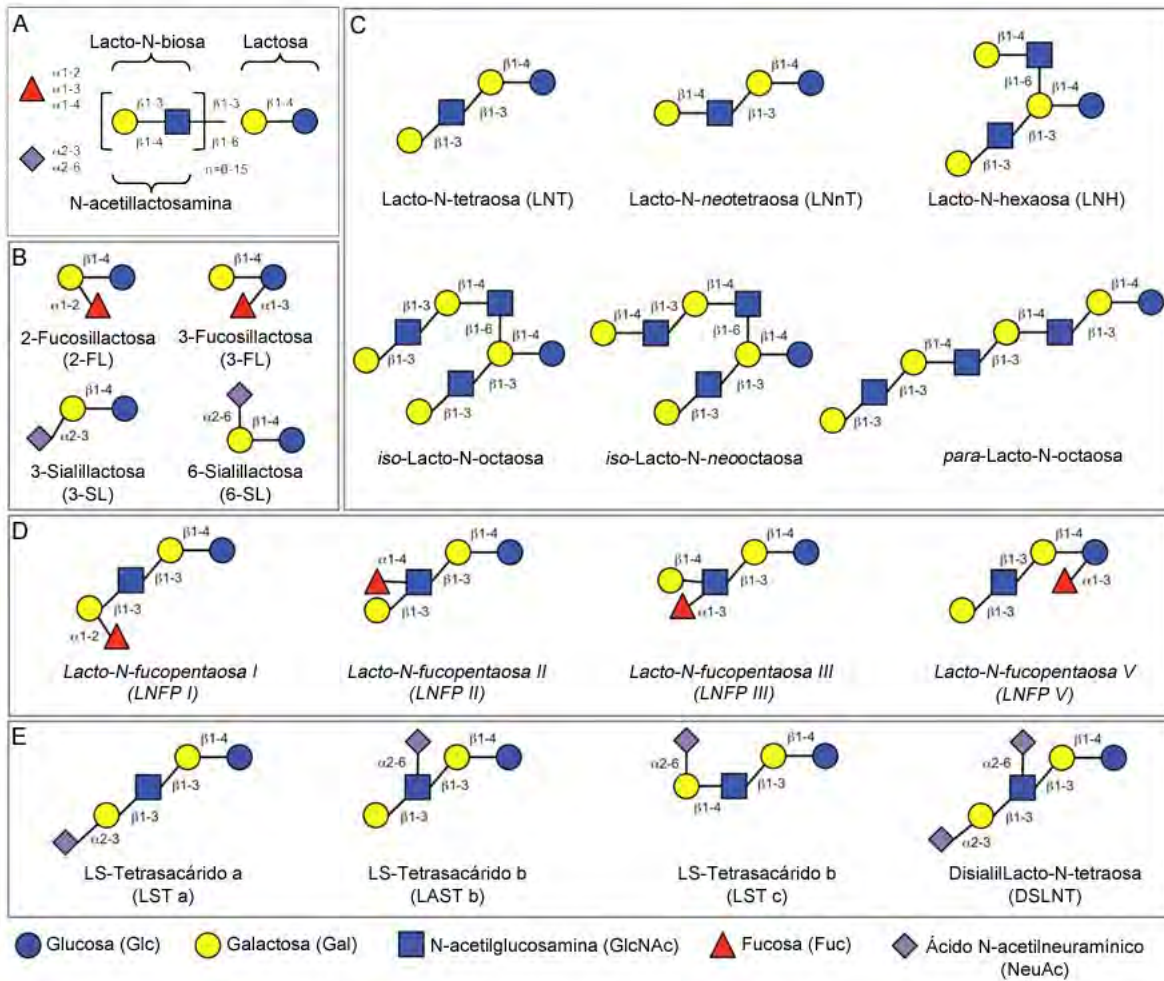
**A.** Unión  $\beta$ 1-3 y  $\beta$ 1-6 de GlcNAc a Gal. **B.** Unión  $\beta$ 1-3 y  $\beta$ 1-4 de Gal a GlcNAc. Gal: Galactosa, GlcNAc: N-acetilglucosamina.

Comúnmente estos oligosacáridos se han clasificado en dos grupos:

1. Fracción ácida. Aquéllos que contienen uno o más residuos de ácido siálico, por lo que están cargados negativamente.
2. Fracción neutra. No contienen ningún residuo con carga. Debido a la alta cantidad de oligosacáridos fucosilados, esta última fracción se ha subdividido en fucosilados y no fucosilados.

Es importante señalar que la fracción oligosacárida de la leche humana presenta notables diferencias con respecto a la leche bovina, ya que mientras en la primera existen una gran cantidad y variedad de oligosacáridos neutros, en la bovina prevalecen los oligosacáridos ácidos, siendo 3-sialil-lactosa la molécula predominante (3, 27).





**Figura 2.** Ejemplos de oligosacáridos de leche humana.

**A.** Principales enlaces que forman las estructuras oligosacáridas. **B.** Fucosilación y sialilación de lactosa. **C.** Elongación de la lactosa por adición de los disacáridos lacto-N-biosa (cadena tipo I) o N-acetylglucosamina (cadena tipo II). La adición de los disacáridos, entre ellos mismos, en unión  $\beta$ 1-3 da lugar a una elongación lineal (*para*), mientras que una unión  $\beta$ 1,6 genera ramificación (*iso*). **D.** Cadenas elongadas tipo I o II pueden ser fucosiladas en diferentes uniones para formar una gran variedad de isómeros, algunos de los cuales son similares a antígenos de grupo sanguíneo. **E.** Las cadenas también pueden ser sialiladas con diferentes uniones y originar diversos isómeros. Modificado de: **Bode L.** 2012. Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. *Glycobiology* 22:1147–62.

### **Oligosacáridos fucosilados.**

Los oligosacáridos presentes en la leche humana son sintetizados por las mismas glicosiltransferasas que participan en la síntesis de las glicoproteínas y glicolípidos de la superficie de diferentes tejidos (muchos de ellos pertenecientes a las diversas familias de grupos sanguíneos), como el gastrointestinal, lo que da lugar a similitudes entre los carbohidratos de la superficie de las células epiteliales y los oligosacáridos presentes en la leche.

Se han reportado diferencias en los patrones de fucosilación en la leche humana. Dichos patrones están determinados por la presencia y/o ausencia de las diferentes fucosiltransferasas que “decoran” los oligosacáridos. La fucosilación  $\alpha 1,2$  está regulada por el gen *FUT2* que codifica para una  $\alpha 1,2$  fucosiltransferasa y que se encuentra presente en alrededor del 80% de los individuos caucásicos, pero que en la población mestiza en México ocurre en el 97%. Las estructuras fucosiladas en posición  $\alpha 1,3$  o  $\alpha 1,4$  están dadas principalmente por la presencia de los genes Lewis y son también responsables de la síntesis de este grupo sanguíneo en la superficie de diversos tejidos. De esta forma, se ha observado que la proporción entre oligosacáridos fucosilados  $\alpha 1,2$  (2-FL, LFN-I, LDFH-I y LDFT) y oligosacáridos fucosilados no  $\alpha 1,2$  (3-FL y LNF-II) varía considerablemente entre individuos con grupo sanguíneo  $Le^{a-b+}$  comparada con la de individuos  $Le^{a-b-}$  (14).

### **Oligosacáridos fucosilados como inhibidores de adherencia.**

Varios estudios han demostrado que diferentes estructuras oligosacáridas presentes en la superficie de algunos tejidos (similares a las presentes en la leche humana) son capaces de unirse a diversos patógenos (Tabla 2). De este principio nace el concepto de receptores homólogos, en donde se postula que los oligosacáridos disueltos en la leche podrían unirse a adhesinas de diversos patógenos y evitar por competencia la colonización del tejido gastrointestinal. Estudios tanto *in vitro* como *in vivo* han demostrado la capacidad de los oligosacáridos de leche humana de inhibir la adherencia de diferentes patógenos a cultivos celulares o modelos animales (17, 18, 32), así como de incrementar la protección contra infecciones gastrointestinales (10).

**Tabla 2.** Patógenos humanos que se adhieren a oligosacáridos.

---

<b>Gastrointestinales</b>	<b>Respiratorios</b>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Bordetella pertussis</i>
<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
<i>Salmonella enterica</i> var typhimurium	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Serratia marcescens</i>	<i>P. cepacia</i>
<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>P. maltophilia</i>
<i>S. flexneri</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Vibrio cholerae</i>	<i>S. senguis</i>
<b>Genitourinarios</b>	<b>Virus</b>
<i>E. coli</i>	VIH
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Influenza
<i>Propionibacterium granulosum</i>	Parvovirus
<i>Proteus mirabilis</i>	Rotavirus
<i>Staphylococcus aureus</i>	Calicivirus
<i>S. saprophyticus</i>	

---

**Kunz C, Rudloff S, Baier W, Klein N, Strobel S.** 2000. Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annu. Rev. Nutr.* **20**:699–722.

Dentro de este tipo de estudios, el grupo del Dr. Ruiz Palacios demostró que niños alimentados al seno materno y con mayor concentración de oligosacáridos fucosilados ( $\alpha$ 1,2) en leche, presentaban una menor incidencia de diarreas. En forma más específica, los niveles altos de 2-fucosil lactosa protegían contra infecciones por *C. jejuni*, mientras que los niveles elevados de lacto-N-difucohexosa protegían contra diarrea por calicivirus (10).

Estudios *in vitro* también han demostrado que fracciones oligosacáridas ricas en estructuras fucosiladas  $\alpha$ 1,2 inhiben en forma importante la adhesión de cepas con fenotipo adherente de *Campylobacter* a cultivos celulares HEp-2. Estas mismas fueron capaces de adherirse a líneas celulares CHO (a las que normalmente no se unen) cuando estas últimas fueron transfectadas con el gen humano *FUT2* ( $\alpha$ 1,2-fucosiltransferasa), provocando la expresión de estructuras de grupo sanguíneo H-2 en su superficie. También se demostró que crías de ratonas transfectadas con el mismo gen humano, y que producían una leche

humanizada con estructuras fucosiladas  $\alpha$ 1,2, tenían una menor colonización por cepas patógenas de *C. jejuni* comparadas con el grupo control (11).

Toda esta evidencia da lugar a más interrogantes y para poder resolverlas es indispensable realizar estudios *in vitro* e *in vivo* en los que el uso de estas estructuras es fundamental. Desafortunadamente, la complejidad para sintetizarlos en forma química y el hecho de que sean casi exclusivos de la especie humana, hace que su obtención sea difícil y costosa. De aquí nace la necesidad de obtener estas moléculas a gran escala y con un costo accesible. Los antígenos de grupo sanguíneo fucosilados también son de gran interés en otras áreas de la biomedicina, ya que se han identificado como posibles marcadores tumorales (33) y se ha demostrado que juegan un papel fundamental en la comunicación de leucocitos vía selectinas (34).

### **Síntesis de oligosacáridos.**

Debido al uso potencial de los oligosacáridos de leche humana como agentes anti-infecciosos, inhibidores de la respuesta inmune mediada por selectinas y marcadores moleculares de algunos tipos de cáncer, su utilidad en diferentes tipos de investigaciones es amplia. La principal fuente de estos azúcares es la leche humana y, debido a la enorme complejidad de estructuras que la componen, su purificación es difícil y costosa. También se han realizado intentos para su síntesis química pero, debido a la gran cantidad de pasos de protección y desprotección utilizados, su precio se incrementa y sus rendimientos son en la escala de miligramos (19). En el caso específico de su posible uso para humanizar fórmulas lácteas o como posibles agentes anti-infecciosos, cabría esperar que las concentraciones a utilizar pudiesen ser por lo menos similares a las encontradas en forma natural en la leche humana, lo que dependiendo de la estructura iría de 0.1 a 1.5 mg/L, razón por la cual es imprescindible contar con un método con la capacidad de obtener cantidades considerables (gramos) a bajos costos.

Diversos reportes en la literatura han descrito síntesis con estas características utilizando sistemas de fermentación con *E. coli* recombinante (20, 35–37). En forma general, estos sistemas aprovechan el uso de diferentes glicosiltransferasas de origen bacteriano que son utilizadas para la síntesis de lipopolisacáridos presentes en su pared celular o en la glicosilación de diversas proteínas (Tabla 3). Aunque la diversidad de

glicosiltransferasas de mamíferos es muy amplia, su naturaleza transmembranal y las modificaciones postraduccionales (en su mayoría son glicoproteínas) hacen que sean inactivas en un sistema de expresión bacteriano. Por el contrario, las glicosiltransferasas bacterianas pueden ser clonadas en *E. coli* y mantener su forma activa con mayor facilidad, además de que tienen una menor especificidad por sus moléculas receptoras, lo que incrementa su utilidad al forzar reacciones de glicosilación hacia receptores similares (37–39).

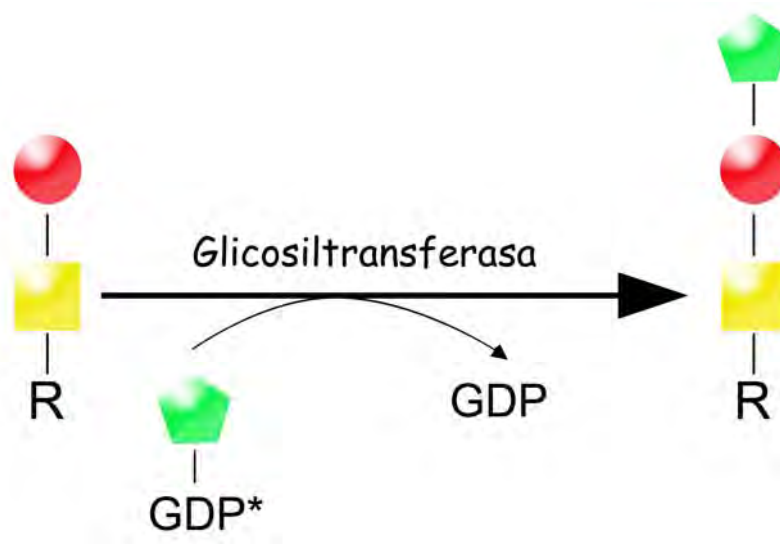
**Tabla 3.** Glicosiltransferasas bacterianas clonadas en *E. coli* y con actividad enzimática.

<b>Enzima clonada</b>	<b>Gen</b>	<b>Bacteria de origen</b>
<b>GalT</b>		
1,4 galactosiltransferasa	<i>lgtB</i>	<i>Neisseria meningitidis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i>
1,4 galactosiltransferasa	<i>cps14J</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
1,4 galactosiltransferasa	<i>hpgalT</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
1,3 galactosiltransferasa	<i>cgtB</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
1,4 galactosiltransferasa	<i>lgtC</i>	<i>N. meningitidis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i>
<b>GlcNAcT</b>		
1,3 N-acetilglucosaminiltransferasa	<i>lgtA</i>	<i>N. meningitidis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i>
1,4 N-acetilglucosaminiltransferasa	<i>nodC</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
<b>GalNAcT</b>		
1,3 N-acetilgalactosaminiltransferasa	<i>lgtC</i>	<i>N. meningitidis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i>
1,4 N-acetilgalactosaminiltransferasa	<i>cgtA</i>	<i>C. jejuni</i>
<b>FucT</b>		
1,3 fucosiltransferasa	<i>HpfucT</i>	<i>H. pylori</i>
1,3 fucosiltransferasa	<i>fucT</i>	<i>H. pylori</i>
1,2 fucosiltransferasa	<i>fucT2 (futC)</i>	<i>H. pylori</i>
1,3/4 fucosiltransferasa	<i>fucT</i>	<i>H. pylori</i>
<b>SiaT</b>		
2,3 sialiltransferasa	<i>lst</i>	<i>N. meningitidis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i>
2,3 sialiltransferasa	<i>cst-I</i>	<i>C. jejuni</i>
2,3 sialiltransferasa	<i>cst-II</i>	<i>C. jejuni</i>
2,6 sialiltransferasa	<i>bst</i>	<i>Photobacterium damsela</i>
2,8/9 sialiltransferasa	<i>neuS</i>	<i>E. coli</i>

**Endo T, Koizumi S.** 2000. Large-scale production of oligosaccharides using engineered bacteria. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 536–541.



Una de las principales complicaciones para lograr una síntesis de oligosacáridos con rendimientos óptimos por procesos de fermentación en *E. coli*, ha sido la limitada disponibilidad de los monosacáridos “activados” que existe en el interior de las células bacterianas y que son los sustratos de las glicosiltransferasas que van adicionando los azúcares a las cadenas por sintetizar (Fig. 4) (36). En el caso de los métodos quimioenzimáticos, el alto costo de estos monosacáridos “activados”, su inestabilidad y difícil purificación han sido los principales problemas (39, 45). En el caso específico de las fucosiltransferasas, la fucosa debe estar activada en forma de GDP-fucosa, molécula que en condiciones normales se encuentra en bajas concentraciones intracelulares y que limita el rendimiento (21).



**Figura 4.** Reacción general de glicosilación.

La síntesis de estructuras glicosiladas es realizada por glicosiltransferasas específicas que van incorporando los diferentes azúcares a la estructura. El azúcar para poder ser utilizado por la glicosiltransferasa debe encontrarse en su forma “activada”, es decir acoplada a un nucleótido mono o difosfatado (UDP-Glc, UDP-Gal, GDP-Man, GDP-Fuc, CMP-Neu5Ac, UDP-Xyl, etc). \*Monosacárido “activado”.

Modificada de: **Weijers C, et al.**, 2008. Glycosyltransferase-catalyzed synthesis of bioactive oligosaccharides. *Biotechnol. Adv.* **26**:436–56.

### **Síntesis de GDP-fucosa.**

Se han reportado dos rutas de síntesis de GDP-fucosa, la llamada *de novo* y la “de rescate” (Fig. 5). La primera ruta está muy conservada y se ha descrito para una amplia variedad de organismos que van desde bacterias, plantas e invertebrados hasta mamíferos. En esta vía se utiliza como precursor GDP-manosa, la cual es transformada en GDP-fucosa

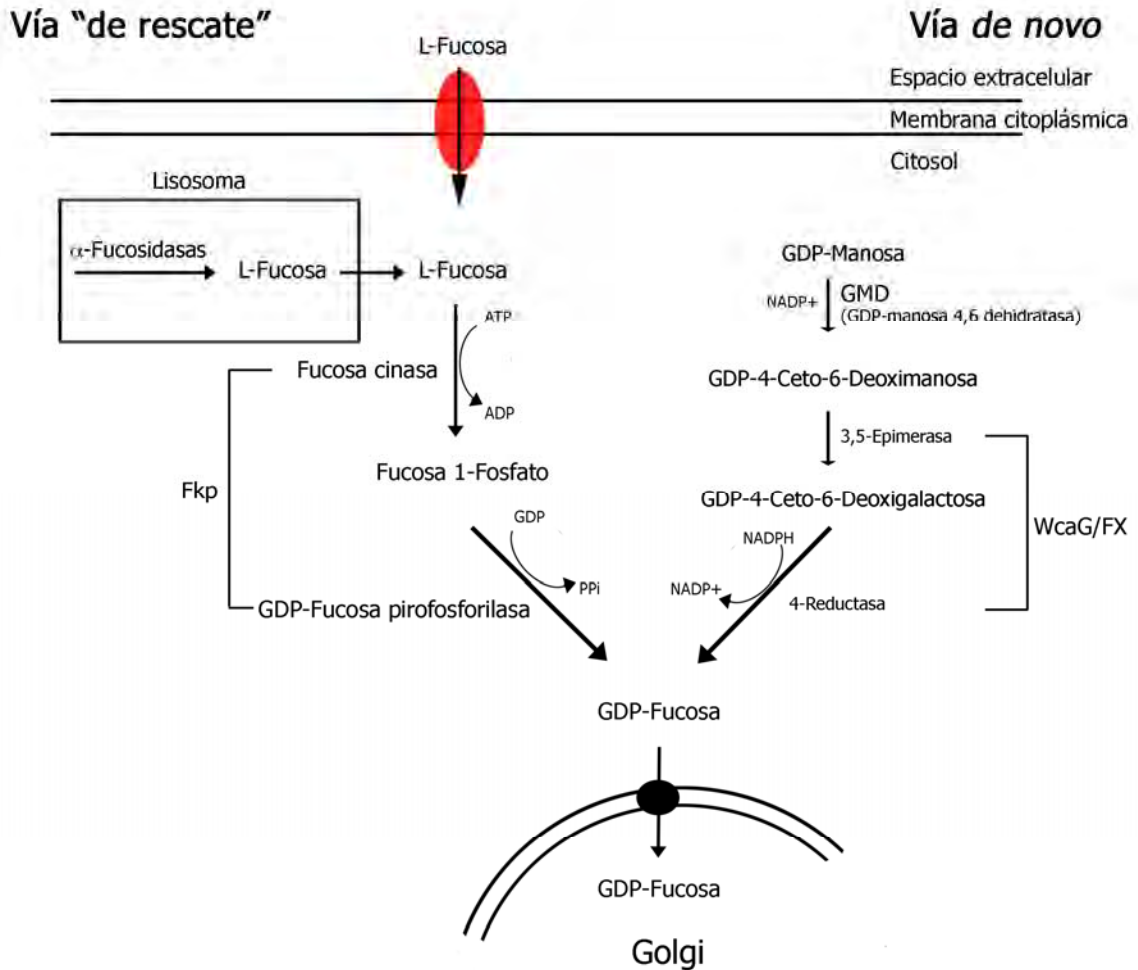
en tres pasos utilizando dos enzimas. En el primer paso la enzima GDP-D-manosa-4,6-dehidratasa (GMD) convierte la GDP-manosa en un intermediario inestable, GDP-4-Ceto-6-deoxi-D-manosa, mediante una reacción de deshidratación, reacción co-dependiente de NADP. Posteriormente, la enzima bifuncional GDP-4-Ceto-6-deoxi-D-manosa-3,5-epimerasa-4-reductasa (WcaG en *E. coli*, FX en el humano) epimeriza los carbonos C-3 y C-5, lo que ocasiona un cambio de la configuración D- a L- dando lugar a la molécula GDP-4-ceto-6-deoxi-L-galactosa. Por último, la actividad reductasa de esta enzima cataliza la transferencia de un H<sup>+</sup> desde el cofactor NADPH al grupo ceto, produciendo GDP-L-fucosa y NADP<sup>+</sup>. Dentro de esta serie de reacciones el producto final GDP-L-fucosa inhibe la actividad de la enzima GMD, lo que ha provocado un bajo rendimiento (menos de 1g/L) cuando se ha querido producir mediante métodos de fermentación (23, 47, 48).

Es justamente esta ruta, mediante diferentes enfoques, la que diversos grupos han utilizado para alimentar los sistemas que utilizan las fucosiltransferasas de *H. pylori* en la producción de fucooligosacáridos mediante procesos biotecnológicos (20, 22, 40, 49). Alberman *et al.* subclonaron y sobreexpresaron los genes *gmd* y *wcaG* de *E. coli*, logrando mediante extractos celulares alimentar un sistema de producción de 2-FL utilizando la enzima FucT2 de *H. pylori* semipurificada, con rendimientos del 65% (20). Por otro lado, Samain *et al.* modificaron genéticamente una cepa de *E. coli* inactivando el gen *wcaJ* que se encuentra involucrado en la síntesis de ácido colánico, el cual es parte del polisacárido extracelular que producen en forma natural diferentes enterobacterias. Esta estructura se encuentra compuesta por unidades de L-fucosa y durante su síntesis es la principal consumidora de la GDP-fucosa producida por la bacteria. Al mismo tiempo, estos investigadores sobreexpresaron el activador transcripcional RcsA que incrementa parte del conjunto de genes involucrados en la síntesis de GDP-fucosa (Gmd, WcaG). Con estas modificaciones lograron aumentar las concentraciones intracelulares de GDP-fucosa lo suficiente como para obtener una producción de oligosacáridos fucosilados en la escala de g/L utilizando las fucosiltransferasas de *H. pylori* (40, 41). Una estrategia adicional fue reportada por Kozumi *et al.*, quienes manipularon cinco cepas bacterianas para generar oligosacáridos fucosilados tipo Lewis<sup>x</sup>. En este caso utilizaron una cepa de *Corynebacterium ammoniagenes* para regenerar el GMP de la reacción a GTP. Altas concentraciones de GDP-Manosa fueron producidas por una *E. coli* con los genes



necesarios para su síntesis a partir de glucosa. Posteriormente, la conversión de GDP-manosa a GDP-fucosa se realizó con dos cepas de *E. coli* con los genes *gmd* y *wcaG* clonados y sobreexpresados. Por último, en otra cepa de *E. coli* clonada con la fucosiltransferasa  $\alpha$ 1,3 de *H. pylori* lograron acoplar la fucosa a una molécula de lactosa, con rendimientos de hasta 21 g/L (22). También han habido intentos por aprovechar la gran cantidad de GDP-manosa que producen las levaduras (debido a la hipermanosilación característica de ellas), donde se han clonado y sobreexpresado los genes *gmd* y *wcaG* de *E. coli*, incrementando las concentraciones intracelulares de GDP-fucosa (50) con la posibilidad de utilizarla en la síntesis de fucosilados (23).

La segunda ruta de síntesis de GDP-fucosa es la llamada ruta “de rescate” (Fig. 5). Esta vía aprovecha la L-fucosa proveniente de la degradación lisosomal u obtenida directamente de la nutrición. En un primer paso, la enzima L-fucosa cinasa fosforila la L-fucosa utilizando ATP para formar ADP y L-fucosa-1-fostato, que es convertida posteriormente a GDP-L-fucosa por la enzima GDP-L-fucosa pirofosforilasa (también designada como fucosa-1-fostato guanililtransferasa) (51). Esta ruta ha sido ampliamente reportada en células de mamíferos y otras eucariotas. Recientemente Coyne *et al.* han descrito un sistema similar para una bacteria (*Bacteroides fragilis* 9343) que al parecer es conservado para todas las especies de *Bacteroides* (24). En este caso, una enzima bifuncional llamada Fkp que comparte en su región amino terminal una alta identidad (40%) con la enzima humana GDP-L-fucosa pirofosforilasa, y en su extremo amino terminal con la L-fucosa cinasa de mamíferos, es capaz de activar la L-fucosa a GDP-fucosa en la misma forma que la ruta “salvaje”. La naturaleza bacteriana de esta enzima hace que sea factible su utilización en sistemas de fermentación en *E. coli* para la producción de oligosacáridos fucosilados utilizando L-fucosa como sustrato. Estudios *in vitro* han demostrado la posibilidad de utilizar esta enzima para alimentar procesos de fucosilación (45).



**Figura 5.** Rutas de síntesis de GDP-fucosa.

La vía *de novo* utiliza como sustrato inicial GDP-manosa que es convertida a GDP-4-Ceto-6-deoximanosa por la enzima GMD. Posteriormente, este intermediario es transformado en GDP-fucosa mediante dos pasos catalizados por la enzima WcaG con actividad de epimerasa/reductasa (FX en humanos). La vía "de rescate" hace uso de la L-fucosa libre (proveniente de la alimentación o del catabolismo de otros glicoconjugados), para activarla a GDP-fucosa mediante dos pasos enzimáticos. En el caso particular de *B. fragilis* estas dos reacciones son catalizadas por la enzima bifuncional Fkp. En un primer paso la fucosa es fosforilada con su actividad cinasa para posteriormente activarla a GDP-fucosa utilizando GDP mediante su función de GDP-fucosa-pirofosforilasa.

Modificada de: **Becker et al.** 2003. Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology* 13:41R-53R

## JUSTIFICACIÓN.

Es notable el renovado interés que durante los últimos 10 años ha recibido la glicobiología. La gran cantidad de procesos en los que participan los azúcares y sus conjugados para explicar una gran variedad de fenómenos biológicos ha dado lugar a nuevas áreas de interés. Desafortunadamente, estos avances se han visto obstaculizados en parte debido a la limitada cantidad con la que se pueden obtener muchas de estas moléculas, ya sea porque su síntesis es compleja y costosa o por su difícil purificación, obteniéndose cantidades limitadas a precios muy elevados (52).

Dentro de este grupo de sustancias se encuentran los azúcares fucosilados, moléculas ubicuas que forman parte de los glicoconjugados de sistemas de grupo sanguíneo ABO y Lewis en la superficie de los eritrocitos y de diferentes tejidos, así como de diversos glicolípidos, glicoproteínas y en forma de oligosacáridos solubles en líquidos corporales como saliva, sangre y leche. Su implicación en procesos de compatibilidad y rechazo a transfusiones sanguíneas, adhesión de leucocitos al endotelio mediada por selectinas, interacciones bacteria-huésped, procesos ontogénicos y como marcadores tumorales hace de estas estructuras valiosos elementos de estudio (53–55).

Como ya se mencionó en la introducción, diversos estudios realizados en el Departamento de Infectología del INCMNSZ han ayudado a dilucidar el papel de estos oligosacáridos fucosilados presentes en la leche humana como agentes protectores contra patógenos entéricos (10–12). Pero, para profundizar y ampliar estos estudios es necesario realizar más ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*, sin embargo, estos se han visto obstaculizados por la dificultad de contar con este tipo de azúcares con la cantidad y pureza necesarias para continuar con los mismos. Es por esto que es de gran interés contar con sistemas de síntesis eficientes y económicos para la producción de estos azúcares.

Aunque diferentes grupos se han dado a la tarea de sintetizar este tipo de estructuras utilizando fucosiltransferasas bacterianas con diferentes grados de éxito en sistemas quimioenzimáticos y de fermentación (56, 57), el contar con sistemas adicionales podría ser de gran utilidad en la producción de este tipo de oligosacáridos, de aquí que proponemos la utilización de la enzima Fkp de *B. fragilis*, capaz de sintetizar GDP-fucosa a partir de L-fucosa, en la síntesis de 2-FL (oligosacárido fucosilado más abundante en leche de madres

secretoras). De esta forma contaríamos con un compuesto de gran valor en el estudio de la protección que confieren estas moléculas en la leche humana y resolveríamos uno de los pasos limitantes de su síntesis y que pudiera servir de paradigma en la síntesis de otros oligosacáridos fucosilados. Cabe señalar que diversas áreas de estudio se verían beneficiadas con la obtención de este tipo de moléculas debido al gran número de fenómenos biológicos en los que se ha implicado su participación. A manera de ejemplos, se podría mencionar la posibilidad de utilizar estas moléculas para complementar fórmulas lácteas y determinar si se mantienen los efectos benéficos en el lactante o comprobar su función como compuestos prebióticos.

## **HIPÓTESIS.**

El gen (*fkp*) de *Bacteroides fragilis*, que codifica para una enzima bifuncional con actividad de L-fucosa cinasa/GDP-L-fucosa pirofosforilasa, al ser clonado y sobreexpresado en *E. coli*, transforma L-fucosa a GDP-fucosa para ser utilizada por fucosiltransferasas recombinantes que producen oligosacáridos fucosilados mediante procesos de fermentación.

## **OBJETIVO GENERAL.**

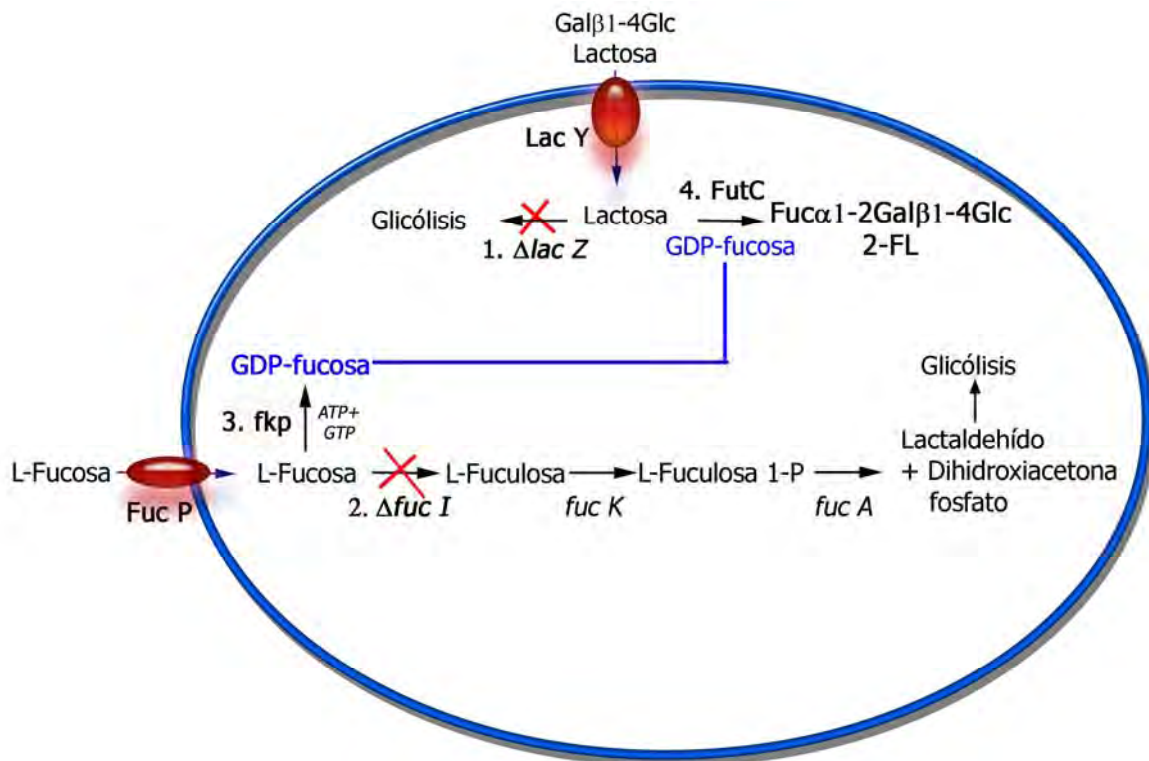
Sintetizar 2-fucosil lactosa (2-FL) mediante un proceso de fermentación en *E. coli* (JM107) modificada por ingeniería genética.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

1. Modificar mediante mutaciones específicas las vías catabólicas de lactosa y fucosa de la cepa de *E. coli* JM107 para evitar su degradación y que puedan servir como sustratos para la síntesis de 2-FL.
2. Clonar el gen *futC* (fucosiltransferasa  $\alpha$ 1,2) de *H. pylori*, modificar su región homopolimérica y subclonarlo en el plásmido pET-21a+.
3. Clonar los genes *fkp* (L-fucosa cinasa/GDP-L-fucosa pirofosforilasa) de *B. fragilis* y *fucR* de *E. coli* en el plásmido pBBR3MCS.
4. Transformar la cepa modificada en el Objetivo 1 con los plásmidos construidos en los Objetivos 2 y 3, y comprobar la síntesis de 2-FL mediante un proceso de fermentación en medio mínimo complementado con D-lactosa y L-fucosa.

## DISEÑO EXPERIMENTAL.

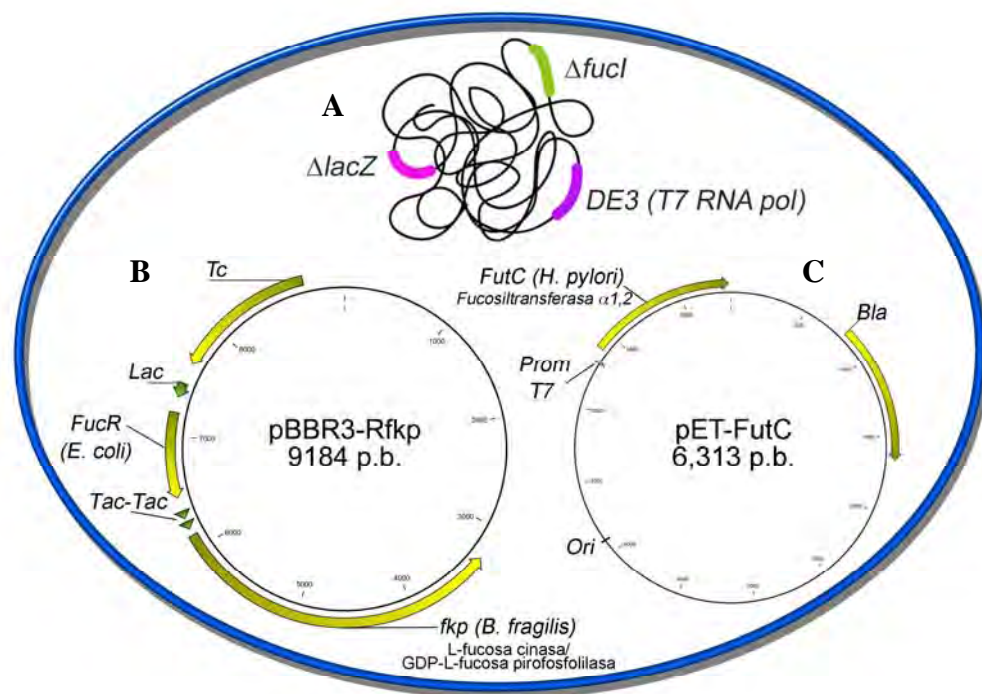
El objetivo principal del presente trabajo consistió en lograr la síntesis del tetrasacárido 2-FL mediante un proceso de fermentación en una cepa modificada de *E. coli* utilizando como sustratos D-lactosa y L-fucosa. En este esquema, se planteó que la cepa tendría la capacidad de transportar intracelularmente estos azúcares (utilizando su permeasa específica) y, en lugar de degradarlos, permitir que la enzima clonada y sobreexpresada Fkp de *B. fragilis* active la L-fucosa a GDP-fucosa y una vez activada la enzima FutC de *H. pylori* la utilice como sustrato para incorporarla a la molécula de D-lactosa con la consecuente producción de 2-FL (Fig. 6).



**Figura 6.** Síntesis de 2-FL a partir de D-lactosa y L-fucosa en una cepa modificada de *E. coli*.

Mecanismo propuesto para la síntesis de 2-FL en la cepa de *E. coli* 2-FL/fkp. La L-fucosa y D-Lactosa son internalizadas a la bacteria mediante las permeasas FucP y LacY. Una vez dentro, estas moléculas no son degradadas debido a las mutaciones en los genes *fucI* (L-fucosa isomerasa) y *lacZ* ( $\beta$ -galactosidasa), permitiendo que la enzima Fkp (L-fucosa cinasa/GDP-L-fucosa pirofosforilasa) de *B. fragilis* active la L-fucosa a GDP-fucosa, la cual puede ser utilizada por la enzima FutC ( $\alpha$ 1,2-fucosiltransferasa) junto con la D-Lactosa para sintetizar 2-FL.

Las modificaciones a la cepa consistieron en mutar los genes que sintetizan las enzimas que inician la degradación de L-fucosa (*fucI*) y D-lactosa (*lacZ*), y clonar los plásmidos pET-FutC, que contiene el gen *futC* de *H. pylori* bajo el promotor T7, y pBB3-Rfcp con los genes *fkp* de *B. fragilis* y *fucR* de *E. coli* y que es el activador transcripcional del operon *fuc* y necesario para que se exprese la permeasa de L-fucosa (*fucP*) e incorporar el gen T7 RNA polimerasa mediante la inserción del casete  $\lambda$ DE3.



**Figura 7.** Cepa de *E. coli* JM107 modificada genéticamente.

Modificaciones propuestas a la cepa *E. coli* JM107 (2FL/fkp). **A.** Mutación (por delección) de los genes *lacZ* ( $\beta$ -galactosidasa) y *fucI* (L-fucosa isomerasa) e inserción del casete  $\lambda$ DE3. **B.** Clonación del plásmido pBB3-Rfcp con los genes *fucR* de *E. coli* (activador transcripcional del operón *fuc*) bajo el promotor *lac* y *fkp* (enzima bifuncional L-fucosa cinasa/GDP-L-fucosa pirofosforilasa) de *B. fragilis* bajo el promotor *tac-tac*; y **C.** Clonación del plásmido pET-FutC con el gen *futC* ( $\alpha$ 1,2-fucosiltransferasa) de *H. pylori* bajo el promotor T7.

## MÉTODOS.

Las mutaciones y clonaciones del presente trabajo se realizaron en la cepa de *Escherichia coli* JM107 (ATCC<sup>®</sup> 47014) (58). Esta bacteria pertenece a una familia de cepas (JM101, JM107, JM109, etc.) provenientes de la cepa K-12 y han sido utilizadas ampliamente en métodos de biología molecular y procesos de fermentación para expresar proteínas recombinantes (59, 60).

Los métodos generales de biología molecular (sembrado, aislamiento, modificaciones del ADN, electroforesis, etc.) se llevaron a cabo siguiendo las técnicas descritas por Sambrook *et al.* (61).

Las electroporaciones se realizaron mezclando 1µL de plásmido (aproximadamente 10 ng) en 50 µL de la cepa competente (61) y utilizando el electroporador Gene Pulser II (Bio-Rad) con los siguientes parámetros: 1000Ω, 25µF y 1.8kV.

La purificación de productos de PCR, limpieza de modificaciones enzimáticas y purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa se realizaron utilizando los productos comerciales “MiniElute PCR Purification Kit”, “Kit MiniElute Reaction Cleanup Kit” y “MiniElute Gel Extraction”, siguiendo los procedimientos del manual “MiniElute Handbook 2008” (QIAGEN).

Tanto la purificación de los plásmidos como las reacciones de ligación se realizaron utilizando los productos “High Pure Plasmid Isolation Kit” y “Rapid DNA Ligation Kit” (Roche), al igual que las enzimas de restricción.

Las reacciones de PCR en donde fue necesaria una alta fidelidad del amplificado se realizaron con la polimerasa “Pfx AccuPrime” (Invitrogen), mientras que las reacciones de PCR para comprobar modificaciones o clonaciones se realizaron con el sistema “GeneAmp<sup>®</sup>” con la enzima AmpliTaq<sup>®</sup> (Applied Biosystems).

En la clonación de los productos de PCR se utilizó el sistema comercial “Zero Blunt<sup>®</sup> TOPO<sup>®</sup> PCR Cloning kit for sequencing” (Invitrogen).

Las lecturas de secuenciación se realizaron en el secuenciador 3130xL Genetic analyzer (Applied Biosystems).

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se encuentran el Anexo 1. Todos se sintetizaron utilizando el servicio de síntesis de Sigma-Aldrich.



## **Objetivo Específico 1.**

*Modificar mediante mutaciones específicas las vías catabólicas de lactosa y fucosa de la cepa de E. coli JM107 para evitar su degradación y que puedan servir como sustratos para la síntesis de 2-FL.*

### **1. Mutación del gen *FucI*.**

La L-fucosa es catabolizada en *E. coli* a través de una vía inducible mediante la acción sucesiva de una L-fucosa permeasa (FucP), una L-fucosa isomerasa (FucI), una L-fuculosa cinasa (FucK), una L-fuculosa aldolasa (FucA) y una óxido-reductosa (FucO), codificadas en dos operones *fucPIK* y *fucAO* y controlada su expresión por el activador transcripcional *fucR* que se encuentra río arriba de *fucK* (62, 63). Con el objetivo de mantener la permeasa y eliminar el primer paso de la degradación de la fucosa, se realizó la mutación de *fucI* mediante su reemplazo por recombinación alélica (utilizando un plásmido suicida) por un gen inactivo en el cual se eliminaron 500 pb internos.

Este gen se sintetizó mediante PCR utilizando la técnica de extensión por sobreposición (Overlap Extension PCR) y que a partir de este punto se designará como OE-PCR (64, 65).

En el primer paso se amplificó el extremo 5' de gen con los iniciadores *fucIa-F/fucIa-R*, y el extremo 3' utilizando los iniciadores *fucIb-F/fucIb-R*. En ambos casos las condiciones de PCR fueron 30 ciclos con desnaturalización a 95°C por 30 s, alineamiento a 50°C por 30 s y extensión a 68°C durante 2 min. Posteriormente, una mezcla de ambos productos se amplificó utilizando los iniciadores *fucIa-F/fucIb-R* utilizando las mismas condiciones a excepción de la temperatura de alineamiento que se aumentó a 55°C. Este gen modificado se clonó en el vector comercial pCR4-Blunt y se subclonó en el vector pBK-CMV utilizando los sitios EcoRI de ambos elementos. Por último, el fragmento se subclonó utilizando los sitios de reconocimiento para HindIII y Sall en el plásmido suicida pMARK-705 (66), para generar el vector pMARK-*fucI*. El plásmido se transformó por electroporación (61) en la cepa JM107 y se sembró por dilución en cajas de agar LB con Cm (20 mg/L) a 42°C para aislar células con el plásmido co-integrado. Después de una siembra extra a 42°C se cultivó en caldo LB+Cm a 28°C para favorecer la replicación autónoma del plásmido y provocar la recombinación homóloga del gen. Después de cinco resiembras en medio fresco sin antibiótico se sembró en placas de agar McConkey con L-

fucosa (0.4%) como única fuente de carbono. Se seleccionaron aquellas cepas fucosa negativas ( $fuc^-$ ) y se resembraron en LB+Cm para confirmar que no tuvieran el plásmido integrado (Cm<sup>r</sup>). La incapacidad de utilizar la fucosa como fuente de energía se confirmó en caldo rojo de fenol con L-fucosa (1%), y el genotipo, por PCR con los iniciadores fuc1a-F y fuc1bR.

En este proceso de modificación de la bacteria, y debido a que en el diseño está considerado expresar una proteína bajo el promotor de la T7 ARN polimerasa (Objetivo específico 2), fue necesario insertar el casete  $\lambda$ DE3 en la bacteria. Éste es un fago recombinante comercial que lleva clonado el gen de la T7 RNA polimerasa bajo el control del promotor *lacUV5* y que cuando se inserta en el cromosoma bacteriano adquiere la capacidad de expresar la polimerasa. Esto se llevó a cabo utilizando el sistema  $\lambda$ DE3 Lysogenization kit (Novagen).

## 2. Mutación del gen *lacZ*.

El operón *lac* es el encargado de la internalización y degradación de la lactosa en *E. coli*. Es probablemente el operón mejor estudiado y representa un paradigma de la regulación genética en bacterias. Está constituido por tres genes estructurales, *lacY*, *lacZ* y *lacA*, que codifican para una permeasa de galactósidos, una  $\beta$ -galactosidasa y una acetil transferasa (que no participa en la degradación). Mientras que la permeasa participa en el transporte de la lactosa al interior de la bacteria, la  $\beta$ -galactosidasa es la responsable de la escisión de la lactosa a glucosa y galactosa para su posterior incorporación a la glucólisis. Al mutar este gen se previene el desdoblamiento de la lactosa y queda disponible para ser utilizada como sustrato en la síntesis de 2-FL.

La cepa utilizada de *E. coli* JM107 contiene el gen *lacY*, mientras que la región del gen *lacZ* se ha eliminado por completo dando un fenotipo  $lac^-$  (58). Cuenta con un episoma con genotipo *lacZ* $\Delta$ M15 (que complementa con el fragmento  $\alpha$  de *lacZ* de diversos plásmidos y que sirve para la selección de colonias azul-blancas durante la clonación de fragmentos que interrumpen este fragmento). Desafortunadamente, también se ha reportado que el fago  $\lambda$ DE3 complementa el gen dando lugar al fenotipo  $lac^+$ , razón por la cual fue necesario mutar nuevamente este gen y sustituirlo por una versión inactiva del mismo siguiendo los pasos de Dumon *et al.* (40). En nuestro caso decidimos mutar directamente la

cepa después de la infección con el fago  $\lambda$ DE3. Esta mutación se realizó por recombinación homóloga, reemplazando el gen por una versión modificada e inactiva.

El gen *lacZ* modificado se sintetizó mediante OE-PCR (64, 65), generando una versión del mismo en donde se eliminaron 1,629 pb internos dando lugar a una proteína trunca e inactiva. Como primer paso, y utilizando como templado ADN total de la cepa de *E. coli* JM109 (Stratagene), se amplificaron por separado los extremos 3' y 5' del gen con los iniciadores Z5-1/Z5-2 y Z3-1/Z3-2, respectivamente (40). En un segundo paso se sintetizó el gen modificado mezclando 10 ng del producto de ambas reacciones (previamente purificado y cuantificado) y llevando a cabo un tercer PCR con los iniciadores Z5-1 y Z5-2. El producto se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa. El gen modificado se clonó en el vector comercial pCR4-Blunt para generar el vector pCR4-lacZ y subclonarlo en el vector pBK-CMV utilizando la enzima de restricción *EcoRI*. Por último, y mediante digestión con *SacI* y *XbaI* se subclonó en el vector suicida pDS132 para construir el vector pDS-lacZ. Este plásmido se electroporó en la cepa JM107 y se sembró en agar LB adicionado con cloranfenicol (Cm) 20mg/ml a 42°C para aislar los plásmidos co-integrados en el genoma, ya que a esta temperatura el plásmido no puede autoreplicarse. Posteriormente, se incubaron en caldo LB complementado con Cm a 28°C durante 24 h, resemebrando en medio fresco (sin antibiótico) durante 5 días para propiciar la replicación del plásmido, la recombinación homóloga del gen *LacZ* por el gen truncado  $\Delta$ *LacZ* y la pérdida del plásmido recombinado, ya que no hay presión selectiva del antibiótico. Finalmente, se sembró por dilución en cajas Petri con agar McConkey y se seleccionaron las cepas con fenotipo *lac*<sup>-</sup>. Se comprobó la sensibilidad a Cm de estas clonas (indicador de que han perdido por completo el plásmido) y se verificó mediante PCR la longitud del gen. El fenotipo final se confirmó con la incapacidad de la cepa para fermentar la lactosa en caldo rojo de fenol complementado con este azúcar al 1% y el desarrollo en cajas de agar M9 complementado con tiamina para verificar la presencia del episoma que contiene el gen *proAB* y complementa la delección  $\Delta$ lac-*proAB* de la cepa JM107 (58).

## **Objetivo Específico 2.**

*Clonar el gen futC (fucosiltransferasa  $\alpha$ 1,2) de H. pylori, modificar su región homopolimérica y subclonarlo en el plásmido pET-21a+.*

La enzima  $\alpha$ 1,2 fucosiltransferasa (FutC) de *H. pylori* participa en la adición de estructuras fucosiladas en su lipopolisacárido (LPS) y se cree que estas estructuras contribuyen a la patogénesis de la bacteria al mimetizar estructuras tipo Lewis y evadir la respuesta inmune (42). Aunque esta enzima agrega L-fucosa a las terminaciones  $\beta$ Gal de su LPS, se ha reportado que tiene cierto grado de afinidad para diferentes sustratos, por lo que ha sido utilizada para sintetizar estructuras fucosiladas *in vitro* (20, 41).

El gen que codifica para esta enzima cuenta con una región homopolimérica (43) que provoca una alta frecuencia de mutaciones, dando lugar a variaciones antigénicas de estas estructuras fucosiladas mediante un mecanismo de desplazamiento del marco de lectura por mal alineamiento de las secuencias (slipped strand misparing mechanism), por lo que se modificó esta región de poli CCC por una región más estable de CCA siguiendo la metodología propuesta por Samanin *et al.* (41).

A partir de un banco de genes *futC* clonados de cepas de *H. pylori* aisladas de muestras clínicas y pertenecientes al cepario del Departamento de Infectología del INCMNSZ, se comparó su secuencia y se determinó utilizar aquéllas que mostraran un marco de lectura completo y una mayor similitud con la secuencia del gen *futC* (HP 0094) de la cepa prototipo 25695, y en la cual se han basado los estudios de su caracterización (42, 43, 67).

El gen previamente clonado en el vector pBK-CMV se amplificó utilizando la técnica de OE-PCR con el objetivo de modificar su región homopolimérica. En un primer paso se utilizaron los iniciadores Fuct2-P1/Fuct2-P2 para amplificar la región 5' del gen, y Fuct2-P3/Fuct2-P4 para amplificar la región 3'. Los productos de amplificación de ambas reacciones se mezclaron para, posteriormente, mediante un tercer PCR con los iniciadores Fuct2-P1 y Fuct2-P4, amplificar el gen en su totalidad con la región homopolimérica modificada (41).

El producto de PCR se clonó en el vector comercial pCR4-Blunt para generar el nuevo plásmido pCR4-FutC. Posteriormente, utilizando las enzimas de restricción EcoRI y

XbaI, este gen se subclonó en el vector pET-21a+ para construir el nuevo vector pET-FutC. Finalmente, se comprobó la secuencia clonada utilizando los iniciadores T7-Terminator y T7-Promoter (Invitrogen).

### **Objetivo Específico 3.**

*Clonar los genes fkp (L-fucosa cinasa/GDP-L-fucosa pirofosforilasa) de B. fragilis y fucR de E. coli en el plásmido pBBR3MCS.*

Debido a que el gen *fkp* es aparentemente ubicuo entre todas las cepas de *B. fragilis*, se utilizó una cepa silvestre para su clonación. Como ya se mencionó en la Introducción, este gen de 2,850 pb contiene dominios funcionales en ambos extremos, razón por la cual se decidió clonarlo completo y sin modificaciones.

Con la idea de activar la expresión de la permeasa *fucP* durante la fermentación para facilitar la incorporación del monosacárido al interior celular, también se decidió clonar el activador transcripcional *fucR*.

Debido a que en el sistema propuesto era necesaria la presencia de dos plásmidos para soportar la cantidad de genes clonados, se utilizó el plásmido pBBR3MCS (68), con origen de replicación compatible con el plásmido pET-21a+ (utilizado en el Objetivo Específico 2), para clonar tanto el activador *fucR* como el gen *fkp* de *B. fragilis*. Con la idea de garantizar una expresión adecuada del gen *fkp* se colocó este gen bajo el promotor tac-tac, que presenta una mayor actividad que el promotor *lac* (69), mientras que el gen *fucR* se clonó bajo el promotor *lac*, que se encuentra originalmente en el plásmido pBBR3MCS.

Utilizando ADN de una cepa silvestre de *B. fragilis* aislada de una muestra clínica en el Departamento de Infectología del INCMNSZ, se amplificó el gen *fkp* utilizando los iniciadores Fkp-1 y Fkp-2. El PCR se realizó durante 35 ciclos con desnaturalización a 95°C por 30 s, alineamiento a 58°C durante 30 s y extensión a 68°C por 3 min; por último un paso final de extensión a 68°C por 7 min. El producto se clonó en el vector pCR4Blunt-TOPO, se secuenció utilizando los iniciadores Fkp-1, Fkp-2, FkpS-1, FkpS-2, FkpS-3 y FkpS-4 y se comparó con la secuencia reportada por Comstock *et al.* (24).

El gen se liberó del plásmido utilizando la enzima BamH1 y se subclonó utilizando el mismo sitio de restricción en el vector pCW-Ori (70). Posteriormente se verificó y seleccionó la construcción en donde el gen estuviera bajo el promotor Tac-Tac (69).

El gen *fucR* se amplificó a partir de ADN total de la cepa JM109 de *E. coli* utilizando los iniciadores Fuc-F/Fuc-R (30 ciclos, con desnaturalización a 95°C por 30 s, alineamiento a 65°C por 30 s y extensión a 68°C durante 1 min; y un paso de extensión final a 68° por 7 min). Este producto de PCR se clonó en el vector comercial pCR4Blunt-TOPO para generar el plásmido pCR4-FucR. Este último plásmido se digirió con la enzima EcoRI y se subclonó en el sitio EcoRI del vector pBK-CMV para construir el plásmido pBK-FucR.

Para lograr esta construcción, el plásmido pBK-FucR se digirió con las enzimas XhoI/PstI, y el fragmento que contiene *fucR* se subclonó en los mismo sitios del plásmido pBBR1MCS3. De esta forma, *fucR* quedó bajo el control del promotor *Lac* de este plásmido. Esta nueva construcción se nombró pBB3-fucR.

Posteriormente, utilizando como patrón el plásmido pCW-fkp y mediante una reacción de PCR utilizando los iniciadores pCWLgtA-F/pCWLgtA-R, se amplificó el gen *fkp* bajo el promotor Tac-Tac. Este producto se digirió con XbaI y se clonó en el plásmido pBB3-FucR previamente digerido con XbaI/SmaI para generar el plásmido pBBR3-Rfkp.

#### **Objetivo Específico 4.**

*Transformar la cepa modificada en el Objetivo 1 con los plásmidos construidos en los Objetivos 2 y 3, y comprobar la síntesis de 2-FL mediante un proceso de fermentación en medio mínimo complementado con D-lactosa y L-fucosa.*

Una vez obtenidos los plásmidos pET-FutC y pBBR3-Rfkp, se transformaron por electroporación (61) en la cepa JM107 (*fuc*<sup>-</sup>, *lac*<sup>-</sup>, DE3). Esta nueva cepa se nombró ***E. coli* 2-FL/fkp**.

Para comprobar la producción de 2-FL primero se realizó un ensayo en matraz. En este caso se cultivó la bacteria durante toda la noche en 4 mL de caldo LB adicionado con carbenicilina (Cb) 100mg/L y tetracilina (Tc) 12.5 mg/L a 37°C en agitación constante (260 rpm), para posteriormente inocular 50 mL de caldo M9 adicionado con los mismos

antibióticos e incubando durante 24hr a 37°C a 260 r.m.p. en matraces Erlenmeyer bafleados de 250 mL. Después de este tiempo, se centrifugó el medio en condiciones de esterilidad (5,000 rpm/15 min) y se cambió el sobrenadante por medio M9 + antibiótico fresco complementado con D-lactosa (2.5 g/L), L-fucosa (2.5 g/L) e IPTG (50mg/L) como inductor y se incubó en las mismas condiciones por 24 h. Se procedió a separar el sobrenadante del paquete celular por centrifugación (5,000 rpm/15 min). El sobrenadante se guardó en refrigeración hasta su análisis mientras que el paquete bacteriano se resuspendió en agua desionizada y se calentó hasta ebullición en baño de agua durante 15 min, posteriormente se centrifugó (14,000 rpm/30 min), desechando el paquete celular, y el sobrenadante se refrigeró hasta su análisis.

### **Cromatografía de capa fina.**

El análisis del sobrenadante y del lisado bacteriano se realizó mediante cromatografía en capa fina (TLC, Thin Layer Chromatography) en placas de aluminio recubiertas de sílica (Macherey-Nagel). Se utilizó una mezcla de butanol:ácido acético:agua (50:25:25) como fase móvil y se reveló con una solución de  $\alpha$ -naftol (71) sobre una plancha a 150°C hasta la aparición de las bandas control. Como control de corrimiento se utilizó una mezcla de D-glucosa, L-fucosa, 2-FL (Sigma-Aldrich) y LNFP (IsoSep) con una concentración de 2 g/L de cada carbohidrato (1  $\mu$ L/carril).

### **Condiciones de fermentación.**

El proceso de fermentación se modificó de la técnica reportada por Geremia *et al.* (72). Se utilizó un fermentador de 1L (BioFlo 110 fermentor, New Brunswick) utilizando 500 mL de medio mineral complementado con micro nutrientes, tiamina (0.018 g/L), Cb (100 mg/L) y Tc (12.5 mg/L). La fermentación se inició con la inoculación de 50 mL de un cultivo en LB incubado a 37°C por 18 h en matraz Erlenmeyer bafleado en agitación constante a 280 rpm. La temperatura se fijó en 30°C durante todo el proceso, el oxígeno disuelto se mantuvo sobre el 30% (de saturación por aire) manteniendo un flujo de 1 litro por minuto y ajustando la agitación en forma manual (500-900 rpm), el pH (6.9) se reguló con una solución de hidróxido de amonio al 20% y se utilizó glucosa como única fuente de carbón. La generación de espuma se controló mediante la adición automática de

antiespumante 204 (Sigma-Aldrich) al 1%. El crecimiento bacteriano se controló mediante la adición de glucosa: en un primer paso se agregó glucosa (17.5 g/L) al medio, se permitió el crecimiento hasta el consumo total de la misma, monitoreada por un incremento brusco en el oxígeno disuelto, y posteriormente se inició la adición de glucosa (40%) a razón de 4.0 g/L/h durante 5h para después disminuirlo a 2.0 g/L/h hasta la finalización del proceso. La inducción con IPTG (50 mg/L), D-lactosa (10 g/L) y L-fucosa (7 g/L) se inició una hora después de que se consumió la glucosa inicial.

### **Purificación de carbohidratos.**

Una vez finalizada la fermentación se separó el sobrenadante del paquete celular mediante centrifugación a 9000 rpm. El paquete celular se resuspendió en una cuarta parte del volumen original en agua desionizada y se sometió durante 10 min a 8 Lb de presión en autoclave. Se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones y se desechó el paquete celular.

A pesar de que el uso de carbón activado en la purificación de azúcares fue reportado hace más de 60 años (73), el alto grado de pureza con el que se obtienen y su relativo bajo costo ha hecho que se siga utilizando tanto a nivel industrial como de laboratorio (56, 74–76). Es por esta razón que se decidió utilizar en la purificación final de los oligosacáridos. Se implementó una metodología en dos fases. En la primera fase se modificó la metodología propuesta por Morales *et al.* (75) en la purificación de oligosacáridos de miel, mezclando carbón activado con el sobrenadante y extracto celular para eliminar la mayoría de los contaminantes del medio y eluyendo con etanol al 20% para tratar de recuperar la mayor cantidad de azúcares posibles. En una segunda fase, mediante columna de carbón:celita y elución con etanol al 9%, se terminó por limpiar de impurezas y separar los carbohidratos sintetizados (74).

Ambos sobrenadantes (del cultivo y del lisado celular) se juntaron y mezclaron con 40 g/L de carbón activado (Darco G-60, mesh -100, Sigma-Aldich); se agitó la suspensión durante 18 h, se filtró el carbón, se lavó con agua desionizada, se resuspendió en etanol al 20% y se agitó durante 1 h. Se filtró nuevamente y se recuperó el filtrado, el cual se roto-evaporó hasta un volumen de 150 mL; 50 mL de este concentrado se pasaron a través de una columna (2.6 cm de diámetro x 100 cm de largo) de carbón activado:celita (1:1) y se



lavaron con 3 volúmenes de la columna con agua desionizada; posteriormente, se lavó con 3 volúmenes de etanol al 5%, y por último se eluyó con etanol al 9% (flujos de 0.5 mL/min). Las fracciones se colectaron y se analizaron mediante TLC; las muestras seleccionadas se concentraron hasta sequedad y se analizaron mediante espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN) en el Centro de Investigación de Carbohidratos Complejos (Complex Carbohydrate Research Center) de la Universidad de Georgia, en E.U.A. (<http://www.ccrc.uga.edu>).

### **Análisis mediante LC-MS de muestras purificadas.**

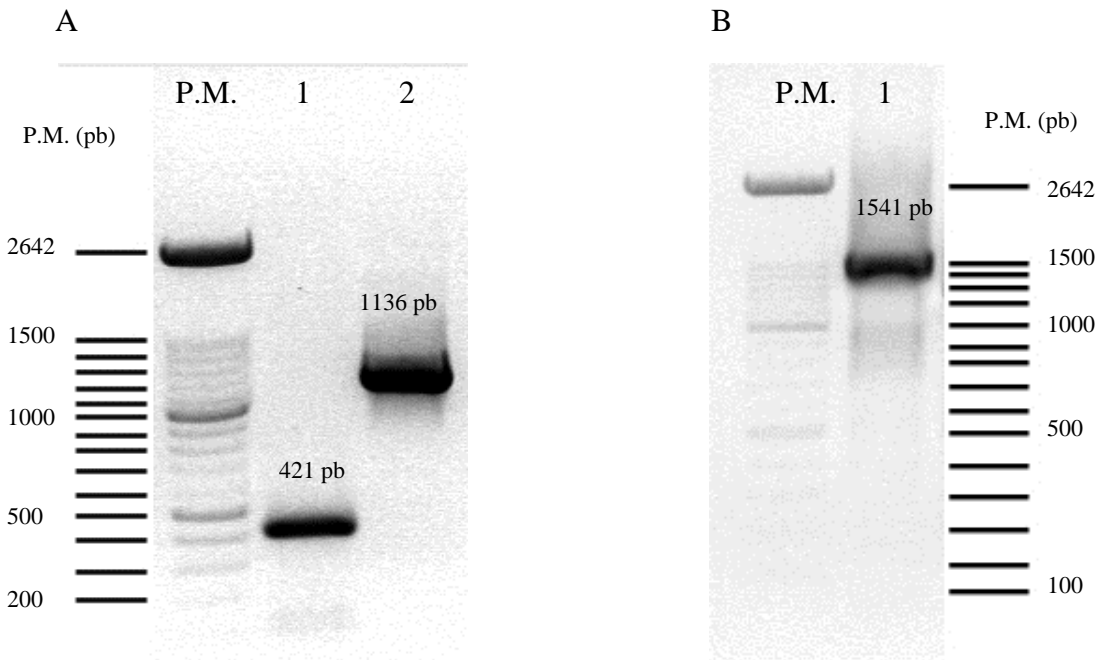
Con el propósito de evaluar la pureza con la que obtienen los oligosacáridos mediante el método de purificación propuesto, una muestra de 2-FL y otra de LDFT provenientes de una misma fermentación se enviaron para su análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) al Laboratorio de Glicobiología del Boston College, Chestnut Hill, Massachusetts, E.U.A. a cargo del Dr. David S. Newburg.

El proceso se realizó siguiendo la metodología descrita por Newburg *et al.* (77). Se utilizó un equipo de HPLC Agilent serie 1100 acoplado a espectrómetro de masas simple-cuadrupolo Agilent MSD equipado con una fuente de ionización por “electrospray”. El HPLC se realizó con una columna Hypercarb (100 x 2.1 mm, con partículas porosas de grafito de 5 $\mu$ m, Thermo Fisher Scientific), y una fase móvil con gradiente de agua:acetonitrilo (Sigma-aldrich) a 25°C (fig 8). La adquisición de datos se realizó en modo de ion negativo con una temperatura de gas de 350°C, flujo de 10L/min, nivel de fragmentación 70 y voltaje capilar de 3500 V.

## RESULTADOS.

### Mutación del gen *fucI* en la cepa JM107.

La síntesis del gen modificado de *fucI* se realizó utilizando los iniciadores FucIa-F/FucIa-R para la región amino terminal y FucIb-F/FucIb-R para la región carboxilo terminal. El tamaño de la amplificación se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa obteniendo fragmentos con los pesos esperados de 421pb y 1136pb, respectivamente (Fig. 8). Ambos fragmentos se utilizaron para amplificar exitosamente un fragmento de 1541 pb utilizando los iniciadores FucIa-F/FucIb-R y que corresponde al gen *fucI* con una delección interna de 500 pb ( $\Delta fucI$ ).

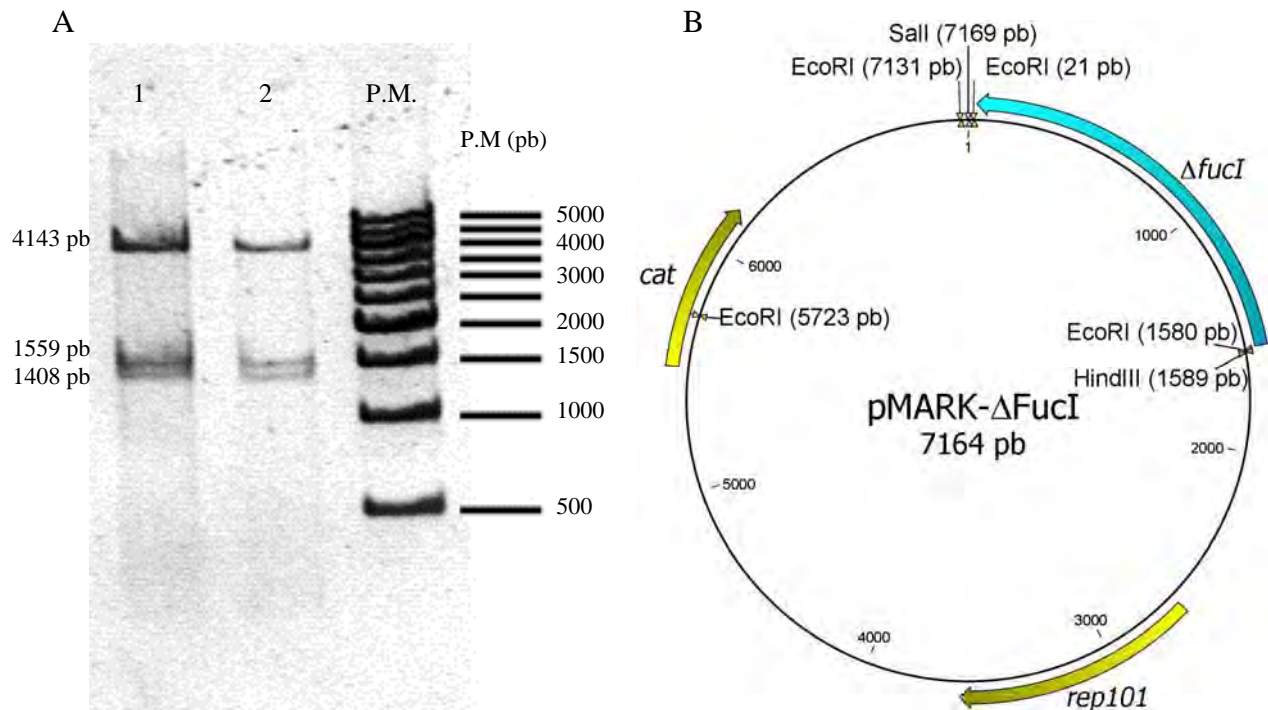


**Figura 8.** OE-PCR para generar el gen  $\Delta fucI$ .

**A.** Amplificado de ADN total de la cepa JM107 DE3 utilizando los iniciadores 1. FucIa-F/FucIa-R para la región amino terminal (421 pb) y 2. FucIb-F/FucIb-R para la región carboxilo terminal (1136 pb). **B.** Amplificado de una mezcla de los productos anteriores con los iniciadores FucIa-F/FucIb-R (1541 pb). P.M = Peso molecular en pares de bases (pb).

Este fragmento se clonó en el vector pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen). La clonación se confirmó mediante PCR con los iniciadores T3/T7, obteniendo un amplificado de 1650 pb. Posteriormente se subclonó en los sitios EcoRI del plásmido pBK-CMV para generar la

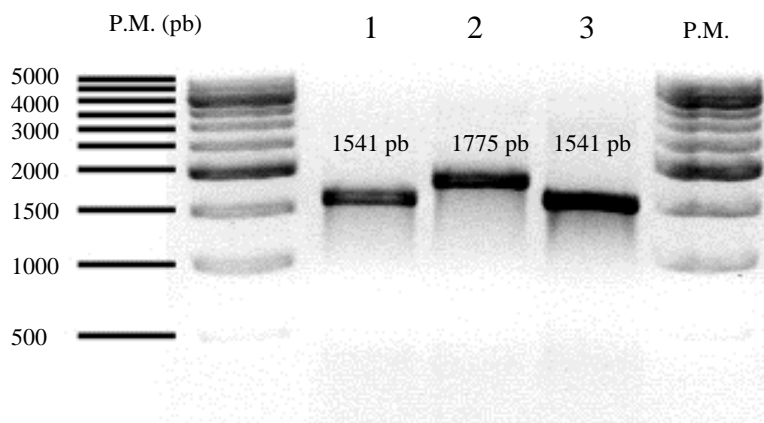
construcción pBK- $\Delta$ fucI. A partir de este vector, y utilizando las enzimas HindIII y Sall, se subclonó por último en el vector suicida pMARK-705 (66) para obtener la construcción pMARK- $\Delta$ fucI. La construcción de este vector se comprobó mediante patrón enzimático con EcoRI, obteniendo el patrón esperado de 3 bandas (4143, 1559 y 1408 pb) (Fig. 9).



**Figura 9.** Patrón de restricción del plásmido suicida pMARK- $\Delta$ FucI.

**A.** Carriles 1 y 2 clonas del plásmido pMARK- $\Delta$ FucI digerido con EcoRI. Fragmentos de 4143, 1559 y 1408 pb. **B.** Representación esquemática del plásmido.

Este plásmido se utilizó para reemplazar el gen silvestre en la misma forma a la realizada para *lacZ*, con la única excepción de que se utilizaron placas de agar McConkey sin lactosa y suplementadas con L-fucosa (0.4%) para seleccionar las clonas con fenotipo *fuc*<sup>-</sup>. La comprobación fenotípica final se realizó en caldo rojo de fenol suplementado con L-fucosa al 1%, en donde las cepas no fermentadoras de fucosa mantuvieron el medio sin virar el indicador de pH, mostrando que no hubo acidificación del mismo. La comprobación genotípica se realizó mediante PCR utilizando los iniciadores FucIa-F/FucIb-R, mostrando una amplificación única con un peso de 1541pb y correspondiente al gen modificado de *fucI* (Fig. 10).



**Figura 10.** PCR para comprobar mutación del gen *fucI*.

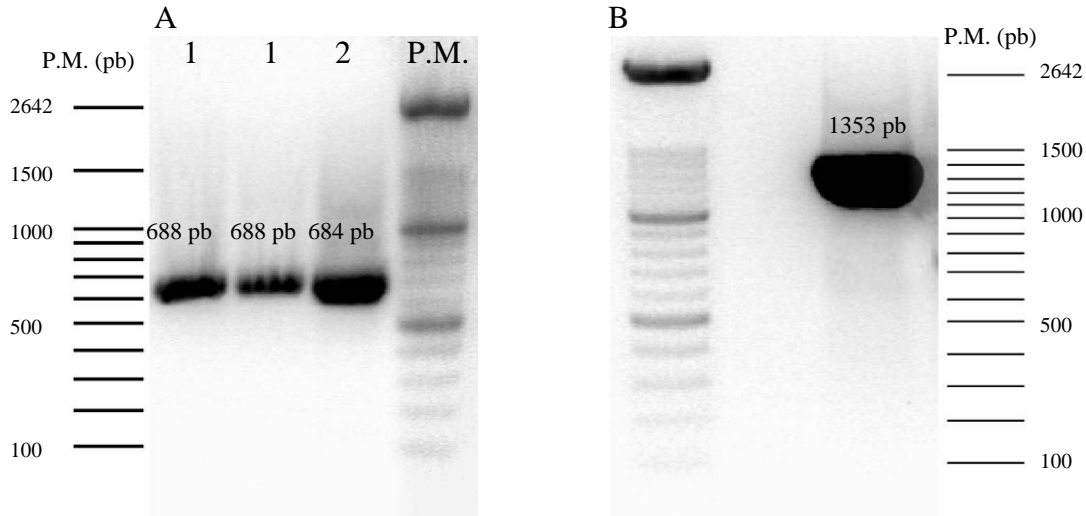
ADN total amplificado por PCR con los iniciadores FucIa-F/FucIb-R. 1. y 3. Cepas JM107 mutadas y fenotipo *fucI* (1541 pb). 2. Cepa JM107 (1775 pb).

#### **Inserción del gen T7-RNA polimerasa en el genoma de *E. coli* JM107(*fucI*).**

Se utilizó el sistema de lisogenización  $\lambda$ DE3 Lysogenization kit (Novagen). La comprobación de la inserción se realizó utilizando el protocolo proporcionado por el fabricante e infectando la cepa con fagos modificados (solamente activos bajo la presencia de la T7-RNA polimerasa). Las cepas seleccionadas mostraron unidades formadoras de placa al inducir con IPTG la expresión de la T7-RNA polimerasa, mientras que la misma cepa en ausencia del inductor mostró un comportamiento basal.

#### **Mutación del gen *lacZ* en la cepa JM107 (*fuc*<sup>-</sup>, DE3).**

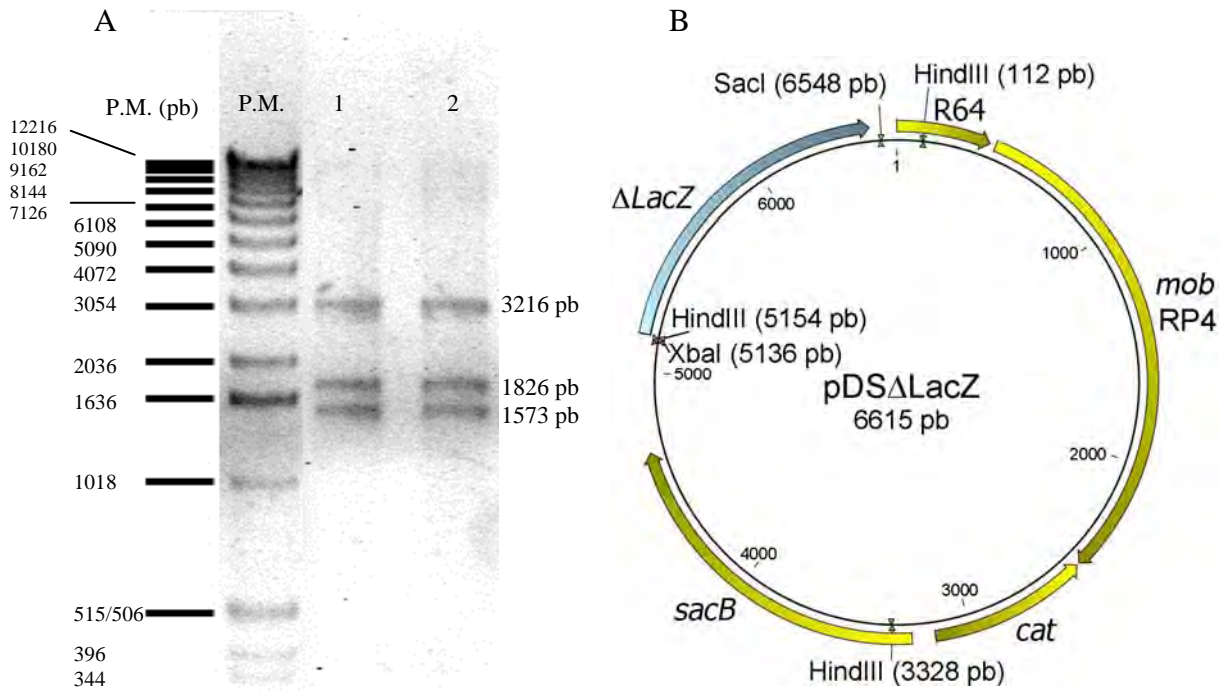
La construcción del gen *lacZ* modificado ( $\Delta$ *lacZ*) con una deleción interna de 1629 pb se realizó en dos pasos. En el primero se amplificó mediante PCR la región inicial del gen (1-688 pb) (utilizando como plantilla ADN total de la cepa de *E. coli* JM109) con los iniciadores Z5-1/Z5-2, y en otra reacción, la región terminal (2283-2982, 684 pb) utilizando los iniciadores Z3-1/Z3-2. Ambas reacciones dieron fragmentos con los pesos esperados (688 y 684 pb), comprobado mediante electroforesis en gel de agarosa (Fig. 11-A). En un segundo paso, ambos fragmentos se mezclaron y se amplificaron utilizando los iniciadores Z5-1/Z3-2 para sintetizar un nuevo fragmento de 1353 pb (Fig. 11-B), con la región inicial y final del gen pero con una deleción interna de 1629 pb.



**Figura 11.** OE-PCR para generar el gen modificado  $\Delta LacZ$ .

**A.** Amplificado de ADN total de la cepa JM109 con los iniciadores Z5-1/Z5-2 (1) y Z3-1/Z3-2 (2), obteniendo fragmentos de 688 y 684 pb, respectivamente. **B.** PCR de una mezcla de los productos anteriores con los iniciadores Z5-1/Z3-2 para generar el gen modificado de 1,353 pb.

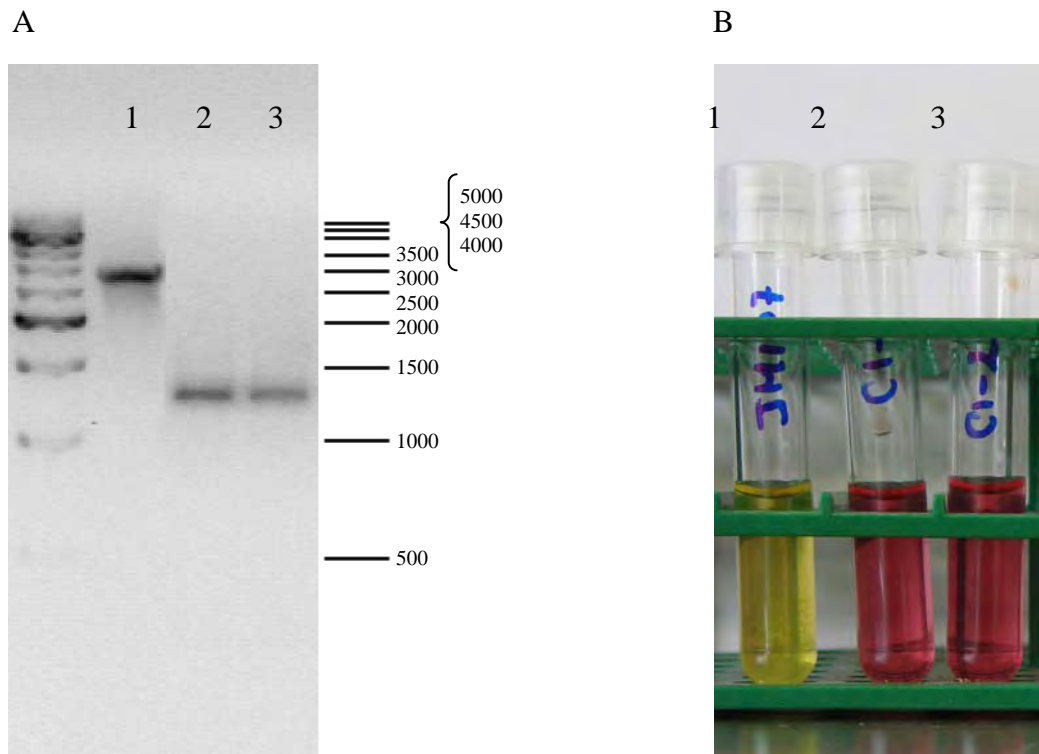
Una vez sintetizado, el gen  $\Delta lacZ$  se clonó en el plásmido pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen). Las clonas se seleccionaron mediante PCR con los iniciadores T3/T7, siendo positivas aquellas que dieron un amplificado de 1462 pb. Utilizando los sitios EcoRI se subclonó el fragmento (1342 pb) en el vector pBK-CMV para crear el plásmido pBK- $\Delta LacZ$ . Esta clona se verificó mediante PCR utilizando los iniciadores T3/Z3-1 (776 pb) para confirmar la clonación y la orientación de los fragmentos. Posteriormente, se escindió el fragmento de 1412 pb utilizando los sitios XbaI/SacI para subclonarlos en los mismos sitios del vector pDS-132. Esta última construcción se comprobó por PCR con los iniciadores Z5-1/Z5-2, obteniendo un producto de 688 pb. El nuevo plásmido se nombró pDS $\Delta LacZ$  y se confirmó su construcción por patrón de digestión con HindIII (Fig. 12), obteniendo tres fragmentos, de 3216, 1826 y 1573 pb.



**Figura 12.** Patrón de restricción del plásmido suicida pDS $\Delta$ LacZ.

**A.** Carriles 1 y 2 plásmido pDS $\Delta$ LacZ digerido con HindIII. Fragmentos de 3216, 1826 y 1573 pb. **B.** Representación esquemática del plásmido.

Este plásmido se insertó por electroporación (61) en la cepa JM107 (*fuc*<sup>-</sup>, DE3) y se inoculó en placas de agar LB con cloranfenicol (Cm) 20 mg/L a 42°C (plásmido cointegrado). Posteriormente, se permitió la replicación del mismo, cultivando en caldo LB con cloranfenicol a 28°C durante 18h y mediante 4 resiembras en caldo LB sin antibiótico se favoreció la eliminación del mismo. Finalmente, las cepas se sembraron por dilución en cajas de agar MacConkey y se seleccionaron aquellas con fenotipo *lac*<sup>-</sup>. Estas cepas se resembraron en agar LB con Cm a 28° y 42°C y se seleccionaron sólo aquellas que no desarrollaron en estos medios (indicativo de la segregación del plásmido). El fenotipo se confirmó en caldo rojo de fenol complementado con lactosa al 1% (Fig. 13); las cepas mutadas no mostraron acidificación del medio, demostrando de esta forma su incapacidad para utilizar la lactosa como fuente de energía. La mutación se confirmó por PCR a partir del ADN total de la cepa JM107 (Fig. 13) con los iniciadores Z5-1/Z3-2, obteniendo un fragmento de 1353 pb correspondiente a un gen trunco.



**Figura 13.** Confirmación del genotipo *lacZ* y fenotipo *lac*<sup>-</sup>.

**A.** ADN total amplificado con los iniciadores Z5-1/Z3-2. 1. JM107 DE3 sin mutar (2982 pb). 2. y 3. Cepas JM107 mutadas con genotipo *lacZ* (1353 pb) **B.** Ensayo en caldo rojo de fenol. 1. Cepa JM107 sin mutar. 2 y 3 Clonas con fenotipo *lac*<sup>-</sup>.

### Construcción del plásmido pET-FutC

Se realizó un análisis comparativo de cuatro genes *futC* secuenciados a partir de cuatro cepas de *H. pylori* pertenecientes al banco de cepas del Departamento de Infectología de INCMNSZ aisladas de muestras clínicas. La comparación se realizó tomando como modelo el gen *futC* de la cepa 26695 (78), que ha sido utilizado para estudios de función y caracterización del gen (42). Cabe señalar que cuando Venter *et al.* secuenciaron el genoma completo de la cepa 26695 (78) no se reportó el gen completo de *futC* debido a que su marco de lectura se encontraba interrumpido por una mutación en la región de poli C. Posteriormente, Berg *et al.* (79) insertaron *in silico* un par C-G y restauraron por completo el marco de lectura, el cual mostró una elevada homología a otras fucosiltransferasas  $\alpha$ 1,2. De la misma forma, el análisis comparativo de nuestras cepas

mostró que dos de los cuatro genes analizados (L44a-4 y G22c) se encontraban interrumpidos por mutaciones alrededor de la región poli C del gen; una cepa (L26a-4) mostró una interrupción del marco de lectura mucho antes de esta región, y solamente la cepa L54a-1 mantenía un marco de lectura completo. Lo anterior es congruente con la hipótesis de que esta región actúa como interruptor de la activación del gen. Debido a que esta cepa cuenta con un marco de lectura completo y una alta homología con el gen de la cepa modelo 26695, se utilizó para la construcción del plásmido pET-FutC (Fig. 14).

El gen se modificó en su región homopolimérica mediante OE-PCR. En la primera fase se amplificaron 426 pb de la región inicial del gen utilizando los iniciadores Fuct2-P1/Fuct2-P2, y con los iniciadores Fuct2-P3 y Fuct2-4 se amplificaron 517 pb de la región terminal. Con estos dos amplificados se realizó un tercer PCR (Fuct2-P1/Fuct2-P4) que dio lugar a un gen *futC* de 916 pb modificado en su región homopolimérica (Fig. 15). El producto de PCR se clonó en el vector pCR4-Blunt, generando el plásmido pCR4-FutC, el cual se secuenció y se comparó contra la secuencia del gen *futC* de la cepa 26695.

Utilizando los sitios de restricción EcoRI y XbaI se subclonó el gen *futC* en el vector pET-21a+ para construir el nuevo vector pET-FutC. Finalmente, se comprobó la secuencia del plásmido utilizando los iniciadores T7-Terminator y T7-Promoter; la secuencia mostró un marco de lectura completo con la región homopolimérica modificada. La comparación de la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia nucleotídica modificada y sin modificar entre las cepas 26695 y L54a-1 se muestra en la Figura 16.



```

123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890 70
MAFKVVQICGGLGNQMFQYAFKSLQKHNTPVLLDITSFQWSNRKMQLELFPIDLPHYANAKEIAIAKMQ
26695M: .....S.....D.....S.....
26695: .....S.....D.....S.....
L54a-1: .....L.....N.....SE.....
L44a-4: .....L.....N.....N.....M.....
L26a-4: .....L.....T.....D.....N.C.C---.RM
G22c: .....L.....N.....M.....

12345678901234567890123456789012345678901234567890123456 789 139
HLPKLVRDALKCMGFDRVSQEIFVFEYEPKLLKPSRLTYFNGYFQDPRYFDAISNLIKQTFLLPPPPNNNN
26695M: .....F.....P.....-EN.
26695: .....F.....P.....PKII
L54a-1: .....F.....P.....PEN
L44a-4: .....Y.....S.....RK -
L26a-4: RYS -----
G22c: .....E.....D.....Y.....S.....E--N.

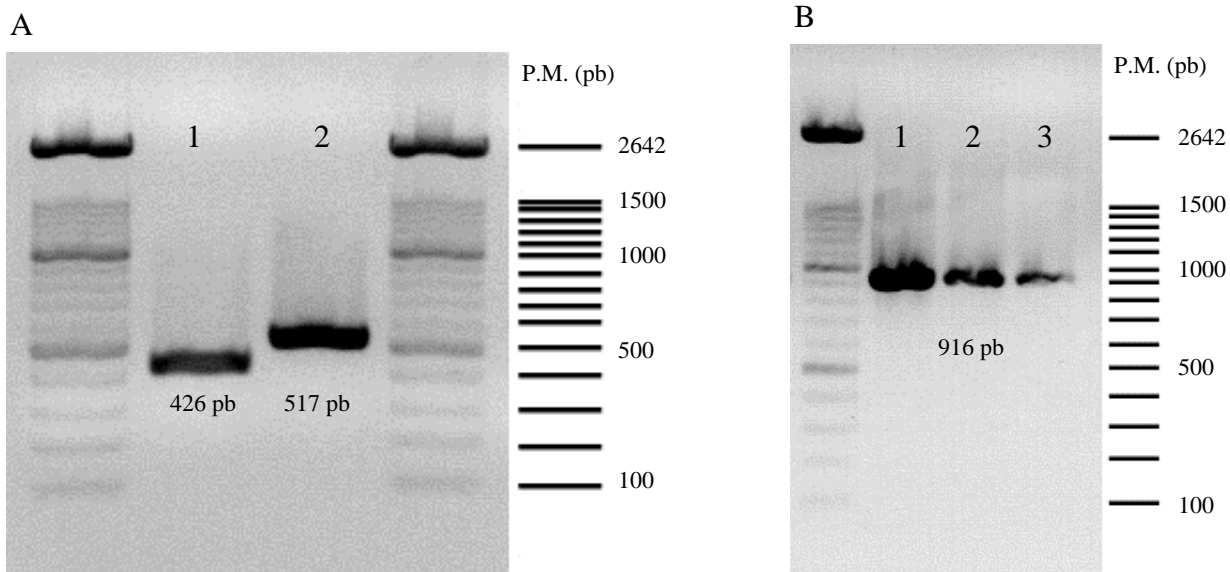
012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789 209
KNNNKNNNNNNNNNNNIIAAKNSVFMRRGDYVGGCQLGIDYQKKALEYMAKRVPMELFVFCEDLNF
26695M: ...N..EEEYQCKLSL.....I.....E.
26695: RIII..RKNISASFL -----
L54a-1: ...K..EKEYHRKLAL.....V.....T.
L44a-4: -----
L26a-4: -----
G22c: -----

012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789 279
TQMLDLGYPFMDMTTRDKNEEAYWDMLLMQSCNHGIIANSTYSWVAAYLIMNPEKIIIGPKHWLFGNENI
26695M: .....E.....Q.....E.....H...
26695: -----
L54a-1: .....D.....K.....N.....N...
L44a-4: -----
L26a-4: -----
G22c: -----

012345678901234567890 300
LCKEWWKIESHFVKSQKYNA
26695M: .....-
26695: -----
L54a-1: .....
L44a-4: -----
L26a-4: -----
G22c: -----

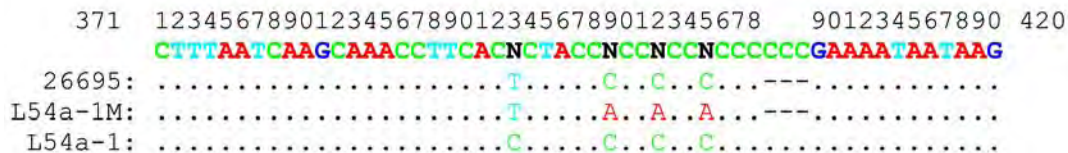
```

**Figura 14.** Comparación de secuencias de aminoácidos deducidas a partir de la secuencia nucleotídica del gen *futC* de diversas cepas de *H. pylori* silvestres.



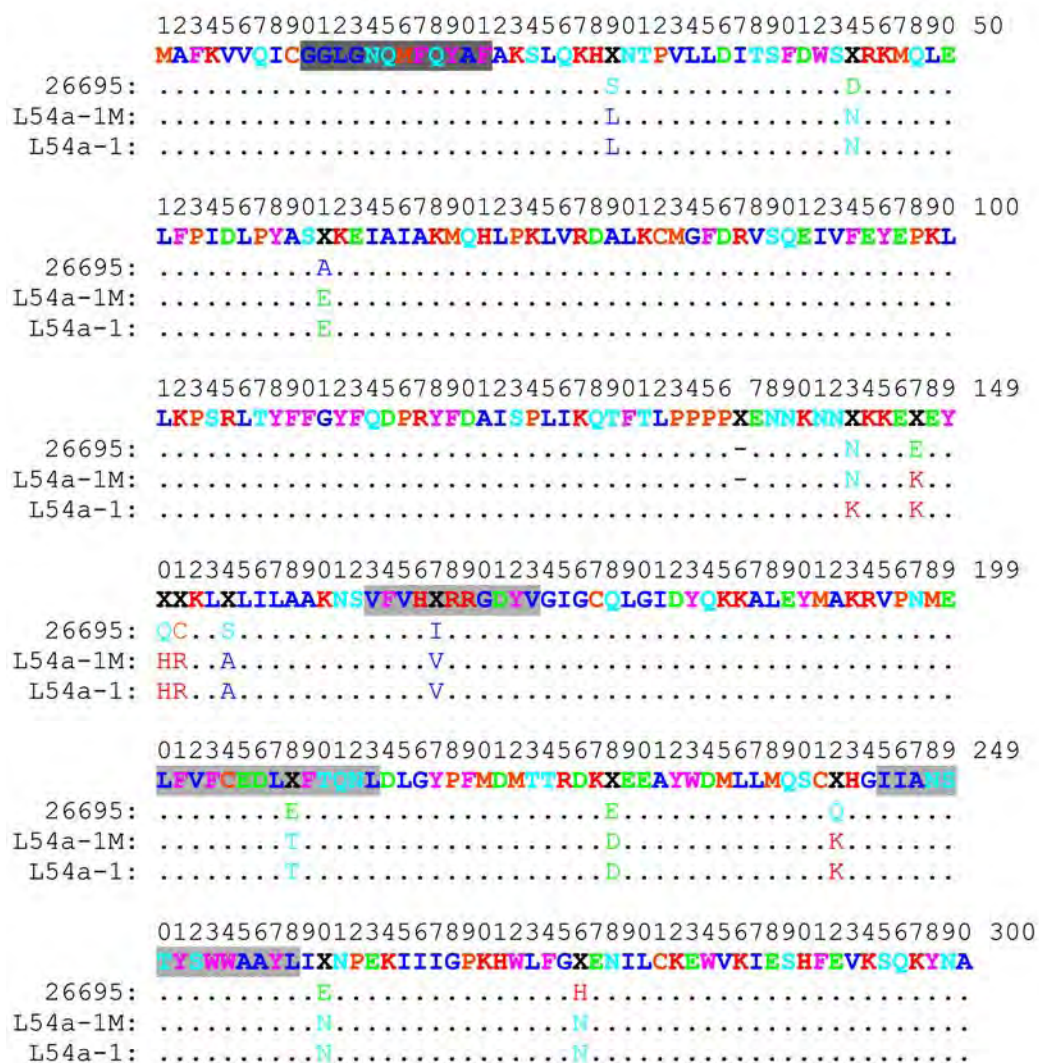
**Figura 15.** Modificación del gen *futC* mediante OE-PCR.

OE-PCR para generar el gen modificado *futC* de la cepa 54a-1 **A.** 1. Amplificado de 426 pb pertenecientes a la región inicial del gen utilizando los iniciadores Fuct2-P1/Fuct2-P2. 2. Amplificado de 517 pb correspondientes a la región terminal del gen utilizando los iniciadores Fuct2-P3 y Fuct2-4. **B.** Amplificado modificado de 916 pb sintetizado a partir de una mezcla de los dos productos anteriores con los iniciadores Fuct2-P1/Fuct2-P4.



**Figura 16.** Región homopolimérica modificada del gen *futC*.

Comparación de la secuencia de la región homopolimérica del gen *futC* de las cepas 26695, L54a-1 modificada (L54a-1M) y sin modificar (L54a-1).



**Figura 17.** Comparación de secuencia de aminoácidos del gen *futC*.

Comparación de secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia nucleotídica del gen *futC* de las cepas de *H. pylori* 26695, L54a-1 y L54a-1 modificada en su región homopolimérica (L54a-1M). Los recuadros indican las regiones con posible implicación en su actividad enzimática (80).



## Clonación del gen bifuncional *fkp* de *B. fragilis*.

A partir del ADN total de la cepa silvestre INNSZ y utilizando los iniciadores Fkp-1 y Fkp-2, se logró amplificar un fragmento de 2916 pb correspondiente al tamaño del gen *fkp*, el fragmento se clonó y secuenció utilizando los iniciadores Fkp-1, Fkp-2, FkpS-1, FkpS-2, FkpS-3 y FkpS-4. La secuencia se comparó con el gen de la cepa 9343 de *B. fragilis* (24).

```

12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890 90
MOKLLSLPBNLVQSFHELEVRVRLDWFCTSDPVGKKLGGGTSWLLLEECYNEYSDGATFGEWLEKEKRILLHAGGQSRRLPGYAPSGKI
9343: .....
INNSZ: .....

12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890 180
LTPVPVFRWERGQHLGQNLISLQPLLYEKIMSLXPKLHTLIAAGDVIYIRSEKPLQSIPEADVVCYGLWVDPPLATHHGVFASDRKHPEQ
9343: .....
INNSZ: .....

12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890 270
LDFMLQKPSLARLESLSKTHLFLMDIGIWLSDRAVEILMKRSHKSSSEELKYYDLYSDPFGALGTHPRIEDEEVNTLVAILPLPGGEF
9343: .....
INNSZ: .....

12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890 360
YHYGTSKELISSYLVQNKVYDQRRIMHRKVKPNPAMFVQNAVVRIPLCAENADLWIENSHIGPKWKIASRHIIIGVPENDWLSLAVPAGV
9343: .....
INNSZ: .....

12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890 450
CVDVVPMGDKGFVARFVYGLDDVFKGDLRDSKTTLTGIPFGEWMSKRGLSYTDLKGRTDLDLQXXSVFPMVNEVEELGLVLRWMLSEPELEE
9343: .....
INNSZ: .....

12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890 540
GKIWLRSSEHFSADSIAGANLKRLYAQREEFRKGNWKAALAVHEKVFYQLDLADAAEDFVRLGLDMPPELLPEDALMSRIHNRMLRAR
9343: .....
INNSZ: .....

12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890 630
ILKLDGKDYRPEEAQAFDILLRDLGDISNRKSTPKLDVYSDQIVWGRSPVRIDMAGGWTDTPPYSLYSGGNVVLAIELNGQPPLQVYV
9343: .....
INNSZ: .....

12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890 720
KPKCDFHIVLRSIDMGAMEIVSTFDELQDYKIGSPFSIPKAALSLAGFAPAFSAVSYASLEEQDKDFGAGIEVLLAAIPAGSGLGTSS
9343: .....
INNSZ: .....

12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890 810
ILASTVLGAINDFCGLAWDKNEICQRTLVLEQLLTTGGWQDQYGGVLQGVKLLQTEAGFAQSPLVRWLPDHLFTHPEYKDCHELLYITGI
9343: .....
INNSZ: .....

12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890 900
TRTAKGILAEIVSSMFLNSLHLNLLSEMKAHALDMNEAIQRFVFEFGRIVGKTEWQNKALDSGTVPPAVEAIIIDLIKQYVLYGKLPGA
9343: .....
INNSZ: .....

123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890 950
GGGGYLYMVAKDPQAAVRIRKILTEAENPRARFVEMTLDKGFQVRS
9343: .....
INNSZ: .....

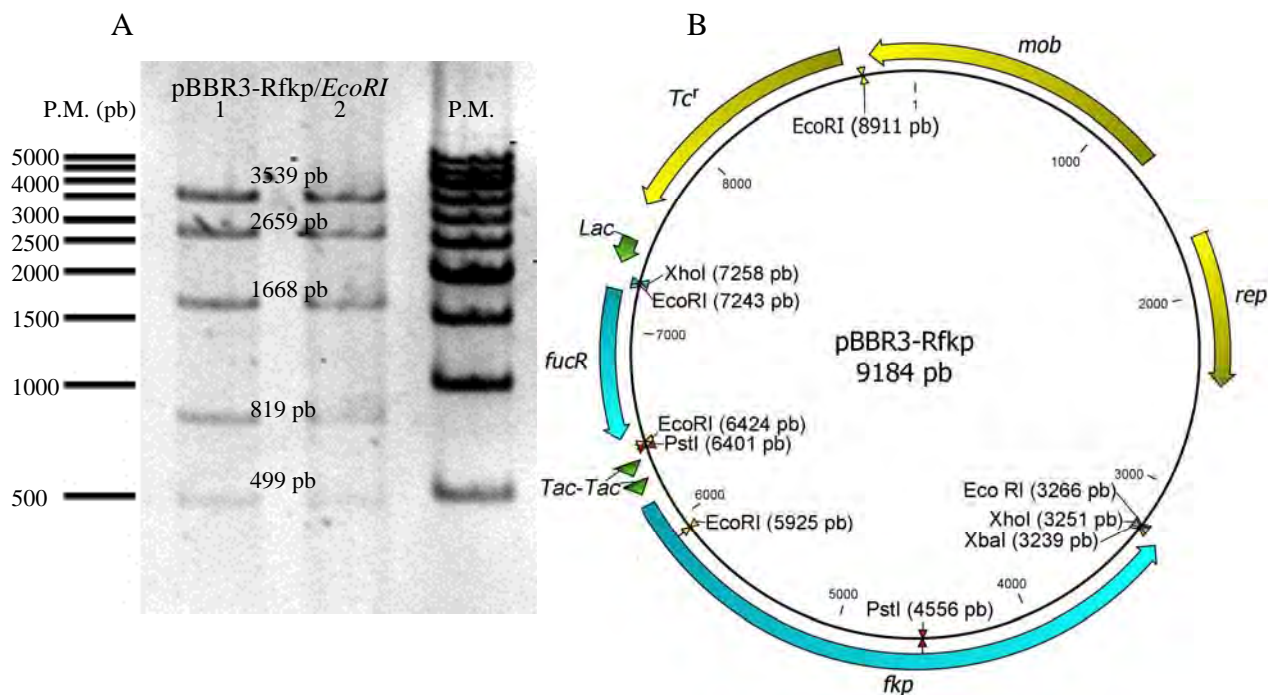
```

**Figura 18.** Comparación de la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia nucleotídica del gen *fkp* de *B. fragilis* entre la cepa INNSZ y la 9343.

Debido al diseño de los iniciadores de amplificación, el gen pudo ser liberado mediante digestión enzimática con BamH1, sitios con los que se logró clonar el fragmento en el plásmido pCW-Ori+. La clonación y orientación del fragmento se comprobó mediante PCR, seleccionando aquellas clonas en donde el gen se encontraba controlado por el promotor tac-tac del plásmido. Esta construcción, nombrada pCW-fkp, se utilizó posteriormente para subclonar el gen *fkp* con el promotor Tac-Tac en el plásmido pBB3-FucR (ver más adelante).

Para construir el plásmido pBB3-FucR se utilizó como templado ADN de la cepa XL1-Blue y se amplificó el gen utilizando los iniciadores Fuc-F/Fuc-R (801 pb). El fragmento se clonó en el vector pCR4Blunt-TOPO para generar el plásmido pCR4-FucR, construcción que se verificó por PCR con los iniciadores T3/T7 (amplificado de 910 pb). El inserto se secuenció y se comprobó su homología (100 %) con el gen *fucR* de la cepa K-12. El gen se escindió utilizando los sitios de restricción EcoRI y se subclonó en los mismos sitios del vector pBK-CMV, dando lugar al plásmido pBK-FucR; esto se realizó con el propósito de incrementar el espectro de sitios de restricción que flanquean el gen. Posteriormente, se utilizaron las enzimas de restricción XhoI/PstI para subclonar el gen en los mismo sitios del plásmido pBBR1MCS3; de esta forma, *fucR* quedó bajo el control del promotor *lac* de este plásmido. Esta nueva construcción se nombró pBB3-fucR.

Por último, se amplificó (a partir del plásmido pCW-fkp) el gen *fkp* bajo el promotor Tac-Tac (3193pb) utilizando los iniciadores pCWLgtA-F/pCWLgtA-R. Este producto se digirió con XbaI y se clonó en el plásmido pBB3-FucR, previamente digerido con XbaI/SmaI, para generar el nuevo plásmido pBBR3-Rfkp. La comprobación de la construcción se realizó mediante patrón de restricción (Fig. 19) y secuenciación.



**Figura 19.** Patrón de restricción del plásmido pBBR3-Rfkl con EcoRI.

A. Carriles 1 y 2 fragmentos de 3539, 2659, 1668, 819 y 499 pb de dos clonas. B. Representación esquemática del plásmido.

### Construcción de la cepa 2-FL/fkl.

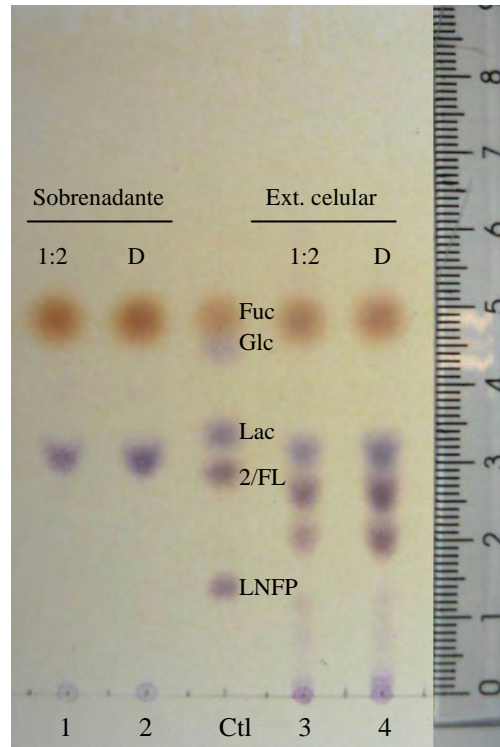
La cepa JM107 modificada (*fuc*<sup>-</sup>, *lac*<sup>-</sup>, λDE3) se electroporó con los plásmidos pBBR3-Rfkl y pET-FutC. Esta cepa mantuvo los fenotipos esperados (*fuc*<sup>-</sup>, *lac*<sup>-</sup>, *thi*-1, *Tc*<sup>r</sup>, *Cb*<sup>r</sup>, *Ac. nal*<sup>r</sup>) y el genotipo se comprobó mediante patrón de restricción de los dos plásmidos y PCR para comprobar las mutaciones de los genes *fucI* y *lacZ*. Esta cepa se nombró 2-FL/fkl.

### Síntesis de 2-FL.

En un primer intento por comprobar la producción 2-FL por la cepa 2-FL/fkl, 50 mL de cultivo en caldo LB desarrollado durante 20 h en matraz Erlenmeyer bafleado de 250 mL fueron analizados mediante TLC, sin observarse la presencia de 2-FL en el sobrenadante ni en el extracto celular.

Posteriormente, y con el objetivo de incrementar la cantidad de masa celular y tiempo de incubación, se realizó un cultivo en dos pasos, es decir, pasadas las 20 h de incubación se renovó el medio para eliminar los desechos y proveer de nuevos nutrientes al cultivo (en este momento se realizó la inducción de la bacteria). Con este procedimiento se

lograron obtener  $D.O_{600nm}$  de 12 unidades y el análisis en TLC tanto del sobrenadante como del paquete celular mostró, sólo en este último, la presencia de una banda que migra junto al control de 2-FL y otra banda por debajo de ésta. También se pudo observar la presencia de lactosa y fucosa no consumidas (Fig. 20).

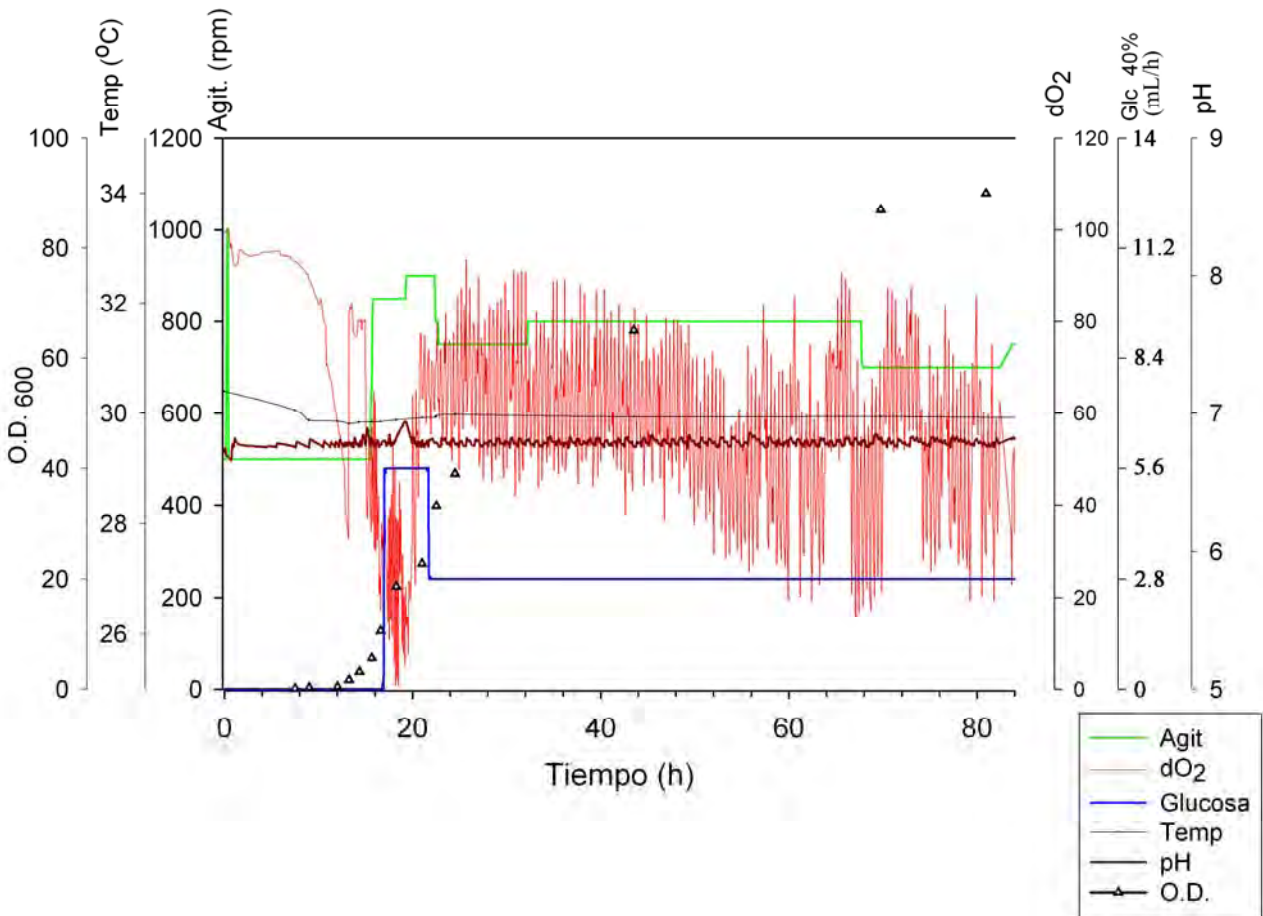


**Figura 20.** TLC de cultivo de 48h (Cultivo en dos pasos).

TLC de cultivo con la cepa 2-FL/fkp en matraz bafleado ( $D.O_{600nm}$  Final =12). Carriles 1 y 2, sobrenadante. Carriles 3 y 4, extracto celular. Control (1  $\mu$ l) de una mezcla de fucosa, glucosa, lactosa 2-FL y LNFP (2g/L c.u.). D= muestra directa, 1:2= dilución.

Con el propósito de incrementar la producción de 2-FL mediante el aumento de densidad celular y el tiempo de cultivo, se montó un proceso de fermentación de alta densidad celular (ver métodos). Bajo estas condiciones se logró alcanzar  $D.O_{600nm}$  de alrededor de 100 unidades con tiempos de incubación de 84 h (Fig. 21).



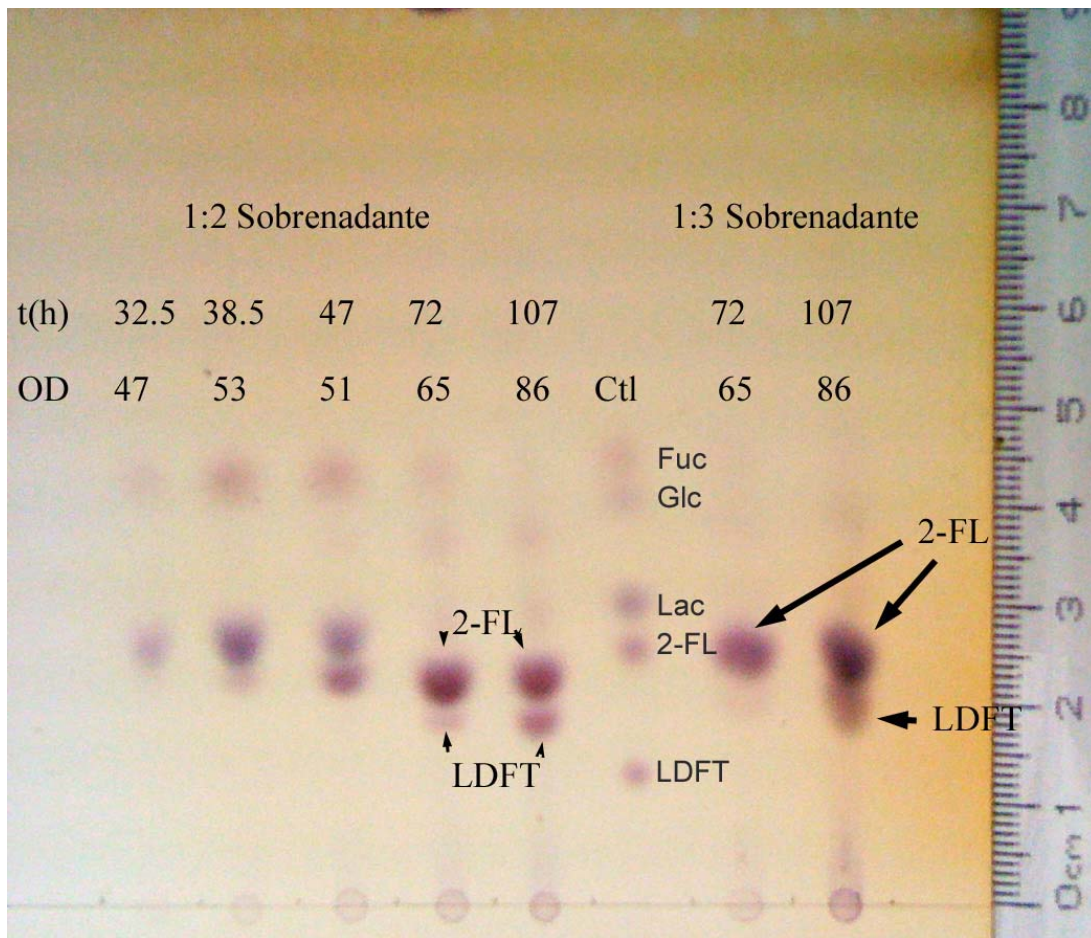


**Figura 21.** Parámetros controlados durante el proceso de fermentación.

El desarrollo bacteriano se determinó mediante lecturas de densidad óptica a 600 nm. La agitación se controló de manera manual entre 500-900 rpm. El pH se mantuvo en 6.9 durante todo el proceso controlado mediante la adición automática de una solución de hidróxido de amonio al 20%. La temperatura se fijó en 30°C. Una vez consumida la glucosa inicial se adicionaron 5.6 mL/h de una solución de glucosa al 40% (4 g/L/h) durante 5 h y posteriormente se disminuyó 2.8 ml/h (2g/Lh) hasta el final de proceso. El oxígeno disuelto se calibró al 100% mediante saturación con aire antes de iniciar el cultivo. El flujo de aire se mantuvo constante durante el proceso en 1 litro por minuto.

El análisis tanto del sobrenadante como del extracto celular mostró la presencia de 2-FL y lactodifucotetraosa (LDFT). En la Figura 22 se puede apreciar el consumo de la lactosa y fucosa, y una acumulación de 2-FL y LDFT en el sobrenadante conforme transcurre la fermentación. Aparentemente la síntesis de LDFT se logra posterior a la síntesis de 2-FL, aunque es necesario un análisis más detallado para cuantificar la cinética de producción vs consumo a lo largo de la fermentación. En diferentes ensayos se lograron transformar hasta 14 g/L de lactosa en 2-FL y LDFT utilizando siempre exceso de L-fucosa.

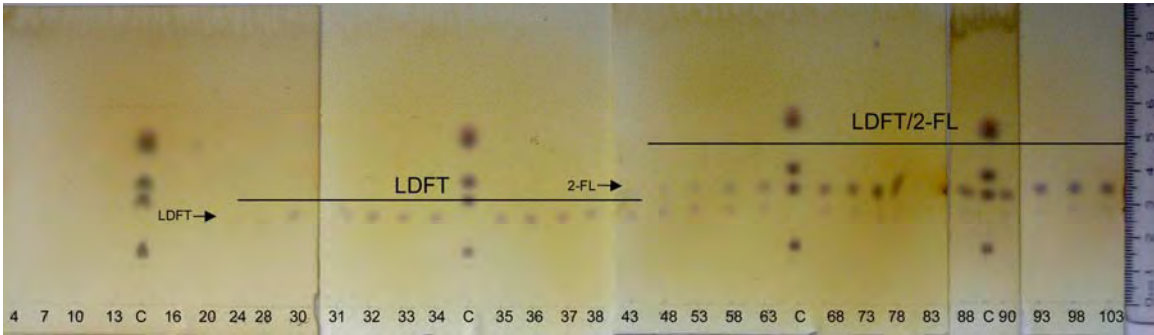




**Figura 22.** TLC de sobrenadante a diferentes tiempos de fermentación.

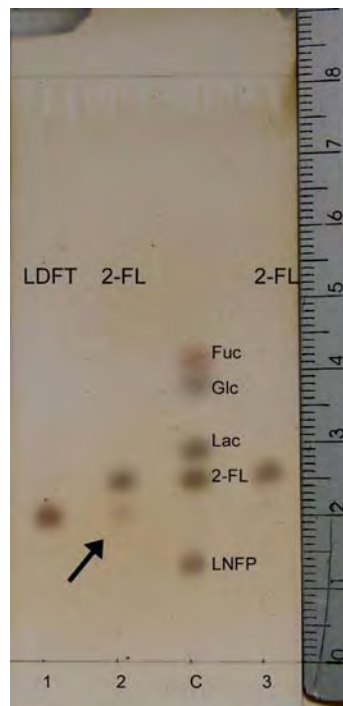
Ejemplo de una fermentación de alta densidad celular utilizando 10 g/L iniciales de D-Lactosa y 7 g/L de L-fucosa. En la placa se muestra el sobrenadante de la fermentación (diluido 1:2 y 1:3) a diferentes tiempos y D.O. La gran cantidad de contaminantes evita una adecuada migración de los azúcares con respecto al control, efecto que disminuye al diluir la muestras 1:3. El carril control contiene 1 $\mu$ L de una solución con fucosa, glucosa, lactosa, 2-FL y LNFP (2 g/L de cada uno).

A partir de una fermentación de 550 mL, tanto el sobrenadante como el paquete celular se procesaron conforme lo descrito en la sección de Métodos hasta obtener un volumen final de 150 mL de extracto total. Este extracto se purificó utilizando una columna de carbón:celita y eluyendo con etanol al 9% (Fig. 23). Este método permitió por un lado eliminar la lactosa, la fucosa y otros monosacáridos mediante un lavado con etanol al 5% y por otro una elución gradual de LDFT (que eluye primero) y 2-FL con etanol al 9%.



**Figura 23.** TLC de fracciones eluídas de una columna de carbón:celita.

Fracciones eluídas con etanol al 9% de una columna de carbón:celita inyectada con extracto celular y sobrenadante de fermentación (ver Métodos). Se observa una primera elución de LDFT (fracciones 20-43), una mezcla de LDFT y 2-FL (fracciones 48-68) y una elución final con 2-FL conteniendo trazas de LDFT (fracciones 73-103). Control  $1\mu\text{L}$  ( $2\text{g/L}$  de cada azúcar).



**Figura 24.** TLC de muestras purificadas con columna de carbón:celita.

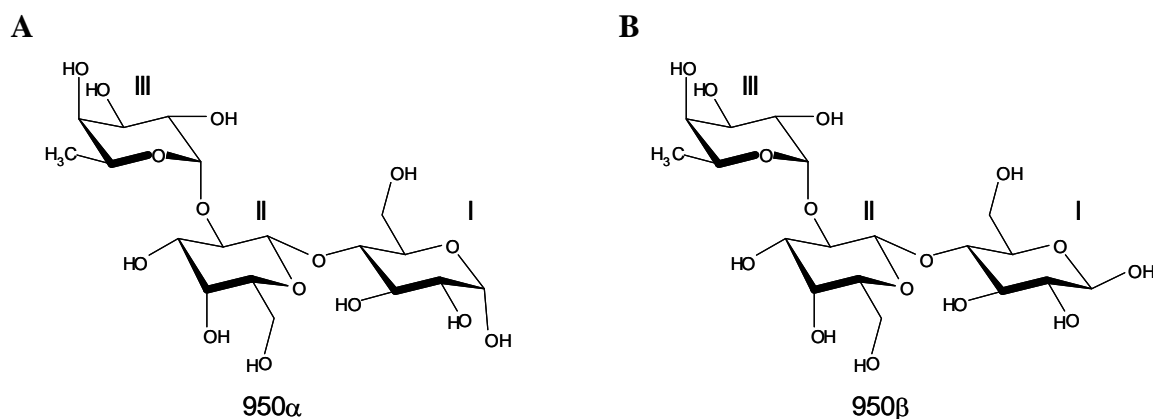
Muestras purificadas a partir de la columna de carbón:celita, evaporadas y liofilizadas. 1. Fracción con LDFT. 2. Fracción 2-FL y pequeñas cantidades de LDFT (flecha). 3. Fracción con 2-FL. C. Control  $1\mu\text{L}$  ( $2\text{g/L}$  de cada azúcar). Las muestras de los carriles 1 y 2 se analizaron por espectrometría de resonancia magnética nuclear.

## Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN).

Dos muestras, una con LDFT y otra con 2-FL y LDFT purificadas a partir de la columna de carbón:celita y rotoevaporadas (Fig. 24) se enviaron para su análisis al Centro de Investigación de Carbohidratos Complejos (Complex Carbohydrate Research Center) de la Universidad de Georgia en E.U.A (<http://www.ccrcc.uga.edu>). El reporte completo se adjunta en el Apéndice 2.

El espectro de RMN confirmó las muestras separadas y evaporadas como lactodifucotetraosa (LDFT) (muestra 1) y 2-fucosil lactosa (2-FL) (muestra 2). La muestra 1 se reportó como prácticamente homogénea, mientras que la muestra 2 contenía un (5% mol) de LDFT. Ambas muestras están compuestas por una mezcla equimolecular de sus anómeros  $\alpha$  y  $\beta$  (Apéndice 2).

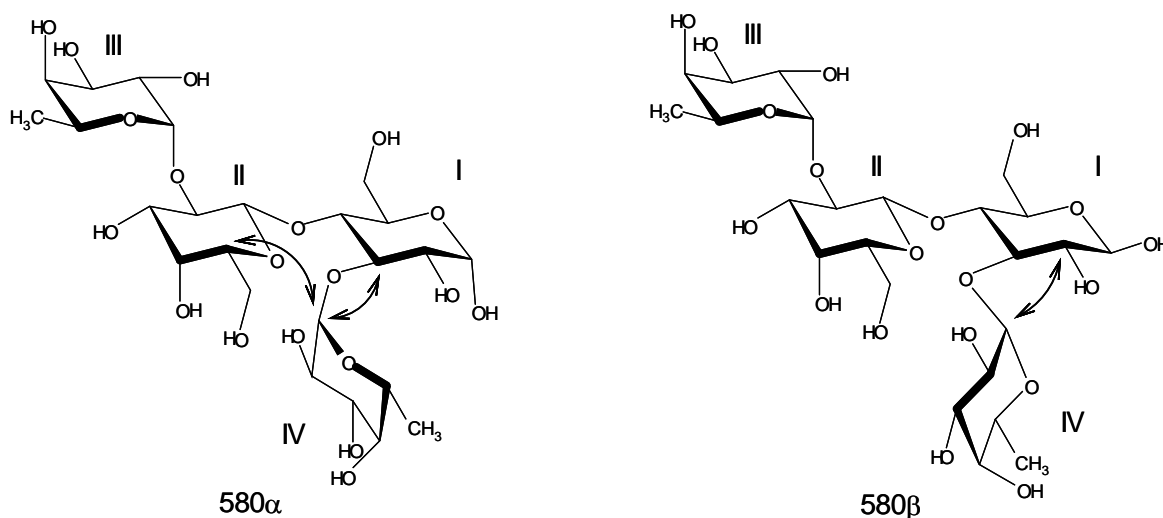
Los desplazamientos químicos (chemical shifts) del oligosacárido de la muestra 2 son consistentes con la estructura de 2-FL. En forma particular, el desplazamiento químico de campo bajo del carbono 2 de la galactosa indica glicosilación en esta posición (el carbono 4 de la glucosa también es de campo bajo, consistente con una unión 1-4 entre la galactosa y la glucosa). Ambos anómeros muestran contactos NOE (Efecto Nuclear de Overhauser) y múltiples correlaciones de uniones  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HMBC) consistentes con la secuencia de 2'-FL (Fig. 25).



**Figura 25.** Estructura propuesta de 2-FL obtenida por RMN.

Anómeros  $\alpha$  (A) y  $\beta$  (B) en base al análisis de espectrometría de RMN.

Los desplazamientos químicos de la muestra 1 concuerdan con la estructura de LDFT. Los desplazamientos de campo bajos del carbón 2 de galactosa y 3 de la glucosa indican glicosilación en estas posiciones. También muestra contactos NOE entre el H-1 del residuo de fucosa y H-2 de glucosa. Se reportan contactos NOE entre el H-1 de fucosa y H-3 de glucosa, pero un inesperado contacto NOE entre el H-1 de fucosa y H-5 de galactosa. Esto se explica postulando diferentes conformaciones de la fucosa relativo al resto de la molécula en los 2 anómeros (Fig. 26).



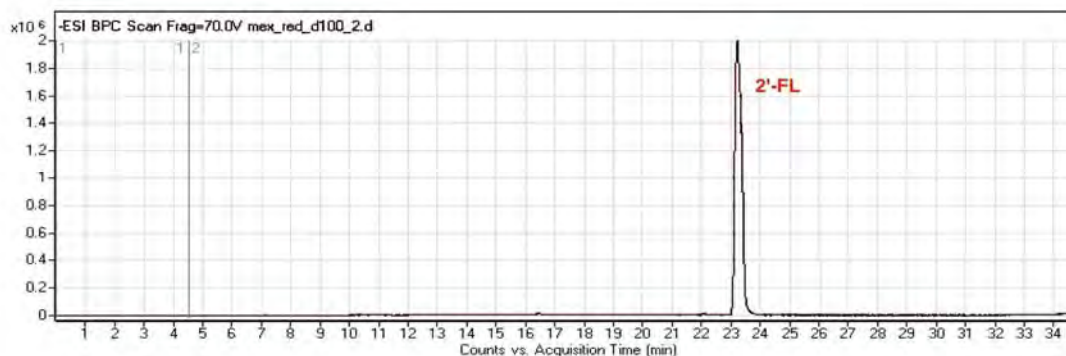
**Figura 26.** Estructura propuesta para LDFT por RMN.

Estructura propuesta para LDFT con las diferentes conformaciones que explicarían los contactos NOE (flechas con doble cabeza).

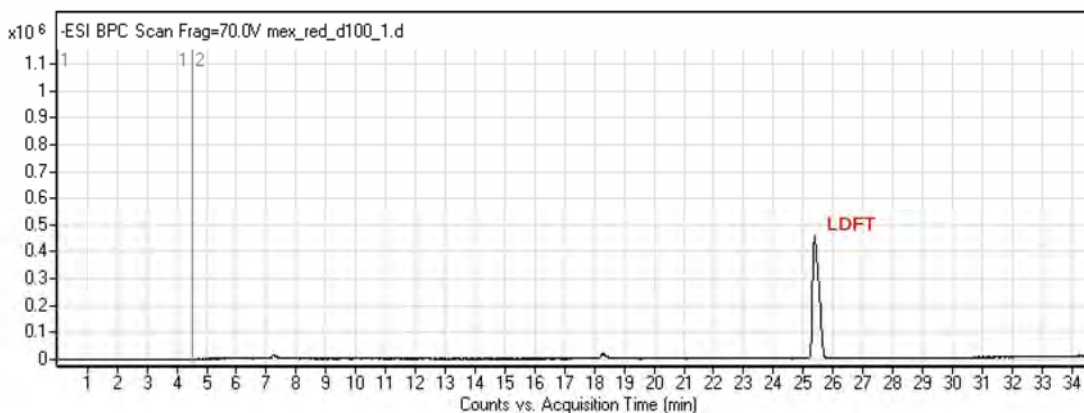
## Análisis LC-MS.

Muestras de 2-FL y LDFT purificadas a partir de una fermentación con una concentración inicial de 15 g/L de lactosa (muestra 1, tabla 4) se analizaron mediante LC-MS mostrando un porcentaje de pureza del 98% y 95% respectivamente (calculado por % de área). Ambas muestras fueron reducidas con NaBH<sub>4</sub> para su análisis y su cuantificación se realizó a partir de una comparación con una curva estándar de cada compuesto (77) (Fig. 27).

A)



B)



**Figura 27.** LC-MS de muestras purificadas.

Muestras de **A.** 2-FL y **B.** LDFT, purificadas a partir de una fermentación con la cepa 2-FL y purificadas mediante columna de carbón:celita con etanol al 9%.

## Producción de 2-FL y LDFT.

En la Tabla 4 se muestran los resultados de 3 fermentaciones con diferentes concentraciones de lactosa (y fucosa en exceso). En los 3 casos se realizó una fermentación en 550 mL de medio de cultivo; los resultados de 2-LF y LDFT son del producto final ya purificado y liofilizado. Aunque sólo las muestras purificadas de 2-FL y LDFT de una

fermentación fueron analizadas por LC-MS mostrando grados de pureza del 95-98% (fig 27), en ningún caso se detectó otro azúcar en el TLC ni rastros de proteína (método de Bradford). Debido a la falta de cuantificación de lactosa a lo largo de la fermentación, el cálculo de los rendimientos se basó en los siguientes supuestos:

1. Debido a que siempre se utilizó una estequiometría 1:2 de (lactosa:fucosa) en los cultivos, se consideró que el reactivo limitante es la lactosa ya que el producto principal (2-FL) necesita una estequiometría de 1:1 y por lo tanto es el reactivo que se utilizó en los cálculos de rendimiento.
2. Se asumió que prácticamente toda la lactosa se transformó en 2-FL y LDFT ya que las placas de TLC muestran escasa o nula presencia de lactosa al final de la fermentación.
3. Se consideró una pureza del 98% en los productos finales (2-FL y LDFT).

Aunque estos supuestos podrían no ser completamente ciertos, consideramos que pueden asumirse con cierta reserva para dar una idea de los rendimientos obtenidos.

El cálculo se realizó considerando el número de moléculas de lactosa que existen en 2-FL y LDFT de cada fermentación y este número se comparó con la lactosa inicial, determinando el porcentaje de transformación de la lactosa a 2-FL y LDFT (Tabla 4).

**Tabla 4.** Purificación final de 2-FL y LDFT de 3 diferentes fermentaciones.

#	Lactosa inicial	2-FL (%)	LDFT (%)	Rendimiento
1	8.25g (15 g/L)	5.18g (80%)*	1.68 g (20%)*	55 %
2	2.75g (5 g/L)	2g (84.8%)	0.4581g (15.2%)	60 %
3	1.1 (2 g/L)	0.484g (94%)	0.04g (6%)	33 %

Producción de 2-FL y LDFT de 3 diferentes experimentos utilizando 550 mL de medio de cultivo. El rendimiento final y los porcentajes de 2-FL y LDFT se calcularon en base a su contenido de lactosa. En los tres casos se utilizó un exceso de fucosa en las fermentaciones. Los porcentajes indican (del total producido) la proporción de la lactosa que se transformó en 2-FL y LDFT.

\*Muestras analizadas por LC-MS dando purezas de 98% para 2-FL y 95% para LDFT.

## DISCUSIÓN.

En el presente trabajo se propuso un método de síntesis de 2-FL mediante un proceso de fermentación basado en el uso de glicosiltransferasas bacterianas clonadas en una cepa de *E. coli* modificada en su metabolismo y utilizando la vía “de rescate” de síntesis de GDP-Fucosa mediante el gen *fkp* (*B. fragilis*).

Se lograron clonar los genes *fkp* y *futC* (*H. pylori*) en una cepa de *E. coli* mutada en sus sistemas de catabolismo de fucosa y lactosa. Este sistema permitió, mediante un proceso de fermentación de alta densidad celular, la transformación de lactosa y fucosa en 2-FL y LDFT. De esta forma se muestra la factibilidad de utilizar esta vía en la síntesis de fuco-oligosacáridos en procesos biotecnológicos.

Nuestros ensayos demostraron que este modelo permite convertir 15 g/L de lactosa en 2-FL y LDFT partiendo de un cultivo alimentado con medio mineral, glucosa como fuente de energía y lactosa y fucosa como sustratos para la síntesis. Con este modelo se logró obtener un método económico y accesible de producción de 2-FL. Aunque el objetivo del trabajo no incluía la estandarización de la purificación de los azúcares sintetizados, análisis preliminares mostraron que es posible lograr un sistema de purificación basado en columnas de carbón activado:celita y utilizando gradientes de etanol como eluyente, obteniendo grados de pureza de 95-98%, determinado por LC-MS. No logramos calcular el rendimiento final en forma directa ya que no se contaba con el equipo analítico (HPLC o GC) para seguir a lo largo del proceso la transformación de la lactosa a 2-FL y LDFT. Sin embargo, el análisis indirecto mostró rendimientos del 33 al 55%, los cuales deben confirmarse mediante un análisis más detallado de la cinética de transformación.

Aunque la metodología con carbón activado:celita utilizada es muy noble en la purificación de azúcares (73–75), permitiendo purificaciones con altos rendimientos y purezas a bajos costos, es un sistema extremadamente lento debido a las bajas velocidades de flujo que maneja. El hecho de que 2-FL y LDFT puedan ser separados en placas de TLC utilizando sílica abre la posibilidad de utilizar sistemas de cromatografía preparativa tipo “flash” con matriz de sílica como alternativa; estos sistemas tienen la ventaja de ser rápidos y fáciles de escalar a partir de los datos originados en TLC (81).

Un hecho inesperado fue la síntesis de LDFT, que lejos de ser un producto no deseado, tiene relevancia ya que, junto con 2-FL, representa uno de los principales oligosacáridos fucosilados presentes en la leche de madres secretoras. Debido al gran interés que genera esta molécula, este método podría ser utilizado para su producción. En nuestro sistema se pudo apreciar que hasta una quinta parte de la lactosa transformada se convirtió en LDFT, pudiendo de esta forma sintetizar hasta 3 g/L partiendo de una concentración inicial de lactosa de 15 g/L y colocando un exceso de fucosa. Para poder favorecer dicha síntesis es necesario determinar por qué se está produciendo y de esta forma tratar de desplazar la reacción hacia LDFT. En este punto planteamos 2 hipótesis:

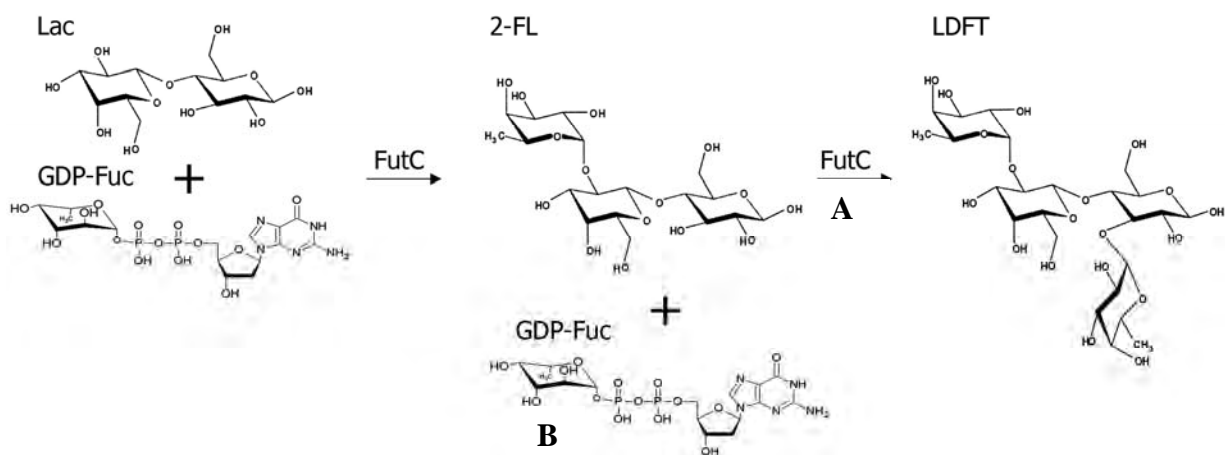
1.- Que las pequeñas diferencias presentes entre la enzima FutC clonada a partir de la cepa silvestre y la utilizada por otros investigadores (y que no reportan síntesis de LDFT) den lugar a una mayor inespecificidad de la enzima provocando que no sólo utilice la lactosa como sustrato sino también 2-FL, logrando de esta forma una doble fucosilación de la molécula. Es ampliamente reportado que las glicosiltransferasas bacterianas en comparación con sus contrapartes eucarióticas presentan una especificidad por más de un sustrato (38).

2.- Que este modelo sea tan eficiente en la activación de GDP-fucosa que produzca una mayor concentración intracelular provocando la doble fucosilación por exceso de sustrato al “forzar” a la enzima a seguir fucosilando aún a costa de su especificidad. Esto explicaría por qué Drouillard *et al.* no reportan síntesis de LDFT al utilizar la misma *futC* de *H. pylori* pero suministrando GDP-fucosa mediante la vía *de novo*, obteniendo cantidades similares de 2-FL.

Además de poder explotar cualquiera de estas dos posibilidades para incrementar la síntesis de LDFT, también podría utilizarse otro tipo de fucosiltransferasas ( $\alpha$ 1-3,  $\alpha$ 1-4,  $\alpha$ 1-6, etc.) para generar moléculas como 3-fucosil lactosa o inclusive más complejas, como LNFP, LNDFH, Le<sup>X</sup>, etc. Incluso podría seguirse explotando el hecho de que las glicosiltransferasas bacterianas tienen especificidad por diferentes sustratos para sintetizar una mayor diversidad de compuestos. Aumentar la complejidad de las moléculas



sintetizadas va de la mano con un aumento en el número de genes (glicosiltransferasas) clonados y una limitante podría ser el número de plásmidos que pudiesen ser aceptados por la bacteria, lo que podría solucionarse creando operones artificiales basados en el promotor de la T7 ARN polimerasa. Este tipo de sistema podría alojar hasta 5Kb de genes por plásmido (82).



**Figura 28.** Modelo propuesto de síntesis de LDFT.

Se propone que la síntesis de LDFT podría estar dada por: **A.** Las diferencias en la secuencia del gen silvestre *futC* que den lugar a una menor especificidad de la enzima ocasionando que no sólo sea capaz de utilizar lactosa sino también fucosile 2-FL, o **B.** Una alta concentración de GDP-fucosa en el medio (provocada por una eficiente conversión de L-fucosa a GDP-fucosa por FKP), origine una segunda fucosilación de 2-FL al encontrarse en exceso uno de los sustratos de FutC.

Una ventaja adicional del presente método sobre la vía *de novo* radica en el hecho de que, en la síntesis de compuestos más complejos, sería ideal la adición escalonada de los diferentes monómeros para guiar la síntesis hacia un producto específico. En este caso, la adición de la fucosa al medio de cultivo podría regular la fucosilación en un momento dado para una síntesis más controlada y dirigida. Utilizando la vía *de novo* hay una constante producción de GDP-fucosa, por lo que las fucosiltransferasas estarían en la posibilidad de adicionar fucosa en cualquier momento lo que podría inhibir pasos posteriores al modificar los sustratos o incrementar la producción de compuestos secundarios. Tomando como ejemplo la síntesis del tetrasacárido del grupo sanguíneo B [Gal- $\alpha$ 1,3(Fuc- $\alpha$ 1,2)Gal- $\beta$ 1,4Glc], sería ideal que la galactosiltransferasa actuara primero sobre la lactosa y posteriormente la fucosiltransferasa para dar el tetrasacárido. De otra forma, la adición

inicial de fucosa a la lactosa para dar 2-FL podría inhibir la acción de la galactosiltransferasa y disminuir el rendimiento de producción.

El hecho de que este método permita la síntesis de 2-FL y LDFT en cantidades de gramos y a un bajo costo, abre la posibilidad de utilizarlos en diversos ensayos en concentraciones similares a las encontradas en la leche humana, que por ejemplo para 2-FL son de 1.8 g/L (3.8 mM) y para LDFT de 0.4 g/L (0.7 mM) (14). Este tipo de ensayos eran difíciles de realizar debido a que su costo por mg de oligosacárido va de los 50 a los 100 dólares (Sigma-Aldrich, Iso-Sep, Glycotech). Cabe señalar que aunque la obtención de estas moléculas por este método es mucho más económica que mediante su purificación a partir de leche humana (haciéndola accesible para estudios de laboratorio), sigue siendo cara pensando en su uso como suplemento de fórmulas lácteas para consumo humano a precios accesibles. Esto principalmente se debe al uso de L-fucosa en el sistema ya que, aunque puede ser adquirida a precios relativamente razonables, es cara para un uso masivo. Por lo anterior, es indispensable analizar fuentes adicionales de este azúcar que puedan ser utilizadas en el sistema propuesto.

Existen varios estudios que han analizado la posibilidad de producir azúcares de difícil obtención como la L-fucosa mediante procesos de fermentación utilizando bacterias con altos niveles de fucosa en su cápsula o polisacárido extracelular (83, 84), con muy buenos rendimientos y a menor precio comparado con la forma tradicional de obtención de L-fucosa a partir de algas (84). Los costos, aunque más económicos, se mantienen elevados debido a los métodos de purificación utilizados para separar los diversos monosacáridos que se obtienen posterior a la hidrólisis de las estructuras complejas. Cabe señalar que en nuestro caso no es necesario utilizar la L-fucosa con un grado elevado de pureza. Los azúcares adicionales (provenientes de la hidrólisis) podrían ser utilizados por la bacteria como fuente de energía o permanecer en el medio y aprovechar los pasos finales de purificación de 2-FL y/o LDFT para eliminarlos al final de proceso, lo que impactaría favorablemente en los costos de producción, por lo que proponemos que un sistema similar de producción pero con un esquema menos complejo de purificación podría ser una adecuada solución al problema de la fuente de L-fucosa.

Durante mucho tiempo el estudio de los azúcares y sus conjugados (glicolípidos, glicoproteínas, mucinas, entre otros) se enfocó principalmente al análisis de su biosíntesis y

su estructura. Esto ha cambiado radicalmente y durante los últimos diez años el campo de la glicobiología ha crecido exponencialmente. El estudio de los glicanos, glicoconjugados y moléculas que interactúan con ellos explicando sus diversas funciones ha sido motivo de un renovado interés (52). Un buen ejemplo de lo anterior lo representa la creación del consorcio para investigación de la función de los carbohidratos y glicoconjugados totales (glicoma) en el humano (Consortium for Functional Glycomics, <http://www.functionalglycomics.org/>). Estos esfuerzos se han visto obstaculizados por diferentes problemas, como son la necesidad de desarrollar métodos que faciliten el análisis de estas complejas estructuras, la creación de herramientas bioinformáticas que soporten la enorme cantidad de datos generados (y su interpretación) y métodos de síntesis que permitan obtener estos azúcares en cantidades suficientes para realizar los estudios necesarios para dilucidar su función. El presente trabajo aporta conocimiento en el desarrollo de métodos de síntesis de oligosacáridos fucosilados a gran escala y precios razonables.

## CONCLUSIONES.

- La cepa modificada de *E. coli* fue capaz de sintetizar 2-FL y LDFT a partir de una fermentación de alta densidad celular utilizando L-fucosa y D-lactosa como sustratos de síntesis y D-glucosa como fuente de energía en medio mineral. Bajo las condiciones seleccionadas la cepa desarrolló entre 95 y 100 unidades de D.O.<sub>600</sub>, y transformó prácticamente toda la lactosa (determinado por TLC) adicionada al medio (15g/L) a 2-FL y LDFT.
- El método de purificación utilizado permitió obtener 2-FL y LDFT con una pureza de 95%-98% y rendimientos del 40-60%. Las cantidades iniciales de sustratos (L-fucosa y D-lactosa) determinaron la relación de producción final de 2-FL:LDFT.
- La cantidad de 2-FL sintetizada es similar a la reportada por Drouillard *et al.* utilizando una vía alterna de síntesis de GDP-fucosa. Sin embargo, el presente sistema también es capaz de sintetizar LDFT, fenómeno que creemos que es un reflejo de la mayor cantidad de GDP-fucosa producida. Una ventaja adicional de este sistema es la capacidad de controlar la fucosilación mediante la adición de L-fucosa, lo cual sería muy provechoso en la síntesis dirigida de fucosilados más complejos.
- Tomando el presente trabajo como paradigma, creemos factible utilizar el gen *fkp* de *B. fragilis* para proveer GDP-fucosa y sintetizar oligosacáridos fucosilados más complejos utilizando diferentes fucosiltransferasas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **Newburg DS.** 2001. Bioactive components of human milk: evolution, efficiency, and protection. *Adv. Exp. Med. Biol.* **501**:3–10.
2. **Chirico G, Marzollo R, Cortinovis S, Fonte C, Gasparoni A.** 2008. Antiinfective properties of human milk. *J. Nutr.* **138**:1801S–1806S.
3. **Kunz C, Rudloff S.** 2006. Health promoting aspects of milk oligosaccharides. *Int. Dairy J.* **16**:1341–1346.
4. **Ballard O, Morrow AL.** 2013. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr. Clin. North Am.* **60**:49–74.
5. **Garrido D, Dallas DC, Mills D a.** 2013. Consumption of human milk glycoconjugates by infant-associated bifidobacteria: mechanisms and implications. *Microbiology* **159**:649–64.
6. **Yu Z-T, Chen C, Newburg DS.** 2013. Utilization of major fucosylated and sialylated human milk oligosaccharides by isolated human gut microbes. *Glycobiology* **0**:1–12.
7. **Kunz C, Rudloff S, Baier W, Klein N, Strobel S.** 2000. Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annu. Rev. Nutr.* **20**:699–722.
8. **Kamerling H, Urashima T, Asakuma S, Messer M.** 2007. Milk Oligosaccharides, p. 695–724. *In* Comprehensive Glycoscience.
9. **Picciano MF.** 2001. Nutrient composition of human milk. *Pediatr. Clin. North Am.* **48**:53–67.
10. **Morrow AL, Ruiz-Palacios GM, Altaye M, Jiang X, Guerrero ML, Meinzenderr JK, Farkas T, Chaturvedi P, Pickering LK, Newburg DS.** 2004. Human milk oligosaccharides are associated with protection against diarrhea in breast-fed infants. *J. Pediatr.* **145**:297–303.
11. **Ruiz-Palacios GM, Cervantes LE, Ramos P, Chavez-Munguia B, Newburg DS.** 2003. *Campylobacter jejuni* binds intestinal H(O) antigen (fuc alpha 1, 2Gal beta 1, 4GlcNAc), and fucosyloligosaccharides of human milk inhibit its binding and infection. *J. Biol. Chem.* **278**:14112–20.
12. **Newburg DS, Ruiz-Palacios GM, Morrow AL.** 2005. Human milk glycans protect infants against enteric pathogens. *Annu. Rev. Nutr.* **25**:37–58.

13. **Ruiz-Palacios GM, Calva JJ, Pickering LK, Lopez-Vidal Y, Volkow P, Pezzarossi H, West MS.** 1990. Protection of breast-fed infants against *Campylobacter* diarrhea by antibodies in human milk. *J. Pediatr.* **116**:707–13.
14. **Newburg DS, Ruiz-Palacios GM, Altaye M, Chaturvedi P, Meinen-Derr J, Guerrero M de L, Morrow AL.** 2004. Innate protection conferred by fucosylated oligosaccharides of human milk against diarrhea in breastfed infants. *Glycobiology* **14**:253–63.
15. **Marionneau S, Ruvoën N, Le Moullac-Vaidye B, Clement M, Cailleau-Thomas A, Ruiz-Palacios GM, Huang P, Jiang X, Le Pendu J.** 2002. Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology* **122**:1967–1977.
16. **Cravioto A, Tello A, Villafán H, Ruiz J, del Vedovo S, Neeser JR.** 1991. Inhibition of localized adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells by immunoglobulin and oligosaccharide fractions of human colostrum and breast milk. *J. Infect. Dis.* **163**:1247–55.
17. **Coppa G V, Zampini L, Galeazzi T, Facinelli B, Ferrante L, Capretti R, Orazio G.** 2006. Human milk oligosaccharides inhibit the adhesion to Caco-2 cells of diarrheal pathogens: *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, and *Salmonella fytis*. *Pediatr. Res.* **59**:377–382.
18. **Newburg DS, Pickering LK, McCluer RH, Cleary TG.** 1990. Fucosylated oligosaccharides of human milk protect suckling mice from heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* **162**:1075–80.
19. **Kretschmar G, Stahl W.** 1998. Large scale synthesis of linker-modified sialyl LewisX, LewisX and N-acetyllactosamine. *Tetrahedron* **54**:6341–6358.
20. **Albermann C, Piepersberg W, Wehmeier UF.** 2001. Synthesis of the milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose using recombinant bacterial enzymes. *Carbohydr. Res.* **334**:97–103.
21. **Ruffing A, Chen RR.** 2006. Metabolic engineering of microbes for oligosaccharide and polysaccharide synthesis. *Microb. Cell Fact.* **5**:25.
22. **Koizumi S, Endo T, Tabata K, Nagano H, J.** 2000. Large-scale production of GDP-fucose and Lewis X by bacterial coupling. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **25**:213–217.
23. **Järvinen N, Mäki M, Rabinä J, Roos C, Mattila P, Renkonen R.** 2001. Cloning and expression of *Helicobacter pylori* GDP-l-fucose synthesizing enzymes (GMD and GMER) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **268**:6458–64.

24. **Coyne MJ, Reinap B, Lee MM, Comstock LE.** 2005. Human symbionts use a host-like pathway for surface fucosylation. *Science*. **307**:1778–81.
25. **Kim J., Froh E.** 2011. What nurses need to know regarding nutritional and immunobiological properties of human milk. *J. Obstet. Gynecol. Neonatal Nursing*. **41**:122–137.
26. **Fernández L, Langa S, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Martín R, Rodríguez JM.** 2013. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol. Res.* **69**:1–10.
27. **Bode L.** 2012. Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. *Glycobiology* **22**:1147–62.
28. **Picciano MF.** 2001. Nutrient composition of human milk. *Pediatr. Clin. North Am.* **48**:53–67.
29. **Kunz C, Rudloff S.** 1993. Biological functions of oligosaccharides in human milk. *Acta Paediatr.* **82**:903–12.
30. **Miller JB, McVeagh P.** 1994. Human milk oligosaccharides. *Acta Paediatr.* **83**:1051–1051.
31. **Mehra R, Kelly P.** 2006. Milk oligosaccharides: Structural and technological aspects. *Int. Dairy J.* **16**:1334–1340.
32. **Gustafsson A, Hultberg A, Sjöström R, Kacs Kovics I, Breimer ME, Borén T, Hammarström L, Holgersson J.** 2006. Carbohydrate-dependent inhibition of *Helicobacter pylori* colonization using porcine milk. *Glycobiology* **16**:1–10.
33. **Hakomori S.** 1989. Aberrant glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens. *Adv. Cancer Res.* **52**:257–331.
34. **Springer TA.** 1995. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu. Rev. Physiol.* **57**:827–72.
35. **Priem B, Gilbert M, Wakarchuk WW, Heyraud A, Samain E.** 2002. A new fermentation process allows large-scale production of human milk oligosaccharides by metabolically engineered bacteria. *Glycobiology* **12**:235–40.
36. **Endo T, Koizumi S.** 2000. Large-scale production of oligosaccharides using engineered bacteria. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 536–541.
37. **Han NS, Kim T-J, Park Y-C, Kim J, Seo J-H.** 2012. Biotechnological production of human milk oligosaccharides. *Biotechnol. Adv.* **30**:1268–78.

38. **Johnson K.** 1999. Synthesis of oligosaccharides by bacterial enzymes. *Glycoconj. J.* **146**:141–146.
39. **Palcic MM.** 2011. Glycosyltransferases as biocatalysts. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **15**:226–33.
40. **Dumon C, Samain E, Priem B.** 2004. Assessment of the two *Helicobacter pylori*  $\alpha$ -1,3-fucosyltransferase ortholog genes for the large-scale synthesis of Lewis X human milk oligosaccharides by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* **20**:412–419.
41. **Drouillard S, Driguez H, Samain E, Sophie Drouillard, Hugues Driguez AES.** 2006. Large-scale synthesis of H-antigen oligosaccharides by expressing *Helicobacter pylori*  $\alpha$ 1,2-fucosyltransferase in metabolically engineered *Escherichia coli* cells. *Angew. Chem. Int. Ed* **86**:1778 –1780.
42. **Wang G, Boulton PG, Chan NW, Palcic MM, Taylor D.** 1999. Novel *Helicobacter pylori*  $\alpha$ 1,2-fucosyltransferase, a key enzyme in the synthesis of Lewis antigens. *Microbiology* **145**:3245–3253.
43. **Wang G, Ge Z, Rasko D a, Taylor D.** 2000. Lewis antigens in *Helicobacter pylori*: biosynthesis and phase variation. *Mol. Microbiol.* **36**:1187–96.
44. **Monteiro M, Chan K, Rasko D, Taylor D.** 1998. Simultaneous Expression of Type 1 and Type 2 Lewis Blood Group Antigens by *Helicobacter pylori* Lipopolysaccharides. *J. Biol.* **273**:11533–11543.
45. **Guohui, Zhao. Wanyi, Guan PGW.** 2010. Enzymatic route to preparative-scale synthesis of UDP-GlcNAC/GalNAc, their analogues and GDP-fucose. *Nat. Protoc.* **5**:636–646.
46. **Weijers C a GM, Franssen MCR, Visser GM.** 2008. Glycosyltransferase-catalyzed synthesis of bioactive oligosaccharides. *Biotechnol. Adv.* **26**:436–56.
47. **Seong-Goo B, Myoung-Dong K, Won-Heong L, Kun-Jae L, Nam H, Seo J-H.** 2007. Production of GDP-l-fucose, l-fucose donor for fucosyloligosaccharide synthesis, in recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**:768–775.
48. **Albermann C, Distler J, Piepersberg W.** 2000. Preparative synthesis of GDP- $\beta$ -L-fucose by recombinant enzymes from enterobacterial sources. *Glycobiology* **10**:875–881.
49. **Dumon C, Priem B, Martin SL, Heyraud A, Bosso C, Samain E.** 2001. In vivo fucosylation of lacto-N-neotetraose and lacto-N-neohexaose by heterologous



expression of *Helicobacter pylori* alpha-1,3 fucosyltransferase in engineered *Escherichia coli*. *Glycoconj. J.* **18**:465–74.

50. **Mattila P, Rabinä J, Hortling S, Helin J, Renkonen R.** 2000. Functional expression of *Escherichia coli* enzymes synthesizing GDP-L-fucose from inherent GDP-D-mannose in *Saccharomyces cerevisiae*. *Glycobiology* **10**:1041–1047.
51. **Becker DJ, Lowe JB.** 2003. Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology* **13**:41R–53R.
52. 2012. *Transforming Glycoscience: A Roadmap for the Future*. The National Academies Press, New York, USA.
53. **Ravn V, Dabelsteen E.** 2000. Tissue distribution of histo-blood group antigens. *APMIS* **108**:1–28.
54. **Audfray A, Varrot A, Imberty A.** 2013. Bacteria love our sugars: Interaction between soluble lectins and human fucosylated glycans, structures, thermodynamics and design of competing glycoconjugates. *Comptes Rendus Chim.* **16**:482–490.
55. **Marionneau S, Cailleau-Thomas a, Rocher J, Le Moullac-Vaidye B, Ruvoën N, Clément M, Le Pendu J.** 2001. ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. *Biochimie* **83**:565–73.
56. **Samain E.** 2007. Production of Oligosaccharides in Microbes, p. 923–947. *In* Kamerling, J (ed.), *Comprehensive Glycoscience*. Elsevier Science.
57. **Schmaltz RM, Hanson SR, Wong C-H.** 2011. Enzymes in the synthesis of glycoconjugates. *Chem. Rev.* **111**:4259–307.
58. **Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors. *Gene* **33**.
59. **Van de Walle M, Shiloach J.** 1998. Proposed mechanism of acetate accumulation in two recombinant *Escherichia coli* strains during high density fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **57**:71–8.
60. **Shiloach J, Kaufman J, Guillard AS, Fass R.** 2000. Effect of glucose supply strategy on acetate accumulation, growth, and recombinant protein production by *Escherichia coli* BL21 ( $\lambda$ DE3) and *Escherichia coli* JM109. *Biotechnol. Bioeng.* **49**:421–428.

61. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Segunda edición. Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
62. **Bartkus JM, Mortlock RP.** 1986. Isolation of a mutation resulting in constitutive synthesis of L-fucose catabolic enzymes. *J. Bacteriol.* **165**:710–4.
63. **Lu Z, Lin E.** 1989. The nucleotide sequence of *Escherichia coli* genes for L-fucose dissimilation. *Nucleic Acids Res.* **17**:4883–4884.
64. **Horton RM, Hunt HD, Ho SN, Pullen JK, Pease LR.** 1989. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* **77**:61–68.
65. **Wurch T, Lestienne F, Pauwels PJ.** 1998. A modified overlap extension PCR method to create chimeric genes in the absence of restriction enzymes. *Biotechnology* **12**:653–657.
66. **Hamilton CM, Aldea M, Washburn BK, Babitzke P, Kushner SR.** 1989. New method for generating deletions and gene replacements in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**:4617–4622.
67. **Rasko DA, Wang G, Monteiro MA, Palcic MM, Taylor D.** 2000. Synthesis of mono- and di-fucosylated type I Lewis blood group antigens by *Helicobacter pylori*. *Fed. Eur. Biochem. Soc. J.* **267**:6059–6066.
68. **Kovach M, Elzer P, Hill DS, Robertson G, Farris M, Roop II R, Peterson K.** 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**:175–176.
69. **De Boer H, Comstock L, Vasser M.** 1983. The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**:21–25.
70. **Wakarchuk W, Campbell R, Sung W, Davoodi J, Yaguchi M.** 1994. Mutational and crystallographic analyses of the active site residues of the *Bacillus circulans* xylanase. *Protein Sci.* 467–475.
71. **Fried B, Sherma J.** 1999. *Thin-layer chromatography*. 4° edición. CRC Press, New York, USA.
72. **Samain E, Drouillard S, Heyraud A, Driguez H, Geremia RA.** 1997. Gram-scale synthesis of recombinant chitooligosaccharides in *Escherichia coli*. *Carbohydr. Res.* **302**:35–42.
73. **Whistler R, Durso D.** 1950. Chromatographic Separation of Sugars on Charcoal. *J. Am. Chem.* 677–679.

74. **Kuhn RCC, Filho FMM.** 2010. Purification of fructooligosaccharides in an activated charcoal fixed bed column. *New Biotechnol.* **27**:862–869.
75. **Morales V, Sanz ML, Olano a., Corzo N.** 2006. Rapid Separation on Activated Charcoal of High Oligosaccharides in Honey. *Chromatographia* **64**:1–6.
76. **Kuhn RCC, Filho FMM.** 2010. Separation of fructooligosaccharides using zeolite fixed bed columns. *J. Chromatogr. B* **878**:2023–2028.
77. **Bao Y, Chen C, Newburg DS.** 2013. Quantification of neutral human milk oligosaccharides by graphitic carbon high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **433**:28–35.
78. **Tomb JF, White O, Kerlavage a R, Clayton R a, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum K a, Klenk HP, Gill S, Dougherty B a, Nelson K, Quackenbush J, Zhou L, Kirkness EF, Peterson S, Loftus B, Richardson D, Dodson R, Khalak HG, Glodek a, McKenney K, Fitzegerald LM, Lee N, Adams MD, Hickey EK, Berg DE, Gocayne JD, Utterback TR, Peterson JD, Kelley JM, Cotton MD, Weidman JM, Fujii C, Bowman C, Wattley L, Wallin E, Hayes WS, Borodovsky M, Karp PD, Smith HO, Fraser CM, Venter JC.** 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**:539–47.
79. **Berg D, Hoffman P, Appelmek B, Kusters J.** 1997. The *Helicobacter pylori* genome sequence: genetic factors for long life in the gastric mucosa. *Trends Microbiol.* **5**:468–474.
80. **Li M, Liu X, Shao J, Shen J, Jia Q, Yi W, Song J.** 2008. Characterization of a novel 1, 2-fucosyltransferase of *Escherichia coli* O128: B12 and functional investigation of it's common motif. *Biochemistry* **37**:378–387.
81. 2010. Effective Organic Compound Purification. Teledyne Isco., Lincoln, NE USA.
82. **Tan S.** 2001. A modular polycistronic expression system for overexpressing protein complexes in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **21**:224–34.
83. **Freitas F, Alves VD, Torres C a. V, Cruz M, Sousa I, Melo MJ, Ramos AM, Reis M a. M.** 2010. Fucose-containing exopolysaccharide produced by the newly isolated Enterobacter strain A47 DSM 23139. *Carbohydr. Polym.* **83**:159–165.
84. **Vanhooren PT, Vandamme EJ.** 1999. L-Fucose: occurrence, physiological role, chemical, enzymatic and microbial synthesis. *Chem. Technol.* **497**:479–497.

## ANEXO I.

**Tabla de iniciadores utilizados.**

Nombre de Iniciador	Secuencia (5'-3')	Referencia
Z5-1	AAAAGGATCCTTGCGCAGCCTGAATGGCGAA	(40)
Z5-2	GTTATCCAGCGGTGCACGGCCGCTGGCGACCTGCGTT	(40)
Z3-1	CCGTGCACCGCTGGATAAC	(40)
Z3-2	ACACGGATCCTCAGCTGGAATTCGCCGA	(40)
fucla-F	CAGCTTACCGAAAATTGGTATCCG	Este estudio
fucla-R	GTAAATCTTCTGATCTTAAATGGAGAATGCTGGGATG	Este estudio
fuclb-F	GATCAGAAGATTTACGACG	Este estudio
fuclb-R	GAGTAATGTATTAACGCTTGTAACAACGGACC	Este estudio
Fuct2-P1	AGGATCCCATATGGCTTTTAAGGTGGTGCA	(41)
Fuct2-P2	TTATTTTCGGGTGGTGGTGGTAGAGTGAAGTTTGCTTGATTAAGG	(41)
Fuct2-P3	CACTCTACCACCACCACCCGAAAATAATAAGAATAATAATAAAAAAGAG	(41)
Fuct2-P4	ATCTAGAGCGTTATACTTTTGGGATTTTACCTC	(41)
Fkp-1	CAGGATCCATGAGAAGTGGAAAATGATGGAAC	Este estudio
Fkp-2	CTGGATCCTATTTTATGATCGTGATACTTGAATC	Este estudio
FkpS-1	GCCATCCACCTCCGG	Este estudio
FkpS-2	CGATGCGCACGGGGC	Este estudio
FkpS-3	GACCGTATGGACGG	Este estudio
FkpS-4	CCAATTCTGCCAACG	Este estudio
Fuc-F	CGCGGGCGGTTATCGAATGATGGG	Este estudio
Fuc-R	GGCCGGGGCGTCGTCTCCGGCCTGC	Este estudio
pCWLgtA-F	CTTTAAGCTTCCGGCTCGTATAA	Este estudio
pCWLgtA-R	GACAGCTTATCATCGATAAGCTT	Este estudio
T7-Terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Novagen
T7-Promoter	TAATACGACTCACTATAGGG	Novagen
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGC	Stratagen
T3	GAAATTAACCCTCACTAAAGGG	Stratagen

## ANEXO II

### Reporte de muestras enviadas al CCRC

## COMPLEX CARBOHYDRATE RESEARCH CENTER

### ANALYTICAL SERVICE REPORT

Subject: Proton NMR of two samples  
Sample: 580, 950  
CCRC Code: FC060810B  
Analyst: Christian Heiss

Methods:

#### NMR Spectroscopy

The samples were deuterium exchanged by dissolving in D<sub>2</sub>O and lyophilization. The sample was dissolved in 80  $\mu$ L D<sub>2</sub>O and, after addition of 6  $\mu$ L 1 % acetone in D<sub>2</sub>O, placed in a 3 mm Shigemi NMR tube. 1-D Proton, TOCSY and NOESY NMR spectra, run with water presaturation, and gradient enhanced COSY, HSQC, and gHMBC spectra were acquired on a Varian Inova-600 MHz spectrometer at 25 °C. Chemical shifts were measured relative to internal acetone ( $\delta_{\text{H}}=2.218$  ppm,  $\delta_{\text{C}}=33.0$  ppm). The acquisition parameters are listed in the Table 1.

Table 1. NMR Acquisition parameters.

Experiment	Sample	sw	sw1	nt	ni	at	mix	np
Proton	580	3415		8		1998		13648
	950	3205		4		1998		12808
<sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H gCOSY	580	3415	3415	4	800	300		2048
	950	3205	3205	4	512	300		2048
<sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H TOCSY	580	3415	3415	8	400	300	120	2048
	950	3205	3205	8	128	300	120	2048
<sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H NOESY	580	3415	3415	16	128	150	400	1024
	950	3205	3205	16	128	150	400	1024
<sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C gHSQC	580	3415	10555	64	128	200		1366
	950	3205		64	128	200		1366
<sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C gHMBC	580	3415	8000	128	128	128		874
	950	3205		128	128	128		874

Abbreviations used:

sw: spectral width in the directly detected dimension (<sup>1</sup>H) in Hz

sw1: spectral width in the indirectly detected dimension (<sup>13</sup>C or <sup>31</sup>P) in Hz

nt: number of transients

ni: number of increments

at: acquisition time in ms

mix: Mixing (spinlock) time in ms

np: number of points in the directly detected dimension

## Results:

The NMR spectra confirmed the identity of the main component in each sample. Thus, Sample 950 was confirmed as 2'-fucosyllactose (2'-FL) and Sample 580 was confirmed as lactodifucotetraose (LDFT). Sample 580 was largely homogeneous, but Sample 950 contained about 5 mol% LDFT as an impurity.

Both samples consist of a roughly equimolar mixture of  $\alpha$ - and  $\beta$ -anomers, which have significantly different chemical shifts not only in the reducing end residues, but also in the fucose residues. Only the galactose residue has identical chemical shifts in both anomers of each respective oligosaccharide.

The proton and carbon chemical shifts of oligosaccharide 580 are consistent with the structure of 2'FL. In particular, the downfield shift of C-2 of Gal (bold in Table 2) indicates glycosylation in this position (C-4 of I is also downfield, consistent with the 1-4-linkage between Gal and Glc). Both anomers of oligosaccharide 950 showed NOE contacts and multiple-bond  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  correlations (HMBC) consistent with the sequence of 2'-FL.

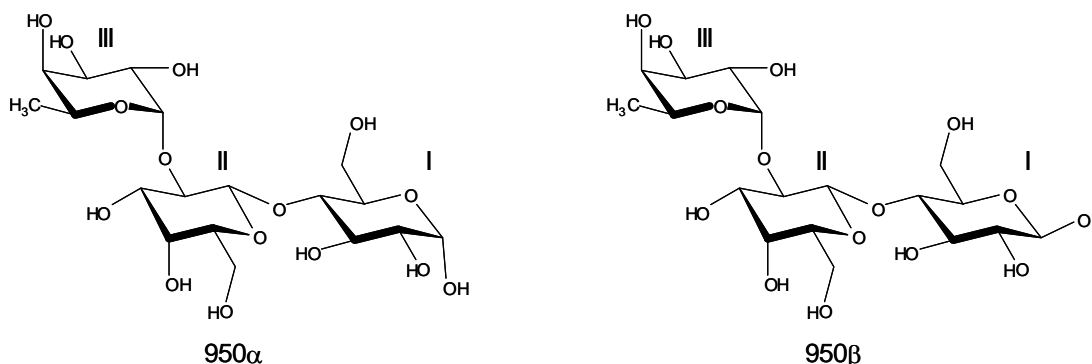


Table 2. Chemical shift assignments of Sample 950 (2'-FL). Carbon chemical shifts downfield relative to unsubstituted monosaccharides are bold.

Residue	Chemical shift/ppm (coupling constant/Hz)							NOE HMBC
	1	2	3	4	5	6		
I $\alpha$	4- $\alpha$ -Glc	$^1\text{H}$ 5.219 (3.7)	3.58	3.80	3.71	3.91	3.88/3.79	
		$^{13}\text{C}$ 94.7 (169)	74.0	74.0	<b>78.0</b>	73.1	62.8	
I $\beta$	4- $\beta$ -Glc	$^1\text{H}$ 4.631 (7.8)	3.29	3.58	3.72	3.47	3.94/3.76	
		$^{13}\text{C}$ 98.6 (163)	76.6	77.1	<b>78.7</b>	78.2	63.0	
II	2- $\beta$ -Gal	$^1\text{H}$ 4.519 (7.8)	3.66	3.87	3.89	3.68	3.80/3.73	I $\alpha$ -4, I $\beta$ -4
		$^{13}\text{C}$ <b>102.9</b> (163)	<b>79.2</b>	76.4	71.9	78.0	64.0	I $\alpha$ -4, I $\beta$ -4
III $\alpha$	$\alpha$ -Fuc(1 $\rightarrow$ 2Gal) ( $\alpha$ )	$^1\text{H}$ 5.305 (<2)	3.79	3.79	3.81	4.251	1.220	II-2
		$^{13}\text{C}$ <b>102.2</b> (175)	71.0	72.4	74.5	69.8	18.3	II-2
III $\beta$	$\alpha$ -Fuc(1 $\rightarrow$ 2Gal) ( $\beta$ )	$^1\text{H}$ 5.305 (<2)	3.79	3.79	3.81	4.222	1.220	II-2
		$^{13}\text{C}$ <b>102.2</b> (175)	71.0	72.4	74.5	69.8	18.3	II-2

The chemical shifts of Oligosaccharide 580 are in full agreement with the structure of LDFT. Thus, the downfield chemical shifts of C-2 of II and C-3 of I indicate glycosylation in these positions. Oligosaccharide 580 $\beta$  showed an NOE contact between H-1 of fucose residue IV and H-2 (instead of the expected H-3) of Glc (Residue I). Conversely, 580 $\alpha$  showed the expected NOE between H-1 of IV and H-3 of I, but an unexpected NOE between H-1 of IV and H-5 of II. This is explained by postulating a different conformation of fucose residue IV relative to rest of the molecule in the two anomers, as illustrated in the scheme below (NOE contacts indicated by double-headed arrows).

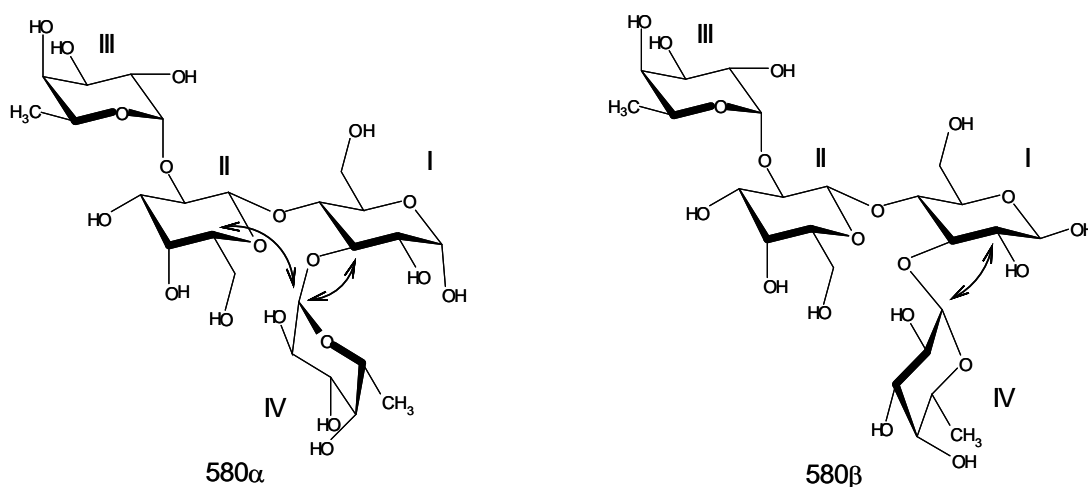


Table 3. Chemical shift assignments of Sample 580 (LDFT). Carbon chemical shifts downfield relative to unsubstituted monosaccharides are bold.

Residue		Chemical shift/ppm (coupling constant/Hz)							NOE
		1	2	3	4	5	6	HMBC	
I $\alpha$	3,4- $\alpha$ -Glc	$^1\text{H}$	5.169 (3.8)	3.75	3.898	3.842	3.92	3.91/3.82	
		$^{13}\text{C}$	94.9 (167)	75.7	<b>77.5</b>	<b>75.3</b>	73.6	62.5	
I $\beta$	3,4- $\beta$ -Glc	$^1\text{H}$	4.615 (7.9)	3.47	3.69	3.86	3.45	3.97/3.79	
		$^{13}\text{C}$	98.9 (160)	78.5	<b>79.9</b>	<b>75.4</b>	78.5	62.8	
II	2- $\beta$ -Gal	$^1\text{H}$	4.484 (7.7)	3.62	3.84	3.86	3.58	3.74/3.71	I $\alpha$ -4, I $\beta$ -4
		$^{13}\text{C}$	<b>102.8</b> (160)	<b>79.2</b>	76.4	71.7	77.8	64.2	I $\alpha$ -4, I $\beta$ -4
III $\alpha$	$\alpha$ -Fuc(1 $\rightarrow$ 2Gal) ( $\alpha$ )	$^1\text{H}$	5.274 (3.8)	3.79	3.761	3.811	4.284	1.258	II-2
		$^{13}\text{C}$	<b>102.1</b> (173)	71.0	72.6	74.7	69.8	18.25	II-2
III $\beta$	$\alpha$ -Fuc(1 $\rightarrow$ 2Gal) ( $\beta$ )	$^1\text{H}$	5.274 (3.8)	3.79	3.761	3.811	4.251	1.258	
		$^{13}\text{C}$	<b>102.1</b> (173)	71.0	72.6	74.7	69.6	18.25	
IV $\alpha$	$\alpha$ -Fuc(1 $\rightarrow$ 3 $\alpha$ Glc)	$^1\text{H}$	5.386 (4.0)	3.78	3.973	3.811	4.874	1.236	I $\alpha$ -3, II-5
		$^{13}\text{C}$	<b>101.2</b> (173)	71.0	71.9	74.7	69.3	18.25	I $\alpha$ -3
IV $\beta$	$\alpha$ -Fuc(1 $\rightarrow$ 3 $\beta$ Glc)	$^1\text{H}$	5.443 (4.0)	3.78	3.967	3.811	4.851	1.230	I $\beta$ -2
		$^{13}\text{C}$	<b>101.2</b> (173)	71.0	71.9	74.7	69.3	18.25	I $\beta$ -3

**Comments:**

The identity of Samples 950 and 580 has been confirmed by 2-D NMR as 2'-FT and LDFT, respectively. Sample 950 contained about 5 % LDFT as impurity.

If you have any further questions please contact Dr. Parastoo Azadi at 706.543-0629 or [azadi@ccrc.uga.edu](mailto:azadi@ccrc.uga.edu).