

CARACTERIZACIÓN DE PROMOTORES GLUCOSILTRANSFERASA DE *Leuconostoc mesenteroides*

Maricarmen Quirasco¹, Martha A. Argüello², Enrique Merino¹, Pierre Monsan³, Agustín López-Munguía¹ y Amelia Farrés¹

¹ Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, D.F.

² Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 510-3, 62210 Cuernavaca, Mor., México

³ Centre de Bioingénierie Gilbert Durand, UMR CNRS 5504, UMR INRA 792, INSA, 31077 Toulouse cedex 4, Francia

Palabras clave: g glucosiltransferasa, promotor, curvatura del ADN

Introducción. Las glucosiltransferasas son enzimas extracelulares que catalizan a partir de sacarosa la síntesis de un polímero de glucosa de alto peso molecular. De acuerdo a la estructura del polímero, las glucosiltransferasas pueden clasificarse en tres grupos: dextran-sacarosas, alternansacarosas y mutansacarosas. Las glucosiltransferasas son producidas por bacterias lácticas de los géneros *Leuconostoc* y *Streptococcus* principalmente. Actualmente se han clonado y secuenciado cinco genes glucosiltransferasa de *L. mesenteroides*: *asr* y *dsr-C* de la cepa B-1355 [1, 2]; *dsr-A* y *dsr-B* de B-1299 [3, 4] y *dsr-S* de B-512F [5]. A diferencia de las glucosiltransferasas de *Streptococcus*, las enzimas de *L. mesenteroides* son inducidas por la sacarosa aunque el mecanismo de inducción no ha sido claramente identificado [6].

El objetivo de este trabajo es estudiar la regulación de los genes *asr*, *dsr-A*, *dsr-B*, *dsr-C* y *dsr-S* de *L. mesenteroides*.

Metodología. Una vez que se montó la técnica de extracción del ARN total [6], se hicieron los ensayos de hibridación para determinar la forma y el tamaño de los transcritos. Las sondas que se utilizaron para las hibridaciones corresponden a fragmentos internos de los genes *asr*, *dsr-A*, *dsr-B* y *dsr-S*. El amino terminal del ADNc fue amplificado utilizando el kit "5' RACE" de Gibco BRL y secuenciado. Así, las secuencias promotoras fueron identificadas y analizadas. Las predicciones de la curvatura del ADN fueron efectuadas con el algoritmo BEND.

Resultados y Discusión. En este trabajo se estudió la regulación de los genes

glucosiltransferasa de *L. mesenteroides* NRRL B-512F, B-1299 y B-1355 por el análisis de los ARNm. Nuestros resultados indican que los genes *asr*, *dsr-A*, *dsr-B*, *dsr-C* y *dsr-S* son regulados a nivel transcripcional. El promotor *dsr-S* presenta una región -10 homologa al consenso en procariotes. Sin embargo, la región -35 no presenta homología. De igual manera, se identificaron los promotores de los genes *asr*, *dsr-A*, *dsr-B* y *dsr-C*. Las predicciones de la curvatura de las secuencias promotoras de estos genes se hicieron utilizando 240 pb hacia arriba del inicio de los respectivos genes estructurales. El análisis indica que los promotores se localizan en una región curva. Estos resultados sugieren que la curvatura del ADN en la región promotora del gen *dsr-S* es la responsable de que a pesar de tener un promotor atípico, el gen se exprese con alta eficiencia. Existen reportes donde se han caracterizado genes de *Escherichia coli* que se expresan en la fase estacionaria y donde los promotores se encuentran en regiones de curvatura elevada. Esto indica que la curvatura en el promotor parece no estar relacionada con el fenómeno de inducción de la síntesis de las glucosiltransferasas de *L. mesenteroides* por la sacarosa, ya que los promotores de genes constitutivos se encuentran en zonas curvas. Sin embargo, en el caso de que fuera otra molécula la que activara la síntesis de las glucosiltransferasas y que esta tuviera afinidad por las regiones de ADN curvas, entonces sí habría una relación entre la curvatura del ADN y la inducción del gen.

Conclusiones. Los genes *asr*, *dsr-A*, *dsr-B*, *dsr-C* y *dsr-S* de *L. mesenteroides* son regulados a nivel transcripcional. El gen *dsr-S* presenta un

promotor atípico. La transcripción de los genes *asr*, *dsr-A*, *dsr-B*, *dsr-C* y *dsr-S* se efectúa de manera eficiente debido probablemente a que los promotores se encuentra en regiones curvas.

Agradecimientos. Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, proyectos no. 135590-B y 35536-B.

Bibliografía.

- [1] Argüello-Morales, M., Remaud-Simeon, M., Pizzut, S., Sarcabal, P., Willemot, R. M. and Monsan, P. (2000) Sequence analysis of the gene encoding alternansucrase, a sucrose glucosyltransferase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355. *FEMS Microbiol. Lett.* 182:81-85.
- [2] Argüello- Morales, M. (2000) Tesis Doctoral, "L'alternansaccharase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355: structure primaire et synthèse d'oligosides".
- [3] Monchois, V., Willemot, R. M., Remaud-Simeon, M., Croux, C. and Monsan, P. (1996) Cloning and sequencing of a gene coding for a novel dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 synthesizing only $\alpha(1,6)$ and $\alpha(1,3)$ linkages. *Gene.* 182:23-32.
- [4] Monchois, V., Remaud-Simeon, M., Monsan, P. and Willemot, R. M. (1998) Cloning and sequencing of an extracellular dextransucrase (DSR-B) from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 synthesizing $\alpha(1,6)$ glucan. *FEMS Microbiol. Lett.* 159:307-315.
- [5] Wilke-Douglas, M., Perchorowicz, J., Houck, C. And Thomas, B. (1989) Methods and compositions of altering physical characteristics of fruit products. Patente WO 89/12386.
- [6] Quirasco, M., López-Munguía, A., Remaud-Simeon, M., Monsan, P. and Farrés, A. (1999) Induction and transcription studies of dextransucrase gene in *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:5504-5509.