

20.260

CARACTERIZACION DE LA EXPRESION GENICA
DEL OPERON *CITQRP*
DE *LACTOCOCCUS LACTIS* BIOVAR DIACETYLLACTIS



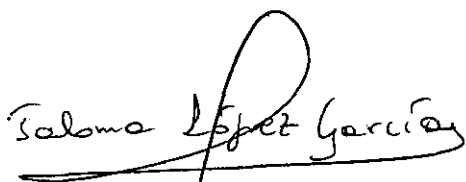
* 5 3 0 9 5 4 1 7 4 X *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

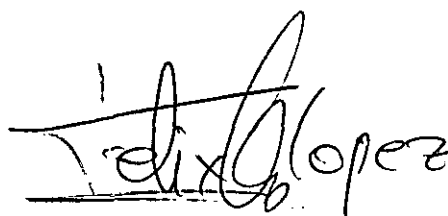
Memoria presentada por el Ldo. Felix López de Felipe Toledano para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense, Dpto. de Microbiología, Diciembre 1994

ESTA TESIS HA SIDO REALIZADA EN LA UNIDAD DE ESTRUCTURA Y FUNCION
DE PROTEINAS DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS, MADRID,
BAJO LA DIRECCION DE LA DRA. PALOMA LOPEZ GARCIA

Vº Bº del Director



Dra. PALOMA LOPEZ GARCIA
INVESTIGADOR CIENTIFICO



FELIX LOPEZ DE FELIPE TOLEDANO



Centro de
Investigaciones
Biológicas

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a la Dra. Paloma López García, directora de esta Tesis, por haber mostrado su confianza en mi para la realización de este trabajo. Gracias por tus enseñanzas, consejos y ayuda permanentes, sin los cuales no habría podido llevar a cabo esta Memoria.

Deseo agradecer al Dr. Manuel Espinosa Padrón el interés mostrado por este trabajo durante todos estos años, así como el apoyo intelectual y de infraestructura que nos ha prestado.

Quisiera mencionar a una de las personas que dignifican esta profesión, el Dr. Joaquín Martínez Suárez, Investigador del Instituto de Salud Carlos III, por haber contribuido decisivamente a mi formación científica. Gracias por haberme transmitido tus conocimientos y por haberme contagiado la ilusión por este trabajo. Pero ante todo, gracias por tu amistad, con todo lo que ello conlleva.

Quiero hacer una mención especial a las personas que han convivido conmigo día a día en el laboratorio. Gracias a Asun, Monica, Javier, M^a Angeles y Bruno por vuestra ayuda en esta Tesis y por todos los momentos que hemos compartido.

Asimismo quiero agradecer a todos mis compañeros de grupo el haberme brindado su amistad y apoyo. Gracias a M^a Teresa, Gabi, Leda, Miriam, Paloma, Gloria, Pepe, Ana y Antonio.

También quisiera agradecer al Dr. Rodolfo Luján Marca, su gran amistad y su disposición para ayudarme en todo momento.

A Maite, Remedios y Pedro quisiera agradecerles el desempeño eficaz de su labor así como el buen humor que han exhibido casi siempre.

Finalmente quiero agradecer a Aurelio Hurtado, Ricardo Uña y demás personal del servicio técnico por su ayuda en la realización de los dibujos y fotografías incluidos en esta Memoria.

Esta tesis ha sido realizada gracias a una beca financiada por la Comunidad Económica Europea.

*A mis padres, a mi
hermana Loli y a mi familia*

A Estrella

Abreviaturas

A	adenosina
Ap	ampicilina
Ap ^r	resistencia a Ap
C	citidina
CAT	cloramfenicol acetil transferasa
Cm	cloramfenicol
Cm ^r	resistencia cloramfenicol
cols	colaboradores
cpm	cuentas por minuto
Da	daltons
DNA	ácido desoxirribonucleico
downstream	cadena abajo
dsDNA	DNA de doble cadena
EDTA	N,N,N',N'-etilendiamino tetraacetato disódico
Em	ertromicina
Em ^r	resistencia a Em
G	guanosina
h	hora
IPTG	isopropil- β -D-galactopiranosido
Kb	kilobases
kDa	kilodaltons
Km	kanamicina
Km ^r	resistencia a kanamicina
M	molar
min	minuto
mM	milimolar
mRNA	RNA mensajero
nm	nanometros
n ^o -mer	oligonucleótido de longitud n
nt	nucleótidos

Abreviaturas

ORF	cuadro de lectura abierto
NTP	ribonucleósido 5'-trifosfato
pb	pares de bases
PEG	polietilenglicol
PIPES	ácido 1,4-piperazin dietanosulfónico
primer	cebador
Rif	rifampicina
RNA	ácido ribonucleico
rpm	revoluciones por minuto
s	segundo
SDS	dodecil sulfato sódico
ssDNA	DNA de cadena sencilla
T	timidina
Tc	tetraciclina
Tc ^r	resistencia a tetraciclina
TE	Tris 10 mM:EDTA 1 mM
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilen-diamina
Tris	trihidroximetil-amino-metano
t-RNA	RNA de transferencia
U	unidades
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactósido

INTRODUCCION	1
- IMPORTANCIA DEL METABOLISMO DEL CITRATO EN LA INDUSTRIA LACTEA	1
- ESTUDIOS SOBRE EL METABOLISMO DEL CITRATO EN LAS FERMENTACIONES LACTICAS	2
- PLASMIDOS IMPLICADOS EN LA UTILIZACION DE CITRATO EN <i>Lactococcus lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	7
- LA CITRATO PERMEASA P DE <i>L. lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	9
- SISTEMAS DE TRANSPORTE DE CITRATO DE LAS ENTEROBACTERIAS	10
OBJETIVOS	14
MATERIALES	15
1. MATERIAL BIOLÓGICO	15
1.1 Estirpes bacterianas	15
1.2 Bacteriófagos	16
1.3 Plásmidos	16
2. MEDIOS DE CULTIVO	18
2.1. Medios de cultivo para <i>E. coli</i>	18
2.2 Medio de cultivo de <i>S. pneumoniae</i>	18
2.3 Medio de cultivo de <i>B. subtilis</i>	18
2.4 Medio de cultivo de <i>L. lactis</i>	19
3. PROTEINAS Y ENZIMAS	19
4. KITS COMERCIALES	20
5. OTROS MATERIALES Y PRODUCTOS	20

METODOS	21
1. CRECIMIENTO Y METODOS DE TRANSFORMACION DE ESTIRPES BACTERIANAS	21
2. EXTRACCION DE DNA	22
2.1. Minipreparaciones de DNA plasmídico	22
2.2. Preparación de extractos de DNA totales de <i>L. lactis</i>	22
2.3. Preparación de plásmidos puros	23
3. FENOLIZACION, PRECIPITACION Y DIALISIS DEL DNA	24
4. EXTRACCION Y PURIFICACION DE FRAGMENTOS DE DNA	25
5. ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA	25
6. MANIPULACIONES Y MODIFICACIONES ENZIMATICAS DEL DNA	25
7. SECUENCIACION DEL DNA	26
8. EXTRACCION DE RNA	27
9. HIBRIDACION DNA-RNA MEDIANTE DOT BLOT	27
10. HIBRIDACION DNA-RNA MEDIANTE NORTHERN BLOT	28
10.1. Separación electroforética de RNAs	28
10.2. Transferencia de los RNAs a un filtro de nitrocelulosa	28
10.3. Detección específica de mRNAs por hibridación con sondas de DNA	29
10.3.1. Preparación de sondas de DNA	29
10.3.2. Hibridación específica DNA sonda-mRNAs	30
11. MAPEO DEL EXTREMO 5' DE mRNAs POR EXTENSION DEL PRIMER	30
12. MAPEO DE LOS EXTREMOS 5' Y 3' DE mRNAs POR DIGESTION CON ENDONUCLEASA S1	31
12.1. Preparación de sondas de DNA	31
12.2. Detección específica de mRNAs	32
13. ELECTROFORESIS DE ACIDOS NUCLEICOS EN GELES DE POLIACRILAMIDA	33
14. MUTAGENESIS DIRIGIDA	34
15. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD CLORANFENICOL ACETIL TRANSFERASA (CAT)	35
16. ENSAYOS DE TRANSPORTE DE CITRATO	36
17. CONSTRUCCIÓN DE LOS PLASMIDOS pFL3, pFL4 YpFL6 DERIVADOS DEL PLASMIDO LACTOCOCICO pCIT264	36

RESULTADOS	39
1. <i>CITP</i> ES EL UNICO GEN REQUERIDO PARA EL TRANSPORTE DE CITRATO EN <i>L. lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	39
2. TRANSCRIPCION DEL GEN <i>CITP</i> EN <i>L. lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	42
3. SECUENCIACION DE LA ZONA QUE PRECEDE AL GEN <i>CITP</i>	44
4. CARACTERIZACION DE LAS SEÑALES TRANSCRIPCIONALES DE <i>CITP</i> EN <i>L. lactis</i>	47
5. UTILIZACION DE LOS PROMOTORES TRANSCRIPCIONALES P1 Y P2 EN <i>L. lactis</i>	52
6. PROCESAMIENTO DEL mRNA1 EN <i>L. lactis</i>	55
7. REGULACION POST-TRANSCRIPCIONAL DE LA EXPRESION DEL GEN <i>CITP</i> POR EL PRODUCTO DEL GEN <i>CITR</i> EN <i>L. lactis</i>	59
8. EXPRESION DEL GEN <i>CITP</i> DE <i>L. lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> EN <i>E. coli</i>	68
9. INFLUENCIA DEL pH SOBRE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>CITP</i>	73
10. EL CITRATO NO ES UN EFECTOR DE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>CITP</i>	75
11. ANALISIS DE LA REGION QUE PRECEDE AL GEN <i>CITQ</i> EN EL PLASMIDO pCIT264	77
 DISCUSION	 83
- ORGANIZACION GENICA DEL OPERON <i>CITQRP</i> DE <i>L. lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	83
- INFLUENCIA DEL ELEMENTO DE INSERCIÓN DE pCIT264 EN EXPRESION DEL OPERON <i>CITQRP</i>	87
- UTILIZACION DIFERENCIAL DE PROMOTORES EN <i>L. lactis</i> Y EN <i>E. coli</i> PARA LA EXPRESION DEL OPERON <i>CITQRP</i>	90
- <i>CITP</i> ES EL UNICO GEN ESENCIAL PARA EL TRANSPORTE DE CITRATO EN <i>Lactococcus lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	93
- REGULACION POST-TRANSCRIPCIONAL DEL OPERON <i>CITQRP</i>	95
- EL CITRATO NO CONTROLA LA TRANSCRIPCION DEL GEN <i>CITP</i> , NI ESTIMULA EL TRANSPORTE DE CITRATO	100
- EL pH DEL MEDIO DE CULTIVO INFLUYE EN LA SINTESIS DE LA CITRATO PERMEASA P	101

Indice

CONCLUSIONES

104

BIBLIOGRAFIA

106

IMPORTANCIA DEL METABOLISMO DEL CITRATO EN LA INDUSTRIA LACTEA

Las bacterias ácido-lácticas implicadas en las fermentaciones alimentarias tienen una capacidad limitada para metabolizar substratos contenidos en el alimento. La principal actividad de las bacterias ácido-lácticas es metabolizar los azúcares presentes en los alimentos para dar lugar al producto final, el ácido láctico. Las bacterias lácticas también son capaces de fermentar metabolitos que no son carbohidratos, tales como el citrato. Este compuesto está presente en muchos substratos utilizados en las fermentaciones alimentarias tales como las frutas, los vegetales y la leche, y también se usa como aditivo alimentario para la producción de embutidos. El citrato sólo puede ser fermentado por un número limitado de bacterias lácticas dando lugar a la formación de productos inusuales tales como el diacetilo, acetofina, butanediol y acetaldehído.

La producción del compuesto aromático diacetilo por los microorganismos que integran los cultivos iniciadores influye de una manera determinante en las cualidades organolépticas del producto fermentado. Dicho efecto es beneficioso en la obtención de productos lácteos tales como la mantequilla, la nata, el requesón y varios tipos de quesos frescos. Sin embargo, el diacetilo provoca un detrimento en la calidad de productos fermentados tales como la cerveza y el vino.

Además de la formación de compuestos aromáticos como el diacetilo, durante el metabolismo del citrato también se produce dióxido de carbono. La liberación de este compuesto volátil juega un papel fundamental durante la producción de determinados quesos semiduros, ya que es responsable de la formación de los "ojos" que dan lugar a la textura típica de dichos quesos.

Por las razones que se acaban de exponer existe la necesidad de controlar la producción de diacetilo en la industria alimentaria en general. Este objetivo se alcanzará cuando se posea un amplio conocimiento de los mecanismos utilizados por las bacterias lácticas para fermentar el citrato y que conducen a la formación de diacetilo.

ESTUDIOS SOBRE EL METABOLISMO DEL CITRATO EN LAS FERMENTACIONES LACTICAS

La mayoría del conocimiento existente sobre las rutas metabólicas implicadas en la utilización del citrato ha sido obtenido del estudio de las bacterias lácticas. Las productoras de aroma, que pertenecen al género *Leuconostoc* o al género *Streptococcus* y poseen la capacidad de utilizar el citrato como fuente de carbono (Mizuno y Jezeski, 1959).

Las investigaciones sobre el metabolismo del citrato se iniciaron hace aproximadamente 50 años cuando Matuzewski y cols. (1936), describieron un microorganismo, al que denominaron *S. diacetylactis*. Este microorganismo producía dióxido de carbono y diacetilo, característica que le diferenciaba de *Streptococcus lactis*, previamente descrito por Orla-Jensen (1926). Posteriormente, van Beynum y Pette (1939) describieron una estirpe de estreptococo que poseía la capacidad de fermentar el ácido cítrico, motivo por el cual lo denominaron *S. citrophilus*. Swartling (1951) examinó las características bioquímicas y de crecimiento de estreptococos, con capacidad para fermentar el ácido cítrico, aislados de cultivos iniciadores o "starters" en Suecia. Este autor comparó estas bacterias con otros estreptococos previamente denominados *S. diacetylactis*, *S. diacetyl aromaticus*, *S. aromaticus* y *S. citrophilus*, llegando a la conclusión de que se trataba de un mismo microorganismo.

Desde entonces el microorganismo se clasificó como *S. diacetylactis* y posteriormente se reclasificó como una subespecie de *S. lactis* denominándose *S. lactis ssp. diacetylactis*. En la actualidad este microorganismo ha sido nuevamente reclasificado como parte de la especie *Lactococcus lactis*, siendo su nombre completo *Lactococcus lactis ssp. lactis* biovar *diacetylactis*. Esta cepa será referida como *L. lactis* biovar *diacetylactis* en el resto de este texto por simplicidad.

Harvey y Collins (1962) demostraron que *L. lactis* es incapaz de transportar citrato por carecer de la capacidad para transportar dicho compuesto al citoplasma celular y por no poseer actividad citritasa (el primer enzima de la ruta metabólica del citrato), ambas actividades están presentes en *L. lactis* biovar *diacetylactis*.

La estabilidad de la capacidad para fermentar citrato que posee *L. lactis* biovar *diacetylactis* ha sido objeto de varios estudios. Swartling (1950), observó que nueve de perdían la capacidad de fermentar citrato por subcultivo en el transcurso del estudio.

Asimismo, Zieiluska y Hiscox (1954) describieron que la capacidad para fermentar citrato en estreptococos aislados de quesos tipo Cheddar puede adquirirse o perderse por subcultivo constante. Harvey y Collins (1962) estudiaron 5 cepas de *L. lactis* biovar *diacetylactis* mutantes incapaces de formar acetoina y CO₂ a partir de citrato. Estos autores mostraron que estas cepas no son capaces de transportar citrato al interior de la célula pero retienen la actividad citritasa. Posteriormente, Kempler y Mckay (1979) mostraron que la capacidad para transportar citrato en *L. lactis* estaba asociada a la presencia de un plásmido Cit⁺. En consecuencia sugirieron que la pérdida de este plásmido por la bacteria conduciría a su incapacidad para incorporar citrato, y por tanto sería la base molecular de la inestabilidad del proceso de utilización de citrato observada por varios autores.

Por otra parte, Starrenburg y cols. (1991) han propuesto que la pérdida aparente de la capacidad para utilizar citrato es debida a condiciones ambientales desfavorables mas que a alteraciones en el genotipo. Sin embargo, Smith y cols. (1992) han señalado recientemente, y contrariamente a la opinión general, que la capacidad para utilizar citrato es muy estable, ya que el plásmido que codifica para la citrato permeasa es estable después de dos semanas de cultivo continuo en ausencia de citrato, siendo capaz de conferir la capacidad para transportar citrato después de dicho tiempo.

Una gran parte del conocimiento actual sobre el metabolismo del citrato se debe a las investigaciones realizadas por Collins y cols. (Kempler y Mckay, 1981) en el sistema de *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis*. Actualmente se acepta que la conversión de citrato en las bacterias lácticas que utilizan este compuesto sigue la ruta metabólica representada en la Fig. 1.

La primera proteína implicada en la utilización del citrato es la citrato permeasa. Esta proteína transporta el citrato desde el exterior al citoplasma celular y su presencia es esencial, ya que su ausencia impide el metabolismo del citrato aunque esten presentes el resto de proteínas implicadas en esta ruta metabólica. Los conocimientos actuales sobre este tipo de proteína transportadora aparecen recogidos mas adelante en otro apartado de la introducción.

Una vez dentro de la célula el citrato es convertido a oxalacetato y acetato por el enzima citrato liasa, previamente denominada citritasa (Fig. 1). Este enzima sólo se encuentra en estirpes capaces de utilizar el citrato como fuente de carbono (Gasson y cols., 1987). En estirpes de *Lactococcus* y *Leuconostoc* el oxalacetato es decarboxilado a piruvato. Esta reacción es esencial para la adquisición de la textura característica en algunos quesos

semiduros, puesto que el dióxido de carbono liberado en esta reacción es el responsable de la formación de los "ojos" típicos de estos productos lácteos. Esta enzima también está presente en estirpes incapaces de utilizar el citrato, pero a mucho menor nivel que en estirpes utilizadoras (Hugenholtz, 1993). La oxalacetato decarboxilasa ha sido purificada a partir de estirpes de *L. lactis* que utilizan el citrato (Hugenholtz, 1993) y posee una estructura similar al enzima detectado en *Salmonella typhimurium* (Rosenberger, R., 1966).

En el género *Lactobacillus* existen al menos dos mecanismos de utilización del citrato. *Lactobacillus pentosus* utiliza parte del ciclo del ácido cítrico para reducir el oxalacetato a succinato, utilizando los enzimas malato deshidrogenasa, fumarato y fumarato reductasa (Cselovszky y cols. (1992), ruta no mostrada). En *Lactobacillus plantarum* se ha detectado la conversión de citrato a succinato, acetato y formiato vía piruvato (Kennes, y cols. (1991), Lindgren y cols. (1990)).

El metabolismo del piruvato en bacterias ácido-lácticas ha sido clásicamente asociado a la producción de otros metabolitos, además del ácido láctico. Adicionalmente a la formación de acetato y dióxido de carbono en la descomposición inicial del citrato, las bacterias ácido-lácticas que utilizan este metabolito también producen los compuestos acetoina, butanediol y diacetilo como consecuencia de dicha actividad metabólica a partir del piruvato (Collins, 1972). Sin embargo, la secuencia exacta de reacciones que desembocan en la producción de estos metabolitos a partir del piruvato ha sido materia de debate. Recientemente se ha demostrado, mediante resonancia magnética nuclear, que la producción de estos compuestos ocurre a partir de un intermediario, el α -acetolactato, el cual se forma teniendo como precursor dos moléculas de piruvato (Verhue y Tjan, 1991; Ramos y cols., 1993). El enzima que cataliza esta reacción, la α -acetolactato sintetasa, ha sido identificada en varias bacterias ácido-lácticas (Cogan y cols., 1984; Branen y Keenan, 1972; Cogan, 1981) y purificada a partir de *L. lactis* (Snoep y cols., 1992). En esta secuencia de reacciones el α -acetolactato es posteriormente decarboxilado a acetoina por la α -acetolactato decarboxilasa (Fig. 1), que ha sido purificada de *Lactobacillus casei* (Rasmussen y cols., 1985) y de *L. lactis* (Hugenholtz, J., 1993). Los enzimas en ambos sistemas bacterianos muestran propiedades similares como lo evidencian sus masas moleculares (29kDa) y su similar inestabilidad. La acetoina puede ser excretada como producto final o bien ser reducida a butanediol por el enzima acetoina-reductasa. El compuesto aromático diacetilo se forma como un subproducto del metabolismo del citrato a partir del α -acetolactato por

decarboxilación aerobia y su formación ocurre únicamente a pH bajo y en condiciones aerobias.

La cantidad de acetoina, butanediol y diacetilo (componentes de cuatro carbonos (C4)) que se produce a partir del citrato es a menudo mucho menor que la que se podría esperar de la conversión estequiométrica del piruvato a α -acetolactato. Ello significa que otros productos tales como el acetato, el formato y el lactato se forman a partir del piruvato, hecho que se ha confirmado en *L. lactis* (Verhue y Tjan, 1991; Ramos y cols., 1993). En cultivos en serie y normalmente en presencia de un azúcar fermentable, el lactato y el acetato fueron los principales productos en la fermentación junto con los compuestos C4. En cultivos continuos y en condiciones limitantes de lactosa, el citrato era primariamente convertido en formato y acetato. Sin embargo, a un bajo pH externo y en condiciones aerobias se producían exclusivamente compuestos C4 y/o acetato extra y dióxido de carbono debido a la actividad piruvato deshidrogenasa (Hugenholtz, 1993). La variedad de productos formados a partir del piruvato en los lactococos son el resultado de las reacciones indicadas en la Fig. 1. La producción de L-lactato está catalizada por la lactato deshidrogenasa. La reacción catalizada por la piruvato formato liasa, tiene como productos formato y acetato o etanol. La producción de acetato y dióxido de carbono está catalizada por la piruvato deshidrogenasa. La cuarta está catalizada por la α -acetolactato sintetasa y genera α -acetolactato y dióxido de carbono.

Uno de los productos de estas reacciones, el α -acetolactato, es subsecuentemente convertido en diacetilo o acetoina (Fig. 1). Las bacterias lácticas que producen estos compuestos son también capaces de convertirlos en butanediol. Estudios recientes en *L. lactis* han demostrado que una proteína con dos actividades enzimáticas (denominada acetoina reductasa o butanediol deshidrogenasa) cataliza la reducción irreversible de diacetilo a acetoina y la reducción reversible de acetoina a butanediol (Crow y cols. (1990) y Gibson y cols. (1991))

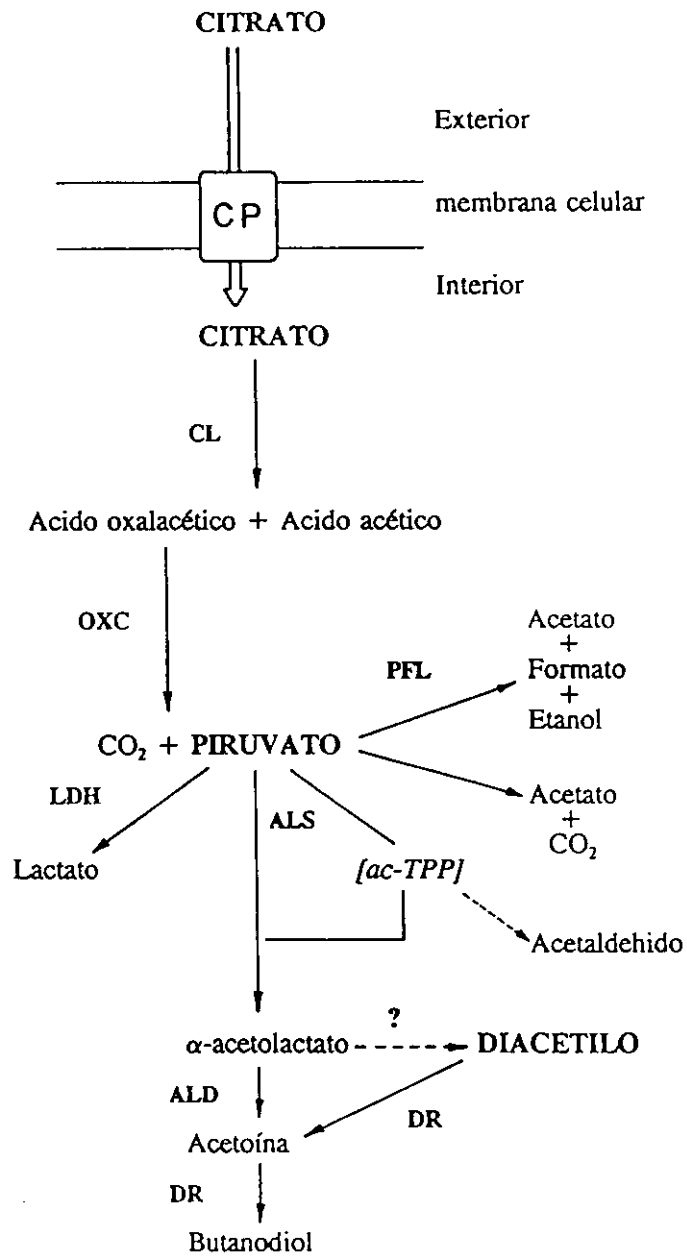


Fig. 1. Representación esquemática del metabolismo del citrato en *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis*. Abreviaturas: CP, citrato permeasa P; CL, citrato liasa; OXC, oxalacetato decarboxilasa; PFL, piruvato formato liasa; LDH, lactato deshidrogenasa; ALS, acetolactato-sintetasa; ALD, acetolactato deshidrogenasa; DR, diacetilo reductasa; ?, indica que se desconoce la enzima que cataliza esta reacción.

PLASMIDOS IMPLICADOS EN LA UTILIZACION DE CITRATO EN *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis*

La presencia de la citrato permeasa es esencial para el metabolismo del citrato en *L. lactis*, ya que en ausencia del plásmido que codifica para este enzima no se produce el metabolismo de dicho compuesto.

El plásmido natural de *L. lactis* biovar *diacetylactis* ha sido estudiado por varios autores Kempler y Mckay (1979) fueron los primeros en demostrar que la capacidad de fermentar citrato de distintas estirpes de *L. lactis* biovar *diacetylactis* estaba asociada a la presencia de un plásmido Cit⁺. Dichos autores observaron que este plásmido tenía un tamaño diferente según la estirpe estudiada, oscilando entre 6,6 y 9,1 kb. El tamaño mas frecuentemente hallado era de 8,3 kb. Posteriormente, dos grupos de investigación (Sesma y cols. 1990; David y cols., 1990) obtuvieron independientemente en *E. coli* plásmidos híbridos que contenían el plásmido lactocócico Cit⁺. La estrategia de clonación y detección de las estirpes de *E. coli* portadoras de estos plásmidos híbridos fué la misma en ambos casos. El plásmido lactocócico Cit⁺ se clonó utilizando los vectores de *E. coli* pBR328 (David y cols., 1990) y pUC19 (Sesma y cols.), a partir de preparaciones totales de plásmidos procedentes de las estirpes industriales de *L. lactis* biovar *diacetylactis* CT176 (David y cols. 1990) y CRL264 (Sesma y cols., 1990 (las estirpes de esta bacteria contienen al menos seis plásmidos distintos). La mayoría de las estirpes de *E. coli* son naturalmente incapaces de utilizar citrato debido a la carencia de la citrato permeasa. Así, la obtención de las estirpes de *E. coli* portadoras de los plásmidos recombinantes, que contenían los plásmidos lactocócicos Cit⁺, se realizo en ambos casos por selección para utilización de citrato como fuente de carbono. El análisis mediante mapeo con enzimas de restricción de los plásmidos híbridos permitió a los dos grupos de investigación inferir el tamaño aproximado de los plásmidos lactocócicos parentales clonados. De esta manera, el plásmido natural Cit⁺ detectado por David y cols. (1990), al que denominaron pCT176, posee un tamaño de 7,9 kb, mientras que el plásmido estudiado por Sesma y cols. (1990) denominado pCIT264, posee un tamaño de 8,3 kb, que coincide con el encontrado con mayor frecuencia por Kempler y Mckay entre estirpes de *L. lactis* biovar *diacetylactis*. El plásmido pCIT264 es el plásmido Cit⁺, que ha sido analizado durante el desarrollo de esta tesis. Asimismo, David y cols. (1990) identificaron y determinaron la secuencia de nucleótidos del gen *citP*, que codifica

para la citrato permeasa P, responsable del transporte de citrato.

Por otra parte, Jahns y cols. (1991), han identificado en *L. lactis* el plásmido Cit⁺, procedente de la estirpe de *L. lactis* biovar *diacetylactis* bu2. Este plásmido denominado pSL2 tiene un tamaño de 7,8 kb que es prácticamente idéntico en tamaño a pCT176. Estos autores deleccionando regiones del plásmido fueron capaces de delimitar su replicón en un fragmento *ClaI-PvuI* de 1,4 kb, situado detrás del gen *citP*. La determinación y análisis de la secuencia de nucleótidos de este fragmento de dna mostró la existencia un marco de lectura abierta con capacidad para codificar un polipéptido de 361 aminoácidos. Los autores postularon, que la proteína de replicación del plásmido podría ser este polipéptido de 361, aunque no mostraba homología con ninguna de las proteínas de replicación plasmídicas contenidas en aquel momento en el banco de datos EMBL-SWISSPROT. Posteriormente, Pedersen y cols. (1994) han determinado la secuencia de nucleótidos de la región de replicación del plásmido Cit⁺ (denominado por ellos pCT1138) procedente de la estirpe **DB1138** de *L. lactis* biovar *diacetylactis*. El análisis de esta secuencia mostró la presencia de una región altamente homóloga al origen de replicación de una familia de plásmidos que replica por un mecanismo de tipo theta y cuyo prototipo es el plásmido pWV02 ((Kiewiet y cols., 1993). En esta región están incluidos 3 iterones de 22 pb, que podrían ser el origen del plásmido, ya que la alteración de la distancia entre ellos provocó la pérdida de la capacidad de replicación del plásmido (Pedersen y cols., 1994). Asimismo, los autores han observado que las proteínas iniciadoras de la replicación de los plásmidos de la familia de pWV02, denominadas RepB, son homologas a un marco de lectura abierta compuesto por 385 aminoácidos e incluido en el replicón mínimo de pCT1138. Finalmente, Pedersen y cols. (1994) mediante experimentos de complementación en *trans* han demostrado que la proteína RepB es la proteína de replicación de pCT1138.

Aunque los cuatro plásmidos Cit⁺ analizados hasta este momento (pCIT264, pCT176, pSL2, pCT1138) son básicamente el mismo plásmido, no son idénticos. Durante el desarrollo de esta tesis hemos comprobado mediante secuenciación de DNA de regiones del plásmido pCIT264, que el gen *citP* contenido en él es igual al de pCT176 (David y cols., 1990) y que al menos parte de la región de replicación de pSL2 (Jahns y cols., 1991) es idéntica a la de pCIT264 (esta tesis, datos no mostrados). Así, la diferencia de tamaño que existe entre el plásmido pCIT264 (de 8,3 kb) y los plásmidos pCT176 Y pLS2 (de 7,9 kb) estriba en la diferencia de tamaños que existe entre el fragmento *EcoRV-BglIII* localizado delante del gen

citP de ambos plásmidos, siendo de 0,915 kb en pCIT264 (esta tesis) y de 0,5 kb en pCT176 y pSL2. Abundando en las diferencias existentes entre los plásmidos Cit⁺ estudiados hasta el momento, la comparación de la secuencia de nucleótidos de la región de replicación de los plásmidos pCT1138 Y pSL2 realizada por Pedersen y cols., (1994) ha mostrado diferencias significativas con la región de replicación del plásmido pSL2. Una de las diferencias afecta a la estructura del origen putativo de replicación y consiste en que de los tres iterones que posee pCT1138 sólo dos de ellos están presentes en pSL2. La otra diferencia estriba en el tamaño de la proteína potencial codificada por *repB*, que sería de mayor tamaño en pCT1138, que en pSL2.

LA CITRATO PERMEASA P DE *L. lactis* biovar *diacetylactis*

La citrato permeasa de *L. lactis* biovar *diacetylactis*, CitP, ha sido expresada en *E. coli* por dos grupos de investigación (David y cols., 1990; Sesma y cols., 1990). El gen que codifica para CitP ha sido secuenciado (David y cols., 1990) a partir del plásmido recombinante pNZ67ΔE que contiene el plásmido natural pCT176 y que capacita a *L. lactis* biovar *diacetylactis* para el transporte de citrato. Aunque el peso molecular de la citrato permeasa P putativa, calculado a partir de la secuencia de nucleótidos, era de 46,6 kDa, la movilidad del producto del gen *citP* en geles de poliacrilamida-SDS era de sólo 32 kDa (David y cols, 1990, Sesma y cols., 1990). Sin embargo, esta migración aberrante está bien documentada para cierta variedad de proteínas hidrofóbicas (Buchel y cols., 1980).

Hasta el momento se ha demostrado que la dependencia del pH en la utilización de citrato es debida a la actividad de la citrato permeasa P (Starrenburg y Hugenholtz, 1991), enzima que posee un rango óptimo de funcionamiento entre valores de pH de 5,5 y 6,0 (Harvey y Collins, 1961; Starrenburg y Hugenholtz, 1991). Sin embargo, se desconoce el mecanismo mediante el cual se produce un incremento en la actividad de la citrato permeasa cuando el pH está comprendido entre dichos valores.

Existen datos contradictorios respecto a la inducibilidad del transporte de citrato por el propio metabolito. Harvey y Collins (1961) comunicaron que la inducción del citrato añadiendo el metabolito a bajas concentraciones seguía una relación lineal. Sin embargo, Smith y cols. (1992) comunicaron que la utilización de citrato era independiente de la presencia de citrato puesto que esta capacidad se mantenía después de dos semanas de cultivo

continuo en ausencia del metabolito. Starrenburg y Hugenholtz (1991) observaron que la presencia del citrato en el medio a bajas concentraciones provocaba un ligero estímulo en su utilización incrementando la producción celular.

SISTEMAS DE TRANSPORTE DE CITRATO DE LAS ENTEROBACTERIAS

Un amplio espectro de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* son también capaces de fermentar el citrato. Sin embargo, estas bacterias son capaces de utilizar este metabolito como única fuente de carbono y de energía mientras que *L. lactis* normalmente requiere la presencia de una fuente adicional de carbono, como la glucosa o la lactosa, para su crecimiento. *L. lactis* solamente puede crecer en citrato como única fuente de energía en condiciones muy estrictas (Starrenburg y Hugenholtz, 1991). *E. coli* no crece normalmente en citrato debido a que carece de un sistema de transporte de citrato. Sin embargo, aislados infrecuentes de este microorganismo son capaces de utilizar el citrato debido a que poseen sistemas de transporte de citrato codificados por plásmidos de resistencia a antibióticos (Sasatsu y cols., 1985; Ishiguro y Sato, 1985) o transposones (Ishiguro y cols., 1982; Ishiguro y cols., 1988). Asimismo, se han detectado genes virtualmente idénticos a *citA* en *Citrobacter amalonaticus* (Daimon y cols., 1989), en *Salmonella typhimurium* (Shimamoto y cols., 1991) el cual también está presente en el cromosoma de *Salmonella* serovars (Hirato y cols., 1986). Los sistemas de transporte de citrato codificados por *E. coli* (plásmido y transposón) han sido estudiados detalladamente y se ha encontrado que el gen *citA*, que codifica para la proteína transportadora de citrato, se encuentra integrando un operón con el gen *citB*. Las secuencias de ambos genes son prácticamente idénticas (98 % de identidad en pb) independientemente de donde procedan (plásmido, o transposón). El gen *citB* precede a *citA* en dicho operón encontrándose cada gen bajo el control de su propio promotor (Ishiguro y cols., 1988). Sin embargo, existen resultados contradictorios respecto a si *citB* es o no esencial para la utilización de citrato en *E. coli* (Ishiguro y cols., 1988; Sasatsu y cols., 1985). Asimismo, en *Salmonella typhimurium* se han descrito tres sistemas diferentes de transporte de citrato, TctI, TctII y TctIII, que son dependientes de sodio (Widenhorn y cols., 1988, 1989). Un nuevo gen que codifica para un transportador de citrato en *Salmonella* serovars ha sido secuenciado. Este gen denominado *citC* difiere en su estructura de los otros genes para transporte de citrato conocidos (Ishiguro y cols., 1992).

En *Klebsiella pneumoniae* se han encontrado tres sistemas diferentes de transporte de citrato (Schwarz y Oesterhelt, 1985). Cada uno de estos tres sistemas ha sido clonado en su huésped original dando lugar a tres plásmidos recombinantes diferentes llamados respectivamente pES1, pES2 y pES3. El plásmido pES1 codifica para un sistema constitutivo que ha sido bien estudiado. El gen *citH* codifica para la citrato permeasa H en este sistema, la cual pertenece a una clase de proteínas transportadoras que tienen doce segmentos transmembranares y una parte hidrofílica central. El plásmido pES2 codifica para un sistema inducible de transporte de citrato (van der Rest y cols., 1992). El plásmido pES3 codifica para un sistema de transporte de citrato que es probablemente inducido en condiciones anaerobias y con citrato como fuente de energía. Este sistema de transporte de citrato es dependiente de sodio (Dimroth y Thomer, 1986, 1990). El gen que codifica para el transportador de citrato de este sistema ha sido clonado y secuenciado (van der Rest y cols., 1992). Un estudio estructural de esta proteína muestra que CitS consta de 12 α -hélices con una gran región hidrofílica que está asimétricamente distribuida (van der Rest y cols., 1992).

van der Rest y cols. (1992) han comparado las secuencias de aminoácidos de cuatro transportadores de citrato de origen bacteriano (Fig. 2). CitH y CitS de *K. pneumoniae* son proteínas relacionadas con un 57 % de similaridad, mientras que CitH de *K. pneumoniae* y CitA tienen un 89 % de similaridad. La similaridad de CitS de *K. pneumoniae* y CitP de *L. lactis* biovar *diacetylactis* es del 76 %. Todos estos datos indican que estas proteínas transportadoras de citrato probablemente han evolucionado de un gen ancestral común. La similaridad entre CitS de *K. pneumoniae* y CitP de *L. lactis* biovar *diacetylactis* sugiere que CitP puede tener los mismos requerimientos iónicos para la translocación de citrato. Sin embargo, van der Rest y cols. (1992) han sugerido que CitP de *L. lactis* biovar *diacetylactis* no requiere sodio para la translocación de citrato. En cuanto a la estructura de estos transportadores de citrato el algoritmo de Eisenberg y cols. (1984) predijo doce α -hélices hidrofóbicas transmembranares separadas por dominios hidrofílicos. Sin embargo, los perfiles hidropáticos de CitS y CitP de *L. lactis* biovar *diacetylactis* (Fig. 3) son diferentes a los esperados para la familia propuesta por Baldwin y Henderson (1989), dentro de la cual se pueden incluir CitA y CitH que tienen seis hélices en cada cara de un lazo hidrofílico central. Tanto CitS como CitP son proteínas asimétricas con siete hélices precediendo y cinco hélices después del lazo hidrofílico central (van der Rest y cols., 1992). CitC de *Salmonella* serovars constituye una excepción ya que no muestra ninguna homología a los demás genes estudiados.

El perfil hidropático de la proteína muestra de 11 a 12 segmentos hidrofóbicos con dos segmentos hidrofílicos centrales (Ishiguro y cols., 1992).

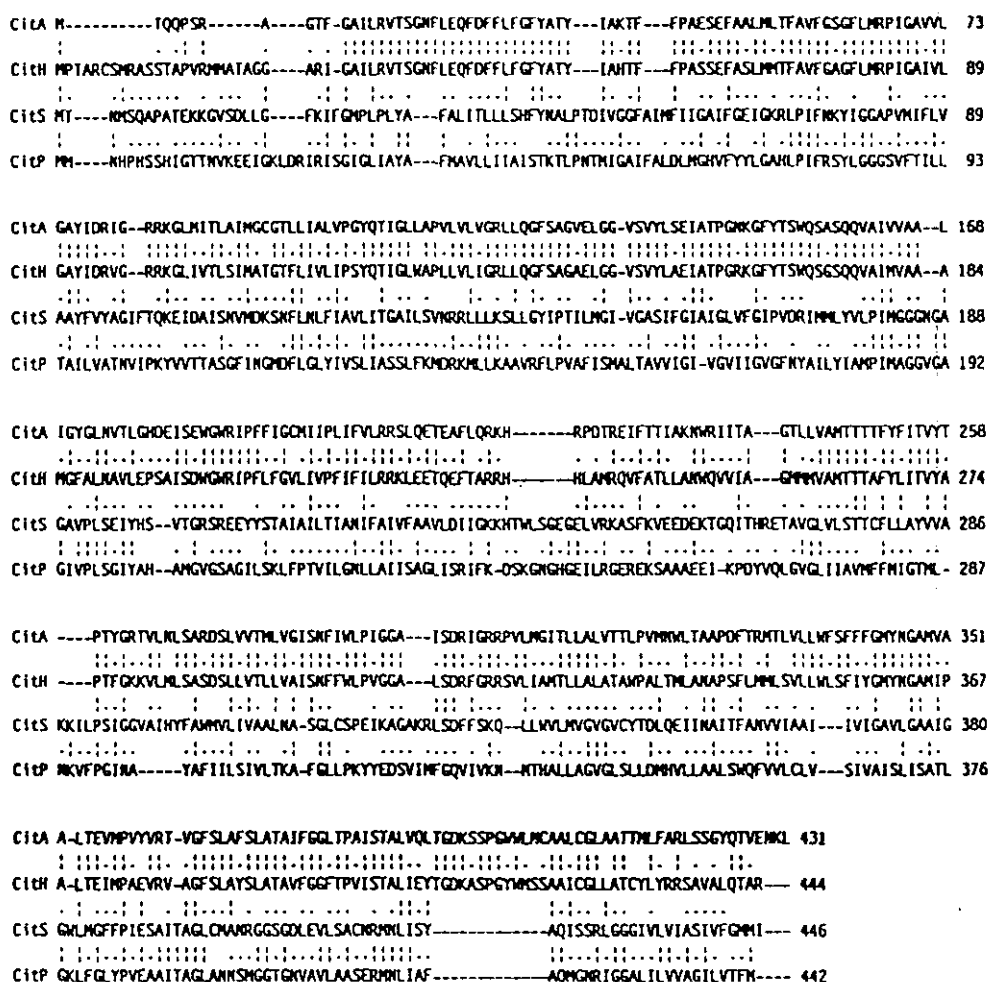


Fig. 2. Comparación de las proteínas transportadoras de citrato con el método de Higgins y Sharp (1988). CitA, transportador de citrato de *E. coli*; CitH, transportador de citrato dependiente de protones de *K. pneumoniae*; CitS, transportador de citrato dependiente de sodio de *K. pneumoniae*; CitP, transportador de citrato de *L. lactis* (Reproducido de van der Rest y cols., 1992)

Este proyecto de tesis doctoral pretendía llevar a cabo la caracterización molecular del sistema de transporte de citrato de *L. lactis* biovar *diacetylactis*.

En el momento de la iniciación de este trabajo experimental se conocía que la citrato permeasa P, codificada por el gen *citP* del plasmido lactocócico pCIT264, está implicada en el transporte de citrato. Sin embargo, se desconocían las características de la expresión del gen *citP* y si otros polipeptidos codificados por pCIT264 eran requeridos para dicho proceso.

Por ello en una primera fase se abordaron los siguientes objetivos:

- * Identificación de las regiones mínimas de pCIT264 requeridas para el transporte de citrato en *L. lactis*
- * Determinación de la secuencia de nucleótidos de la región que precede al gen *citP*

En una segunda etapa se planteó la caracterización de la transcripción del gen *citP* para lo cual se fijaron los siguientes objetivos:

- * Identificación de los mRNAs transcritos específicos de *citP* en *L. lactis* y *E. coli*
- * Determinación de los sitios de iniciación y terminación de los transcritos específicos de *citP* en *L. lactis* y *E. coli*

Finalmente, se planteó el estudio de la regulación de la expresión del gen *citP* a nivel transcripcional y post-transcripcional en *L. lactis* con los siguientes objetivos:

- * Estimación de la influencia del pH, fase de crecimiento bacteriano o el citrato sobre la expresión del gen *citP*.
- * Análisis del destino del mRNA específico del gen *citP*.
- * Caracterización de la regulación de la expresión de *citP* por *citR*

1. MATERIAL BIOLÓGICO

1.1 Estirpes bacterianas

Las estirpes bacterianas de *E. coli*, *S. pneumoniae*, *B. subtilis* y *L. lactis* empleadas en este estudio, así como sus características más relevantes, se describen en la Tabla I.

TABLA I

Estirpe	Características	Origen
<i>L. lactis subsp. lactis</i> biovar diacetyllactis		
CRL264	Lac ⁺ , Pro ⁺ , Cit ⁺	F.Sesma
CRL30	Estirpe derivada de CRL264, Cit ⁺ , obtenida por curado del plásmido pCIT264	F.Sesma
<i>L. lactis subsp. lactis</i>		
MG1363	Estirpe derivada de <i>L. lactis</i> 712 Lac ⁻ , Rec ⁺ carente de plásmidos	M.Gasson
<i>E. coli</i>		
JM109	<i>recA1</i> , <i>supE44</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	M.Espinosa
MC1061	<i>hsdR</i> , <i>mcrB</i> , Δ <i>lacX74</i> , <i>galU</i> , <i>galK</i> <i>rpsL</i> , <i>thi</i> , <i>araD</i> 139 Δ (<i>araABC-leu</i>)	T.A. Kunkel
BMH 71-18 mutS	<i>thi</i> , <i>supE</i> , (<i>lac-proAB</i>), (<i>mutS</i> :: Tn10)(F', <i>proA</i> ⁺ B ⁺ , <i>laqI</i> ZM15)	Promega
<i>B. subtilis</i>		
MB11	<i>Lys3</i> , <i>metB10</i> , <i>hisH2</i>	M.Espinosa
<i>S. pneumoniae</i>		
708	<i>trt1</i> , <i>hex4</i> , <i>end1</i> , <i>exo2</i> , <i>mal594</i>	S.A.Lacks

1.2. Bacteriófagos

Se utilizó la forma replicativa del DNA del bacteriofago M13mp18 (Biolabs) como vector de clonación como se indica en el apartado 9 del capítulo de Métodos.

El bacteriofago R408 (Promega) fué utilizado como fago "ayudador" en los experimentos de mutagénesis dirigida tal y como se indica en el apartado 14 del capítulo de Métodos.

El bacteriófago FM1 es un derivado de M13mp18 obtenido en este trabajo. Su DNA contiene el fragmento *Bam*HI-*Bgl*III del plásmido pCIT264 clonado en el sitio *Bam*HI. El DNA monocatenario circular de FM1 se utilizó para la preparación de sonda para la hibridación específica DNA-RNA (Northern blot).

1.3 Plásmidos

Los plásmidos utilizados en este estudio, así como sus características más relevantes, se muestran en la Tabla II.

TABLA II.

Plásmidos	Características	Referencia
pCIT264	Plásmido natural Cit ⁺ de <i>L. lactis</i> biovar diacetylactis	F. Sesma
pUC18	Vector de clonación de <i>E. coli</i>	Biolabs
pFS21	Híbrido entre pCIT264 y pUC18	F. Sesma
pFU1	Derivado de pFS21 con <i>citP</i> bajo el control de P _{polA}	(*)
pFU4	Fragmento <i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RI de pFS21 clonado entre los sitios <i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RI de pUC18	(*)
pFU5	Fragmento <i>Eco</i> RI- <i>Bgl</i> III de pFS21 clonado entre los sitios <i>Eco</i> RI- <i>Bgl</i> III de pUC18	(*)
pFU7	Delección del fragmento <i>Eco</i> RV- <i>Hind</i> III en pFU5	(*)
pFU8	Fragmento <i>Eco</i> RV- <i>Eco</i> RV de pFS21 clonado en el sitio <i>Sma</i> I de pUC18	(*)
pFU9	Delección del fragmento <i>Eco</i> RV- <i>Eco</i> RV en pFS21	(*)
pLS1	Vector de amplio rango de huésped	M. Espinosa

pFL1	Fragmento que contiene <i>citP</i> bajo control de <i>P_{polA}</i> clonado en el sitio <i>EcoRI</i> de pLS1	(*)
pFL3	Delección del fragmento <i>BglII-BglII (cat)</i> en pFL1	(*)
pFL4	Fragmento <i>EcoRI-ClaI</i> de pCIT264 clonado en el sitio <i>EcoRI</i> de pLS1	(*)
pFL5	pFL4 con una mutación insercional en el sitio <i>BglII</i>	(*)
pFL6	Delección del fragmento <i>BglII-BspEI (P_{polA})</i> en pFL3	(*)
pFL7	Delección del fragmento <i>EcoRV-EcoRV (P1)</i> en pFL4	(*)
pFL10	Vector para fusiones traduccionales a <i>cat</i>	(*)
pFL12	Derivado de pFL10, que contiene <i>cat</i> bajo las señales transcripcionales y traducionales de <i>citP</i>	(*)
pFL13	pFL12 con una mutación insercional en el sitio <i>BglII (citR)</i>	(*)
pFL16	fusión <i>citP-cat</i> bajo el control del promotor <i>P_{catL}</i>	(*)
pFL17	fusión <i>citP-cat</i> bajo el control del promotor P2	(*)
pALTER-1	Vector de <i>E. coli</i> para mutagénesis dirigida	Promega
pFAL1	Fragmento <i>EcoRI-ClaI</i> de pFS21 clonado en el sitio <i>SmaI</i> de pALTER-1	(*)
pFAL4	pFAL1 con sitio <i>EcoRI</i> en el "start" codon de <i>citP</i>	(*)
pFAL6	Fragmento <i>BglII-BglII (cat)</i> de pSM29 clonado en el sitio <i>BamHI</i> de pALTER-1	(*)
pFAL7	pFL6 con fragmento <i>BglII-BglII (cat)</i> de pSM29 reorientado	(*)
pSM29	Contiene <i>cat</i> de pC194 y <i>P_{polA}</i> de <i>S. pneumoniae</i> orientados en sentido divergente	S.Martinez
pSM41	Contiene <i>P_{polA}</i> de <i>S. pneumoniae</i>	A.Diaz
pJS3	Contiene <i>cat</i> de pC194 bajo el control de <i>P_{cat}</i>	
pET11d	Vector de <i>E.coli</i> para hiperexpresión de proteínas	AMS
pCM6	Gen <i>citR</i> , obtenido por PCR, clonado en pET11d bajo el control de <i>P_{o10}</i>	(*)
pCM7	Fragmento <i>BglII-NheI (P_{polA})</i> de pSM41 clonado en el sitio <i>XbaI</i> de pCM6	(*)
pIL253	Vector de clonación de bacterias gram positivas de alto n° de copias	J.C.Alonso
pFI1	Fragmento <i>EcoRV-BglII</i> de pCIT264 clonado en el sitio <i>SmaI</i> de pIL253	(*)
pFI20	Fragmento <i>EcoRV-EcoRV</i> de pCM7 clonado en el sitio <i>BamHI</i> de pIL253	(*)

(*) Estos plásmidos han sido construidos en el transcurso de esta Tesis. pFU, pFL, pFI, pFAL son plásmidos recombinantes de los vectores pUC18, pLS1, pIL253 y pALTER-1, respectivamente.

2. MEDIOS DE CULTIVO

2.1. Medios de cultivo para *E. coli*

Para soportar el crecimiento de *E. coli* se utilizó rutinariamente el medio LB (Sambrook y cols., 1989).

Para poner células de *E. coli* en estado de competencia se utilizó el medio SOB (Sambrook y cols., 1989).

Cuando se hizo necesaria la selección de marcadores plasmídicos se utilizaron diferentes antibióticos a las siguientes concentraciones finales: Tc ($10\mu\text{g ml}^{-1}$), Cm ($20\mu\text{g ml}^{-1}$) y Ap ($50\mu\text{g ml}^{-1}$).

En los casos en los que se hizo necesario comprobar si los plásmidos objeto de estudio conferían la capacidad de utilización de citrato a *E. coli* se empleó el medio de Christensen (Christensen, W., 1949). Para comprobar si las estirpes de *E. coli* portadoras de plasmidos eran capaces de crecer usando el citrato como única fuente de carbono, se utilizó el medio agar citrato de Simmons (Simmons, J., 1926).

2.2 Medio de cultivo de *S. pneumoniae*

Para el crecimiento rutinario de *S. pneumoniae* se utilizó el medio de cultivo AGCH (Lacks, S., 1966) suplementado, en el momento de inocular, con una concentración final de sacarosa de 0.3% y con extracto de levadura a una concentración final del 0.2% (AGCHSE).

Para el crecimiento en placa de *S. pneumoniae*, se mezclaron las células con una capa basal de AGCHSE suplementada con agar al 1%. La capa basal se cubrió con una capa superficial del mismo medio con agar al 0.75%.

Cuando se hizo necesaria la selección de marcadores plasmídicos se utilizaron antibióticos a las siguientes concentraciones finales: Tc ($1\mu\text{g ml}^{-1}$), Cm ($5\mu\text{g ml}^{-1}$), Em ($5\mu\text{g ml}^{-1}$).

2.3 Medio de cultivo de *B. subtilis*

El medio de cultivo que se utilizó para el crecimiento rutinario de *B. subtilis* fué el

medio TY (Maniatis y cols., 1982).

En la preparación, y posterior transformación, de células de *B. subtilis* en estado de competencia, se utilizaron los medios GM1 y GM2 formulados por Young y Wilson (1974).

Cuando se hizo necesaria la selección de marcadores plasmídicos se utilizaron antibióticos a las siguientes concentraciones finales: Cm ($5\mu\text{g ml}^{-1}$) y Em ($5\mu\text{g ml}^{-1}$).

2.4 Medio de cultivo de *L. lactis*

Para el crecimiento rutinario de *L. lactis* se utilizó el medio M17 (Terzaghi, B. y Sandine, W., 1975).

Para el crecimiento de *L. lactis* después de su electroporación, se utilizó el medio M17 suplementado con sacarosa al 1%. Antes de electroporar células de *L. lactis* estas se crecieron en medio M17 suplementado con treonina 40 mM.

Para comprobar la capacidad de utilización de citrato por *L. lactis* se utilizó el medio formulado por Kempler y McKay (1980).

Cuando se hizo necesaria la selección de marcadores plasmídicos se utilizaron antibióticos a las siguientes concentraciones finales: Tc ($1\mu\text{g ml}^{-1}$), Cm ($5\mu\text{g ml}^{-1}$), Em ($5\mu\text{g ml}^{-1}$).

3. PROTEINAS Y ENZIMAS

Se han usado como proteínas polimerizantes y modificantes de los ácidos nucleicos las que a continuación se relacionan: DNA polimerasa del fago T7 (Pharmacia), fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* (Biolabs), fragmento carboxylo-terminal de la DNA polimerasa I de *S. pneumoniae* (purificada por A. Díaz), fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Boehringer), DNA ligasa del fago T4 (Boehringer), *Taq* DNA polimerasa (Biolabs), transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis aviar (Promega), polinucleótidoquinasa del fago T4 (Biolabs), enzimas de restricción (Biolabs, Pharmacia) y nucleasa S1 (Biolabs).

Otras proteínas utilizadas fueron: RNAsa A, inhibidor de RNAsas, lisozima, seroalbumina bovina y proteinasa K (Sigma).

4. KITS COMERCIALES

Se han utilizado varios "kits" comerciales para llevar a cabo diferentes técnicas. Para la extracción y purificación de DNA a partir de geles de agarosa se utilizó el "Gene Clean" (BIO 101 Inc.); para la determinación de secuencias de DNA se utilizó el "kit de secuenciación de la polimerasa del bacteriófago T7" (Pharmacia); para llevar a cabo la mutagénesis dirigida de DNA se utilizó el "Sistema de mutagénesis *in vitro*" (Promega); la determinación de la concentración de proteínas en extractos crudos se realizó con el "Sistema de ensayo de proteínas BCA" (Pierce).

5. OTROS MATERIALES Y PRODUCTOS

Otros materiales y productos utilizados fueron: membranas de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell), papel 3MM (Whatman), material radiactivo (Amersham), material fotográfico (Kodak), antibióticos (Sigma), componentes de medios de cultivo y de tampones (Probus, Merck, Difco), agarosa (Pronadisa), acrilamida, bis-acrilamida (Biorad) membranas de filtración y dialisis (Millipore), cloroformo, etanol, isopropanol, fenol (Merck).

1. CRECIMIENTO Y METODOS DE TRANSFORMACION DE ESTIRPES BACTERIANAS

Las estirpes de *E. coli* y *B. subtilis* fueron incubadas, tanto en medio sólido como en medio líquido, a una temperatura de 37°C. Para su crecimiento en medio líquido, las células se sometieron a una agitación vigorosa con el fin de conseguir condiciones aerobias necesarias para su crecimiento.

Las estirpes de *L. lactis* y *S. pneumoniae* fueron incubadas, tanto en medio sólido como en medio líquido, a una temperatura de 30°C y 37°C respectivamente. Para el crecimiento en medio líquido, tanto *L. lactis* como *S. pneumoniae*, se incubaron sin agitación en baños termostatzados con el fin de conseguir las condiciones microaerófilas necesarias para su crecimiento.

Para el crecimiento en placa, las células de *S. pneumoniae* se mezclaron con una capa basal de medio, sobre la cual se añadió posteriormente una sobrecapa del mismo medio con el objeto de conseguir las condiciones microaerófilas para su crecimiento.

El crecimiento en medio líquido de las células se siguió por turbidimetría utilizando un espectrofotómetro Bausch & Lomb, modelo Spectronic 20. Las longitudes de onda a las que se midieron la absorbancia de los cultivos de *B. subtilis*, *E. coli*, *S. pneumoniae* y *L. lactis* fueron 550, 600, 650 y 660, respectivamente.

Las estirpes bacterianas utilizadas en este estudio fueron conservadas congeladas a -70°C. Antes de proceder a su congelación, los cultivos bacterianos fueron suplementados con glicerol a una concentración final del 10% e incubados 10 minutos a 37°C, excepto las estirpes de *L. lactis* que fueron incubadas a 30°C.

Para la preparación y posterior transformación de células competentes de *S. pneumoniae* se siguió el método descrito por Lacks (1966). En el caso de la preparación y posterior transformación de células competentes de *B. subtilis* MB11 se siguió el método de Young y Wilson (1974). Las células competentes de *E. coli* fueron preparadas y transformadas por el método descrito por Sambrook y cols. (1989). La selección de marcadores plasmídicos se efectuó utilizando las concentraciones de antibióticos indicadas en el apartado 2 del capítulo de Materiales. En los casos en que se seleccionó la Cm^r codificada por el gen *cat* silvestre de pC194, los últimos 20 minutos de expresión fenotípica transcurrieron en presencia de una concentración subinhibitoria del antibiótico de 0,5 µg ml⁻¹,

la cual permitió la inducción de la expresión de este gen *cat*.

Las células de *L. lactis* fueron transformadas por electroporación siguiendo el método descrito por Dornan y Collins (1987). La selección de marcadores plasmídicos se llevo a cabo utilizando las concentraciones indicadas en el apartado 2.4. del capítulo de Materiales. Cuando se hizo necesaria la inducción del gen *cat* DE PC194 silvestre para seleccionar Cm^r en *L. lactis*, se utilizaron concentraciones subinhibitorias del antibiótico de 25 ng ml⁻¹, adicionadas al cultivo transformado 20 min antes de finalizar la expresión fenotípica. La selección de transformantes Cm^r o Tc^r se chequeó, respectivamente, a las 24 o 48 hr de crecimiento.

2. EXTRACCION DE DNA

2.1. Minipreparaciones de DNA plasmídico

Para extraer DNA plasmídico a pequeña escala, a partir de cultivos bacterianos de *E. coli* y *B. subtilis*, se utilizó el método descrito por Birnboim y Doly (1979). En el caso de *S. pneumoniae* se empleó el mismo método con la modificación descrita por Stassi y cols. (1981).

La extracción de DNA plasmídico a pequeña escala, a partir de *L. lactis*, se llevó a cabo por el método descrito por Birnboim y Doly (1979), con una modificación introducida en este laboratorio, que consiste en añadir 10 mg ml⁻¹ en vez de 2 mg ml⁻¹ de lisozima a la solución de lisis.

Cuando se requirió DNA plasmídico en pequeña escala y con un grado mayor de pureza, se procedió como se indica en el apartado 4 de este capítulo.

2.2. Preparacion de extractos de DNA totales de *L. lactis*

Cuando se quiso determinar el número de copias de los plásmidos en estirpes de *L. lactis*, se procedió a la extracción de DNA cromosómico y plasmídico a partir de extractos crudos celulares, preparados según el método descrito por Saunders y GUILT (1980) con las siguientes modificaciones: se añadieron 10 mg ml⁻¹ en vez de 2 mg ml⁻¹ de lisozima a la solución de lisis; después del tratamiento con proteinasa K, se procedió a la extracción de

proteínas por tratamiento con fenol-cloroformo; finalmente, el DNA total fué precipitado con etanol absoluto y acetato sódico 0,3M y los extractos procesados según Saunders y Guilt (1980).

Estos extractos fueron utilizados para la determinación del número de copias de diferentes plásmidos en *L. lactis* siguiendo el método de Projan y cols. (1983). Dichos extractos fueron fraccionados en geles de agarosa al 0,8% y se fotografiaron. La cuantificación densitométrica del DNA presente en las muestras se efectuó a partir de los negativos con el sistema PhosporImager (Molecular Dynamics). El grupo planar del bromuro de etidio se intercala mejor en formas lineales y circulares abiertas (OC), que en formas circulares covalentemente cerradas (CCC), y por ello es necesario aplicar un factor de corrección en el cálculo del número de copias respecto al cromosoma:

$$N = \frac{(Dp_1 + 1,36 Dp_2) \times Mc}{Dc \times Mp}$$

siendo Dp_1 y Dp_2 , el valor determinado por densitometría para las bandas correspondientes a las formas OC y CCC del plásmido. Mc , el tamaño del DNA genómico de *L. lactis* estimado en $2,42 \times 10^6$ pb (Le Burgeois y cols., 1993).

2.3. Preparación de plásmidos puros

Para la preparación de plásmidos puros a gran escala a partir de *E. coli* y *S. pneumoniae* se utilizó el protocolo de Currier y Nester (1976) empleando diferentes procedimientos de lisis celular para cada tipo de microorganismo.

La lisis celular de *E. coli* se consiguió resuspendiendo el sedimento celular en 100 ml de tampón de lisis (lisozima a 2 mg ml^{-1} , sacarosa al 20%, EDTA 1mM y Tris-HCl 10 mM pH 8,0), incubándose 10 minutos a 37°C . Después se añadieron 80 ml de EDTA 0,25 M, y la mezcla se mantuvo en hielo durante 10 minutos. Una lisis clara se consiguió por adicción de 100 ml de una solución de SDS al 15% en TE (10:1), e incubación a 37°C durante 10 minutos.

La lisis celular de *S. pneumoniae* se consiguió resuspendiendo el sedimento celular en 12 ml de EDTA 0,25 M, añadiéndose a continuación 40 ml de una solución de lisis (sacarosa al 25%, citrato trisódico 0,15 M, deoxicolato sodico al 0,1% y SDS al 0,01%) e incubándose la mezcla 5 minutos a 37°C. Tras la adicción de pronasa a una concentración final de 0,7 mg ml⁻¹, se prosiguió la incubación a 37°C durante otros 10 minutos], añadiéndose después 124 ml de TE (10:1) y 24 ml de SDS al 10%.

Para la obtención de plásmidos puros, a partir de *L. lactis*, la lisis celular se realizó como a continuación se indica: se resuspendió el sedimento celular en 50 ml de TE que llevaban disueltos sacarosa al 20% y lisozima a 10 mg ml⁻¹. La mezcla se incubó 5 minutos a 37°C. Posteriormente se añadieron 80 ml de EDTA 250 mM incubándose 10 minutos a 37°C, tras lo cual se añadieron 100 ml de SDS al 15% en TE (10:1) y la mezcla total se incubó 15 minutos a 37°C. El resto del proceso se desarrolló igual que para *E. coli*.

Para determinar la cantidad y el grado de pureza del DNA plasmídico extraído, se midió la absorción de las muestras en un rango de longitudes de onda entre 200 y 300 nm en un espectrofotómetro Shimadzu, modelo UV-160, teniendo en cuenta que una absorbancia de 1 a 258 nm equivale a 50 µg de DNA ml⁻¹.

3. FENOLIZACION, PRECIPITACION Y DIALISIS DEL DNA

La desproteínización de muestras de DNA se llevó a cabo por extracción con una mezcla 1:1 (v/v) de fenol y cloroformo, agitando mecánicamente durante 1 minuto y separando las fases acuosa y orgánica por centrifugación durante 5 minutos.

Los ácidos nucleicos contenidos en la fase acuosa se precipitaron añadiendo 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M (ajustado a pH 7,0 con ácido acético) y a continuación, 2,5 volúmenes de etanol absoluto. La mezcla de precipitación se mantuvo a -70°C durante un mínimo de 30 minutos, o a -20°C durante toda la noche, siendo a continuación sedimentada por centrifugación a -10°C.

Para eliminar las sales que generalmente coprecipitan con el DNA, el precipitado se lavó con etanol al 70% y posteriormente se centrifugó. El DNA sedimentado se resuspendió en tampón TE 10:1 (Tris base 10 mM pH 7,0 y EDTA 1 mM) y se dializó en filtros tipo VS (tamaño de poro 0,025 µm) frente al mismo tampón.

4. EXTRACCION Y PURIFICACION DE FRAGMENTOS DE DNA

Cuando fué necesario extraer y purificar fragmentos de DNA, obtenidos por digestion con enzimas de restricción a partir de geles de agarosa al 0,8 %, se utilizó el sistema "GeneClean" (BioInc 101). El sistema se utilizó siguiendo las recomendaciones sugeridas por sus fabricantes.

Para extraer fragmentos de DNA con tamaños muy semejantes, se varió la concentración de la agarosa y el voltaje en la electroforesis hasta la resolución de los fragmentos que interesaron dependiendo del tamaño de los fragmentos.

Cuando fué necesario extraer y purificar fragmentos de DNA a partir de geles de poliacrilamida al 5% se siguió el procedimiento de Maxam y Gilbert (1980).

5. ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA

La separación electroforética de DNA cromosómico, plasmídico y de fragmentos de DNA, se llevó a cabo en geles horizontales de agarosa, cuya concentración en agarosa varió del 0,8% al 1,2% en función del tamaño del DNA a analizar.

La agarosa fué disuelta en tampón de electroforesis TAE (Tris base 40 mM pH 8,0 y EDTA 1 mM). A las muestras se les añadió tampón de carga BXGE (glicerol al 60%, azul de bromofenol al 0,25%, xilen cianol al 0,25% y EDTA 10 mM). El gel se sumergió en la cubeta con tampón TAE.

Los geles se sometieron a una periodo y a un voltaje de electroforesis que dependieron del tamaño del DNA a analizar, así como de la distancia relativa a otros fragmentos de DNA presentes en la preparación.

El DNA se visualizó, con un transiluminador de luz ultravioleta de onda larga (360 nm), tras ser teñido durante 30 minutos, en tampón TAE conteniendo bromuro de etidio, a una concentración de $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$.

6. MANIPULACIONES Y MODIFICACIONES ENZIMATICAS DEL DNA

Todas las manipulaciones y modificaciones enzimáticas del DNA realizadas con las enzimas y proteínas descritas en el apartado 3 de Materiales, se llevaron a cabo siguiendo las

instrucciones descritas por Sambrook y cols. (1989), con excepción de las endonucleasas de restricción. En este último caso se siguieron las instrucciones descritas por los fabricantes.

7. SECUENCIACION DEL DNA

Cuando fué necesario determinar la secuencia de nucleótidos de DNA se utilizó el método de terminación de cadena de Sanger y cols. (1977). Para ello se utilizó el "kit" de secuenciación de la polimerasa del bacteriófago T7 (Pharmacia) y [α - 32 P]dCTP. Como DNA molde se emplearon plásmidos bicatenarios desnaturalizados por álcali (según el método de Chen y Seeburg, 1985), anillados a los oligonucleótidos sintéticos adecuados utilizados como "primers" para la polimerización de DNA. Estos primers fueron adquiridos a Boehringer-Mannheim (primers universales) o sintetizados en un sintetizador de oligonucleótidos (Gene Assembler, Pharmacia) en el Centro de Investigaciones Biológicas.

TABLA III. Oligonucleótidos utilizados en la secuenciación de la región precedente al gen *citP*

Oligonucleótido	Secuencia	Coordenadas (*)
O1	5'-GAAATTAGAGATGATAC-3'	234-218
O2	5'-GCCTGATTCACTGACTA-3'	540-556
O3	5'-GACCGAGGAAGTGTTGAG-3'	489-472
O4	5'-GGCGGACAAAGCGAGAA-3'	770-786
O5	5'-CCGCTTAGATTTACTTG-3'	1-18
O6	5'-CTGATACAGGTTTTAGC-3'	1210-1194
O7	5'-GATGCAACATTAACGC-3'	1289-1307

*Coordenadas de los oligonucleótidos en la secuencia de DNA mostrada en la Fig. 9.

En particular para la secuenciación de la región de 1583 nt que precede al gen *citP* se utilizaron los plásmidos pFS21, pFU5 Y pFU8 (ver Tabla II) y los oligonucleótidos: 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3' (primer universal directo), 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' (primer universal reverso) o cada uno de los relacionados en la Tabla III.

Las reacciones de secuencia obtenidas fueron analizadas en geles de poliacrilamida-urea, según describe en el apartado 14 de este capítulo, y los productos de la reacción revelados por autorradiografía utilizando película X-omat (Kodak).

8. EXTRACCION DE RNA

El RNA total fue aislado a partir de *E. coli* y *L. lactis* siguiendo el método del fenol caliente descrito por Aiba y cols. (1981), con algunas modificaciones. Se recogieron por centrifugación las células de 50 ml de un cultivo crecido hasta una absorbancia variable como se indica en el capítulo de Resultados. Las células fueron resuspendidas en 2.5 ml de una solución compuesta por acetato sódico 20 mM pH 5,5, EDTA 1 mM y lisozima a una concentración de 1 mg ml⁻¹ para *E. coli*, o 10 mg ml⁻¹ para *L. lactis*. Las células se lisaron mediante siete ciclos rápidos de congelación a -70°C y descongelación a 37°C. A continuación se añadió SDS a una concentración final de 0.5% y se mantuvo la solución 2 minutos a 37°C. Posteriormente, los extractos fueron tratados con 5 ml de fenol saturado con acetato sódico 20 mM pH 5,5 durante 5 minutos a 70°C. La fase acuosa fue tratada tres veces más con fenol y los ácidos nucleicos fueron precipitados 4 veces con acetato sódico 0,2 M pH 7 y 2,5 volúmenes de etanol. El precipitado fue resuspendido en 400 µl de TE (10:1). La determinación de la concentración de RNA en las muestras se realizó por espectrofotometría según se indica en el apartado 2.3. de este capítulo, pero teniendo en cuenta que una absorbancia de 1 a 258 nm equivale a 40 µg de RNA ml⁻¹.

9. HIBRIDACION DNA-RNA MEDIANTE DOT BLOT

La cuantificación específica de mRNAs de *L. lactis* se llevó a cabo según se describe a continuación:

Un volumen de 10 µl de agua conteniendo el mRNA a estudiar se ajustó al 50% de formamida, 6,3 % de formaldehído y 1X de SSC, y se incubó a 68°C durante 15 minutos. La muestra desnaturalizada se introdujo inmediatamente en hielo. Justo antes de cargar, cada muestra se ajustó a 6X de SSC.

Después de preparar las muestras, estas se aplicaron a los pocillos de un aparato de dot blot, conteniendo un filtro de nitrocelulosa, conectado a vacío según describen Maniatis

y cols.(1982). A continuación cada pocillo se lavó dos veces con 200 μ l de una solución SSC 10X.

Para la prehibridación e hibridación del filtro se siguió el mismo procedimiento que el descrito en el apartado 11 de este capítulo para Northern blot.

10. HIBRIDACION DNA-RNA MEDIANTE NORTHERN BLOT

La detección de mRNAs específicos de *L. lactis* y *E. coli* se llevó a cabo siguiendo el método de Hirschorn y cols. (1984), según se describe a continuación:

10.1. Separación electroforética de RNAs

Los RNAs extraídos según se describe en el apartado 9 de este capítulo, fueron resueltos electroforéticamente en condiciones desnaturizantes. Para ello la agarosa fué disuelta al 1% en tampón de electroforesis MSEF (MOPS 0,04 M, acetato sódico 0,01 M, EDTA 0,002 M, pH 7) conteniendo formaldehído al 6,3 %. El tampón MSEF fué preparado con agua tratada con DEPC con el objeto de inactivar las posibles RNAsas presentes en la muestra. El gel se preparó en una campana extractora y se dejó solidificar durante una hora a 4°C.

Previamente a su carga, los RNAs fueron desnaturizados, para lo cual 7,5 μ g de RNA fueron ajustados a 1% de tampón MSEF, 50% de formamida desionizada, 6,3% de formaldehído, 5% de glicerol, 0,1 mM de EDTA y 0,15 % de agua tratada con DEPC. Las muestras se calentaron posteriormente a 65°C durante 15 minutos, tras lo cual se introdujeron rápidamente en hielo y se cargaron en el gel. A continuación, el gel se sometió a electroforesis a 50 V durante 30 minutos para que las muestras penetrasen en él, tras lo cual la electroforesis se continuó a 25 V durante 16 horas.

Posteriormente el gel se lavó con agua destilada para eliminar el exceso de formaldehído. La integridad del RNA se comprobó por tinción del gel con bromuro de etidio a una concentración de 0,5 μ g ml⁻¹ durante 1 hora.

10.2. Transferencia de los RNAs a un filtro de nitrocelulosa

El gel se colocó sobre una hoja de papel Whatman 3MM cuyos bordes estaba en contacto con una solución de SSC 20X (20 veces concentrada). Sobre el gel se fueron colocando sucesivamente, un filtro de nitrocelulosa previamente sumergido en SSC 20X, 3 papeles Whatman humedecidos en SSC 20X y servilletas de papel. Encima de este montaje se colocó un cristal soportando un peso suficiente para favorecer la transferencia del RNA por capilaridad. La transferencia tuvo lugar durante 12 horas después de las cuales el filtro de nitrocelulosa se secó durante 1 hora a 37°C y los RNAs fueron fijados a la matriz por calentamiento a 80°C durante 2 horas.

10.3. Detección específica de mRNAs por hibridación con sondas de DNA

10.3.1. Preparación de sondas de DNA

Para la preparación de sondas de DNA marcadas específicamente en la hebra complementaria al mRNA objeto de estudio, se utilizó la técnica de extensión del primer. Para ello se emplearon dos tipos de DNA templado, dependiendo de que el fragmento sonda estuviera clonado en un fago o fagémido (M3mp18 o pALTER-1), o en un plásmido vector (pUC18).

En el caso de que el fragmento-sonda estuviera clonado en el fago M13mp18, se procedió en primer lugar a la producción del DNA monocatenario circular del bacteriófago (ssDNA) según describen Maniatis y cols. (1982). A continuación, se anilló el primer universal directo de secuencia (17-mer) al ssDNA recombinante según describieron Pons y cols. (1991). Finalmente, la hebra complementaria se extendió a partir del primer anillado al ssDNA templado mediante polimerización catalizada por 10 U de DNA polimerasa del fago T7. La mezcla de reacción contenía: 50 μ Ci de [α -³²P] CTP, 0,5 mM ATP, 0,5 mM TTP y 0,5 mM GTP, 45 mM Tris pH8, 6,5 mM MgCl₂ y BSA 0,05 mg ml⁻¹). La mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos, congelándose posteriormente hasta su utilización.

Cuando el fragmento-sonda estaba clonado en el fagémido vector pALTER-1, se aisló el ssDNA recombinante según se indica en el apartado 15 de este capítulo y posteriormente se siguió la misma estrategia que para el ssDNA recombinante del fago M13mp18 directo.

Cuando el fragmento-sonda estaba clonado en el plásmido vector pUC18, el plásmido recombinante se desnaturalizó ajustando 4 μ g de DNA plasmídico a 0,4 M de NaOH. La

mezcla se incubó 10 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual el ssDNA se precipitó con etanol. Para la preparación de la sonda se siguió el mismo método que el utilizado en el caso del ssDNA recombinante del fago M13mp18, con la excepción del primer utilizado que fué el primer universal reverso de secuencia (17-mer).

10.3.2. Hibridación específica DNA sonda-mRNAs

Para la detección específica de los mRNAs transferidos, los filtros de nitrocelulosa fueron incubados durante 4 horas en una solución de prehibridación que contiene formamida al 50%, SSC 5X, solución Denhardt 1X (preparada según describen Maniatis y cols. (1982), 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de DNA de esperma de salmón desnaturalizado y fosfato sódico 50 mM pH 6,5.

Para la hibridación, el DNA sonda marcado radioactivamente y el DNA de esperma de salmón (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) se desnaturalizaron conjuntamente a 95°C durante 10 minutos. El DNA desnaturalizado se introdujo inmediatamente en hielo para evitar su renaturalización, y se ajustó a 50% de formamida, SSC 16,7X, Denhardt 3,3X, fosfato sódico 66,6 mM y sulfato de dextrano 33,3 % (p/v)), obteniéndose así el tampón de hibridación.

El filtro prehibridado fué transferido a la solución de hibridación y se incubó a 42°C durante 18 horas. Transcurrido ese tiempo, el filtro se sometió a tres lavados a temperatura ambiente, de 10 minutos cada uno, con una solución conteniendo SSC 2X y SDS 0,1%. Posteriormente el filtro se lavó con una solución compuesta por SSC 0,1X y SDS 0,1% a 60°C tantas veces como fué necesario hasta detectar la señal radioactiva, primordialmente, en las zonas correspondientes a los RNAs de interés.

Los transcritos fueron visualizados mediante exposición a films X-OMAT (Kodak). La cuantificación se efectuó mediante excisión de las bandas y posterior medida de la radioactividad contenida en ellas o por exposición de las membranas y valoración de la radioactividad con el sistema PhosphorImager (Molecular Dynamics).

11. MAPEO DEL EXTREMO 5' DE mRNAs POR EXTENSION DEL PRIMER

El mapeo por extensión del primer del extremo 5' del mRNA se llevó a cabo siguiendo el método de van Rooijen y cols. (1990) según se describe a continuación:

El oligonucleótido utilizado como primer en la reacción (complementario al mRNA

a estudiar) se anilló al RNA obtenido de cultivos de *L. lactis* crecidos a una absorbancia a 660 nm de 0,4.

En la reacción de anillamiento se mezclaron 15 μg del RNA a estudiar, 1 pmol del oligonucleótido, y 33 U de inhibidor de RNasa, todo ello ajustado a 1X de tampón de transcriptasa reversa (Boehringer) y en un volumen final de 14 μl . La mezcla se incubó 5 minutos a 65°C y posteriormente se añadieron a la reacción 20 unidades de transcriptasa reversa, 15 μCi de [α - ^{32}P] ATP (3000 Ci mmol^{-1}) y se ajustó a 0,1 mM de dCTP, 0,1 mM de dGTP, 0,1 mM de dTTP, 9,75 μM de dATP en un volumen final de 20 μl . Posteriormente, la mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 30 minutos.

Finalizada la reacción de polimerización la transcriptasa reversa fué inactivada por extracción fenólica. A continuación, los ácidos nucleicos se precipitaron con etanol y se resuspendieron en 3 μl de agua y se añadieron 3 μl de tampón BXF (formamida desionizada al 80%, NaOH 10 mM, azul de bromofenol al 0,1%, xilen cianol al 0,1% y EDTA 1 mM).

12. MAPEO DE LOS EXTREMOS 5' Y 3' DE mRNAs POR DIGESTION CON ENDONUCLEASA S1

El procedimiento utilizado para la determinación de los extremos 5' y 3' del mRNA fué el descrito por López y cols. (1989).

12.1. Preparación de sondas de DNA

Para la preparación de las sondas necesarias en el mapeo del extremo 5' de los mRNAs específicos de *citP*, el plásmido pFS21 se digirió con el enzima de restricción *Bgl*III. Para el marcaje de este DNA en su extremo 5', se requirió la eliminación previa de los fosfatos en su posición 5' terminal mediante tratamiento con fosfatasa alcalina (Boehringer) siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Posteriormente la fosfatasa alcalina se extrajo con fenol y el DNA se precipitó. El DNA defosforilado fué marcado en 5' con 200 μCi de [^{32}P]-ATP (3000 Ci mmol^{-1}) utilizando T4 polinucleótido quinasa (Biolabs) según las instrucciones de los fabricantes. Después de marcado el DNA, la polinucleótido quinasa fué extraída con un volumen de fenol y el DNA marcado precipitado con etanol. Seguidamente el DNA marcado fué escindido en dos fragmentos con el enzima de restricción *Eco*RI y el

fragmento de 3,5 kb que contenía el extremo 5' marcado complementario al sitio putativo de iniciación del mRNA fué purificado por fraccionamiento y posterior extracción en geles de poliacrilamida y usado como sonda.

Otro método que se usó para la preparación de las sondas, necesarias para el mapeo del extremo 5' del mRNA1, fué la amplificación de un fragmento de DNA que contenía la secuencia complementaria al extremo putativo 5' del mRNA1 mediante la reacción de polimerización en cadena (PCR). Para la amplificación se utilizó el oligonucleótido 5'-GAAATTAGAGATGATAC-3' previamente marcado en su extremo 5' con [γ - 32 P]-ATP utilizando la polinucleótido quinasa. Este oligonucleótido, complementario al mRNA desde la posición 1 a la 17 (coordinadas en Fig. 9), y el oligonucleótido 5'-CCGCTTAGATTTACTTG-3', complementario al mRNA desde la posición 233 a la 217 (coordinadas en Fig. 9), se utilizaron como "primers" en la reacción de amplificación. Dicha amplificación se efectuó siguiendo las recomendaciones de Maniatis y cols. (1989).

Para la preparación de la sonda necesaria en el mapeo del extremo 3' de los transcritos del gen *citP*, se marcó en su extremo 3', el plásmido pFU9 previamente digerido con *Ban*I, enzima que produce extremos 5' protuberantes. El DNA digerido y con extremos 5' protuberantes fué marcado en su extremo 3' usando de 40 a 80 μ Ci de [α - 32 P]-dCTP, utilizando el fragmento carboxilo terminal de la DNA polI de *E. coli* según describen López y cols. (1989), permitiendo el relleno y marcado de los extremos 3' recesivos. Posteriormente se eliminó el fragmento Klenow por extracción con un volumen de fenol y el DNA sonda fué precipitado con etanol. Seguidamente el DNA fué escindido en dos fragmentos con *Eco*RI y el fragmento de 3181 pb que contenía el extremo 3' marcado complementario al sitio putativo de iniciación del mRNA fué purificado por fraccionamiento y posterior extracción en geles de poliacrilamida y usado como sonda.

12.2. Detección específica de mRNAs

La hibridación se realizó mezclando en 50 μ l la sonda de DNA conteniendo 30000 cpm, 150 μ g de RNA total, PIPES 40 nM pH 6,3, NaCl 0,4 M, EDTA 1 mM y formamida desionizada al 70 %. Las muestras fueron calentadas a 85°C durante 10 minutos e inmediatamente después se transfirieron a un baño termostatzado a una temperatura de hibridación que fué determinada para cada experimento, incubandose posteriormente durante

3 horas. A las muestras hibridadas se les añadieron 50 o con 100 U de la endonucleasa S1 diluida en 450 μ l de un tampón que contenía acetato sódico 30 mM pH 4,6, NaCl 280 mM, ZnSO₄ 4,5 mM y 9 μ g de DNA de timo de ternera sonificado. La digestión enzimática se efectuó mediante incubación de las muestras durante 20 minutos a 30°C.

Finalizada la incubación, la reacción fué parada por inmersión del tubo a 0°C y por adicción de 115 μ l de tampón de parada conteniendo acetato amónico 2,5 mM y EDTA 50 mM pH 8). La nucleasa S1 fué extraída añadiendo un volumen de fenol y los ácidos nucleicos precipitados añadiendo a la fase acuosa 10 μ g de tRNA y 2,5 volúmenes de isopropanol. Las muestras fueron resuspendidas en colorante BXF y para su análisis posterior se utilizó el volumen equivalente a 3000 cpm. Los tamaños de los fragmentos protegidos de la nucleasa S1 fueron analizados en geles de poliacrilamida al 6 % conteniendo urea 8M.

13. ELECTROFORESIS DE ACIDOS NUCLEICOS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Para la resolución de fragmentos de DNA de 50 a 500 pb se llevó a cabo en geles verticales de acrilamida:bisacrilamida (30:0,8) al 5% en tampón TAE, conteniendo TEMED al 0,05% y persulfato amónico al 0,12%. Las dimensiones de los geles fueron 14,5 cm de ancho, 14 cm de largo y 1,2 mm de espesor. La preparación de las muestras y la tinción de los geles se realizó como se ha descrito para los geles de agarosa.

Los productos de las reacciones de secuenciación, los fragmentos protegidos de la degradación por endonucleasa S1 y los fragmentos de DNA sintetizados con transcriptasa reversa por la extensión de "primers" anillados a mRNA, fueron separados por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida-urea. El tampón utilizado fué TBE (Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM pH 8,3 y EDTA 2,5 mM).

En un matraz kitasato se repartió la solución acrilamida/bisacrilamida/TBE/PSA/Urea y se desgasificó a vacío y en hielo durante 3 minutos, después de lo cual se añadió TEMED para iniciar la polimerización. En todos los casos los geles contenían urea 8 M y PSA al 0,06%, modificándose la concentración de acrilamida, (bisacrilamida), persulfato amónico, TEMED, molaridad del tampón de electroforesis, así como el tiempo de duración de la electroforesis, dependiendo del tamaño de los fragmentos que se quisieron analizar. Después de su polimerización, el gel se colocó en una cubeta de electroforesis vertical conteniendo

tampón TBE y se sometió a preelectroforesis a 1200 V durante 30 minutos, tras lo cual se cargaron las muestras. Antes de realizar dicha carga, el DNA contenido en las muestras fue desnaturalizado por calentamiento a 96°C durante 3 minutos y rápidamente enfriadas a 4°C para evitar su renaturalización. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 1900 V.

14. MUTAGENESIS DIRIGIDA

Para introducir un sitio *EcoRI* en lugares específicos del DNA se utilizó un sistema de mutagénesis dirigida "in vitro" comercializado por Promega. Este sistema comercial se basa en único vector de mutagénesis, el fagémido pALTER-1, y un procedimiento para la selección de mutantes. El vector pALTER-1 posee dos genes de resistencia a antibióticos. El gen de resistencia a tetraciclina es funcional mientras que el gen de resistencia a ampicilina ha sido inactivado. Durante la reacción de mutagénesis, en la cual está presente el oligonucleótido mutagénico, se añade un oligonucleótido que restaura la resistencia a ampicilina. Después de una ronda de transformación en una estirpe de *E. coli* deficiente en el sistema de reparación de bases mal apareadas, se procede a una segunda ronda de transformación en la cual se asegura la segregación de los plásmidos mutantes y de los plásmidos originales. En nuestro caso, la mutación consistió en la introducción de un sitio *EcoRI* en el codón de iniciación de la traducción (AUG) de determinados genes. Debido a ello los plásmidos mutantes se distinguieron inicialmente de los plásmidos originales por el diferente patrón de restricción *EcoRI* que presentaban ambos plásmidos. Posteriormente, la presencia del sitio *EcoRI* introducido por mutagénesis se comprobó mediante secuenciación de la zona mutagenizada presente en los plásmidos que previamente presentaban el patrón *EcoRI* esperado.

La obtención de estas secuencias de DNA mutageneizadas requirió la construcción de fagémidos recombinantes por clonación de insertos, que contenían la región de DNA que interesaba mutar, en la región de multiclonado del fagémido pALTER-1 (Promega) localizada en el gen *lacZ*. Los fagémidos recombinantes (dsDNA) se establecieron por transformación en *E. coli* JM109 tal y como se indica en el apartado 2 de este capítulo de Métodos. Las colonias blancas que contenían los fagémidos recombinantes se seleccionaron en placas conteniendo 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de Tc, 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de X-gal y 0,5 mM de IPTG. Para producir el ssDNA del fagémido recombinante, necesario en la posterior reacción de mutagénesis, los

cultivos se infectaron con el fago "ayudador" R408 a una multiplicidad de infección de 10 (10 fagos por célula). El ssDNA del fagémido recombinante se aisló, a partir del sobrenadante de un cultivo infectado durante 10 horas, tal y como se indica a continuación: el fagémido se precipitó añadiendo 0,25 volúmenes de una solución conteniendo 3,75 M de acetato amónico pH 7,5 y PEG-8000 al 20%. La mezcla se mantuvo 30 minutos en hielo y el sobrenadante se recuperó después de centrifugar 15 minutos. Para desnaturalizar las proteínas de la capsida del fagémido se añadió un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) al sobrenadante, se mezcló y posteriormente se centrifugó. A la fase acuosa se le añadió un volumen de fenol, se mezcló y posteriormente se centrifugó. Finalmente los ácidos nucleicos contenidos en la fase acuosa se precipitaron con etanol.

La mutagénesis se llevó a cabo anillando 0,25 pmoles del oligonucleótido restaurador de la resistencia a ampicilina y 1,25 pmoles del oligonucleótido mutagénico específico fosforilados a 0,005 pmoles del fagémido recombinante (ssDNA). A continuación se extendió la cadena mutante con DNA polimerasa del fago T4 y fué sellada con DNA ligasa del fago t4.

Seguidamente, el dsDNA recombinante se transformó en *E. coli* BMH71-18 *mutS*. Las células conteniendo fagémidos recombinantes ampicilina sensibles, procedentes de la replicación de la monocadena parental fueron eliminados de la población por crecimiento durante la noche en presencia de ampicilina. El DNA fué extraído según el método descrito en el apartado 2.1 de este capítulo y se transformó en *E. coli* JM109 para asegurar una apropiada segregación de los fagémidos recombinantes mutantes. Para comprobar si la mutagénesis había tenido lugar los plásmidos obtenidos se analizaron mediante digestión con *EcoRI* y posteriormente la introducción correcta de la mutación se constató por secuenciación de la zona mutagenizada.

15. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD CLORANFENICOL ACETILTRANSFERASA (CAT)

La actividad CAT de células de *L. lactis* codificada por el gen *cat* presente en plásmidos recombinantes fué determinada como se describe a continuación. Cultivos de *L. lactis* conteniendo dichos plásmidos fueron crecidos en M17 durante 12 horas en presencia de una concentración final de treonina 40 mM. Los cultivos fueron suplementados con Cm

a $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ (excepto en el caso de células conteniendo pFL10, que recibieron Tc a una $1 \mu\text{g ml}^{-1}$). Este cultivo sirvió para inocular 20 ml del mismo medio para dar una absorbancia inicial a 660 nm de 0,05.

Cuando el cultivo llegó a una absorbancia de 0,4, las células se centrifugaron y se resuspendieron en 200 μl de tampón A (Tris-HCl pH 7,8 50mM, EDTA 1mM, PMSF 0,1 mM, DTT 50 μM y lisozima 125 $\mu\text{g ml}^{-1}$). A continuación las células se sometieron a 6 ciclos de sonicación de 20 segundos cada uno, en un sonicador modelo Sonifier Cell Disruptor B-12 (Branson Sonic Power Company). La actividad CAT presente en los extractos fue determinada según el método descrito por Shaw (1975). Una unidad de actividad CAT es definida como la cantidad de enzima catalizando la acetilación de 1 nmol de cloramfenicol por minuto a 37°C. Los valores de actividad CAT fueron referidos a la concentración de proteínas de las muestras. Esta concentración se determinó mediante el sistema BCA, que se utilizó según las instrucciones del fabricante (Pierce).

16. ENSAYOS DE TRANSPORTE DE CITRATO

Para determinar el transporte de citrato en *L. lactis*, los cultivos bacterianos fueron crecidos hasta una absorbancia de 0,4 a 660 nm, posteriormente sedimentados por centrifugación y finalmente resuspendidos en 650 μl de tampón fosfato sódico (Na_2HPO_4 25 mM, pH 5,5; 3mM MgSO_4) para dar una concentración final de $1-2 \times 10^9$ células ml^{-1} . Después de la adición de 12 μCi [1,5- ^{14}C]-citrato (83,8 mCi mmol^{-1}) 12 μM , las células fueron incubadas a 30°C, extrayendose alícuotas de 100 μl a diferentes tiempos y recogiendo en filtros Millipore HA de 45 μm . La incorporación de [^{14}C]-citrato por las células fue medida como describieron previamente Sesma y cols. (1990).

La determinación del transporte de citrato en *E. coli* fue realizada tal y como describieron previamente Sesma y cols. (1990).

17. CONSTRUCCIÓN DE LOS PLASMIDOS pFL3, pFL4 Y pFL6 DERIVADOS DEL PLASMIDO LACTOCOCICO pCIT264

El plásmido pFS21, híbrido constituido por pCIT264 y el vector pUC18, fue utilizado como origen de DNA para el subclonación de distintas regiones del plásmido pCIT264 (Cit⁺).

El plásmido pFL3 se construyó tal y como se esquematiza en la Fig. 4: el plásmido pFS21 fue digerido con *SalI* y *BglII*, los extremos protuberantes fueron rellenados y uno de los fragmentos resultantes de la digestión con un tamaño de 7,4 kb y conteniendo el gen *citP* de pCIT264 (fragmento A), fue purificado. El plásmido pSM29 (Martinez y cols. (1987)), que contiene el gen *polA* de *Streptococcus pneumoniae*, fue digerido con los enzimas de restricción *EcoRI* y *NheI* y los extremos protuberantes rellenados. El fragmento de DNA *EcoRI-NheI* de 3,0 kb (fragmento B) que contiene el gen *cat* del plásmido pC194 y el promotor del gen *polA* de *S. pneumoniae* (P_{polA}) fue purificado. Los fragmentos A y B fueron ligados y la mezcla de ligación fue usada para transformar *E. coli* MC1061. El plásmido resultante, denominado pFU1, contiene el gen *citP* bajo el control de P_{polA} . A continuación pFU1 se digirió con las enzimas de restricción *HindIII* y *EcoRI* y los extremos protuberantes fueron rellenados. El fragmento de DNA de 7,7 kb purificado se ligó al plásmido vector pLS1 previamente linearizado con *EcoRI* y con sus extremos protuberantes rellenados. La mezcla de ligación se utilizó para transformar *S. pneumoniae*. El plásmido resultante, obtenido mediante selección para resistencia a Cm, se denominó pFL1. Posteriormente se procedió a la eliminación del gen *cat* del plásmido pFL1 mediante digestión con *BglII*. El fragmento de DNA *BglII* de 11,0 kb fué recircularizado mediante ligación y utilizado para transformar un cultivo competente de *S. pneumoniae*. El plásmido resultante fue obtenido mediante selección para Tc^r y se denominó pFL3. Finalmente pFL3 fue transferido a la estirpe MG1363 mediante electroporación.

El plásmido pFL6 fue construido por digestión de pFL3 con las enzimas de restricción *BglII* y *BspEI*. El fragmento de DNA *BglII-BspEI* de 10,2 kb se recircularizó mediante ligación y de esta manera se eliminó el fragmento de DNA *BglII-BspEI* de 816 pb que contiene el promotor P_{polA} . El plásmido pFL6 fue establecido en *S. pneumoniae*.

Para la construcción del plásmido pFL4, el plásmido pFS21 se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* y *ClaI*. El fragmento de DNA *EcoRI-ClaI* de 6,1 kb, resultante en esta digestión, fue purificado y sus extremos protuberantes rellenados. Este fragmento, que incluye el gen *citP* de pCIT264, fue clonado en el sitio de restricción *EcoRI* previamente rellenado del vector pLS1. El plásmido resultante, pFL4, fue establecido en *S. pneumoniae*. Los plásmidos pFL4 y pFL6 fueron posteriormente transferidos por electroporación a *L. lactis* MG1363.

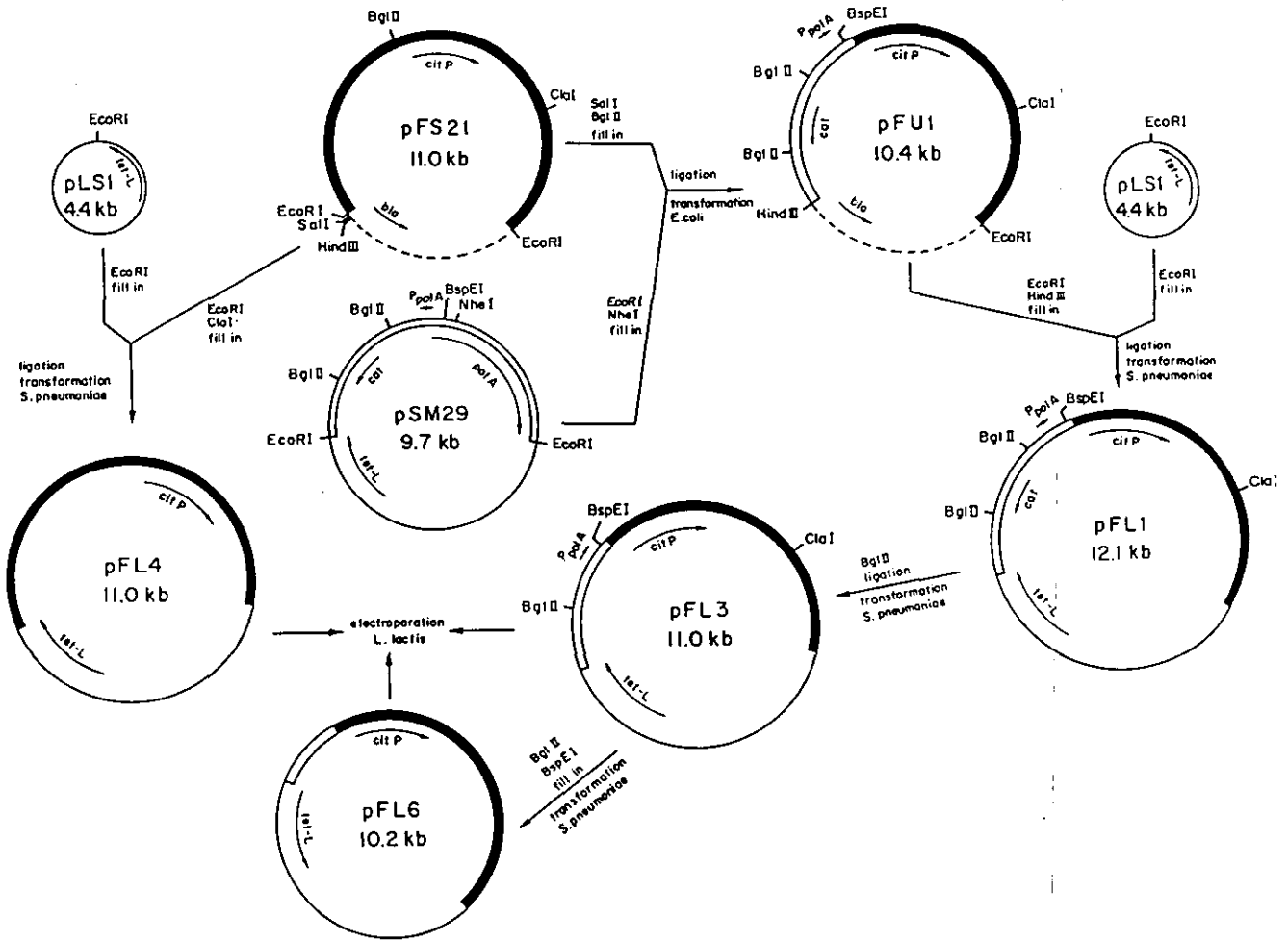


Fig. 4. Esquema diagramático de la construcción de los plásmidos pFL3, pFL4 y pFL6. Los genes se transcriben en la dirección indicada por las flechas. Abreviaturas: *citP*, gen que codifica para la citrato permeasa P; *bla*, gen que codifica para la β -lactamasa; *polA*, gen que codifica para la DNA polimerasa I de *S. pneumoniae*; *cat*, gen que codifica para la cloranfenicol acetiltransferasa; *tet-L*, gen que codifica para la proteína que confiere resistencia a tetraciclina. P_{polA} , promotor transcripcional del gen *polA*. Los segmentos representan: negro, plásmido lactocócico pCIT264; blanco, inserto cromosómico estreptocócico. Las líneas continuas y discontinuas representan, respectivamente, el vector pLS1 y el vector pUC18. Sólo se indican los sitios de restricción relevantes de cada plásmido.

1. *CITP* ES EL UNICO GEN REQUERIDO PARA EL TRANSPORTE DE CITRATO EN *L. lactis* biovar *diacetylactis*

Previamente al inicio de este trabajo, dos grupos de investigación, Sesma y cols. (1990) y David y cols. (1990), habían obtenido plásmidos recombinantes denominados respectivamente pFS21 y pNZ67ΔE, basados en vectores de *E. coli*, que contienen el plásmido lactocócico de 8,0 kb que codifica para la citrato permeasa P (CitP) de *L. lactis* biovar *diacetylactis*. Ambos plásmidos recombinantes capacitan a *E. coli* para transportar citrato a su interior mostrando una expresión funcional del gen *citP* en dicho huésped.

David y cols. (1990) sugirieron que *citP* era el único gen requerido para el transporte de citrato en *E. coli*. Sin embargo, Jahns y cols. (1991) mostraron que en el huésped original, *L. lactis*, se requiere, para la utilización de citrato, la presencia de la región de DNA que precede a dicho gen en el plásmido Cit⁺.

Con el objeto de determinar si *citP* es el único gen esencial para el transporte de citrato en *L. lactis* biovar *diacetylactis*, se construyeron los plásmidos pFL3, pFL4 y pFL6 (Fig. 5) y se transfirieron a la estirpe MG1363 de *L. lactis* carente de plásmidos. Los detalles sobre su construcción aparecen recogidos en el apartado 17 del capítulo de Métodos y en la Fig. 4. Estos plásmidos recombinantes contienen distintas regiones del plásmido pCIT264 (Cit⁺) clonadas en el vector de amplio espectro de huésped pLS1.

Las estirpes de *L. lactis* MG1363 conteniendo pFL3, pFL4 o pFL6 fueron utilizadas para realizar ensayos de transporte de citrato. La medida de incorporación de citrato se efectuó con células enteras por determinación de la acumulación intracelular de citrato tal y como se indica en el apartado 16 del capítulo de Métodos. Los resultados obtenidos con estos ensayos aparecen recogidos en la Fig. 6.

El plásmido pFL4, que contiene el fragmento *EcoRI*-*ClaI* de pCIT264, confirió la capacidad de transportar citrato a *L. lactis* MG1363 (Fig. 6). Este resultado demuestra que la región localizada "downstream" del gen *citP*, en el fragmento *ClaI*-*EcoRI*, no es necesaria para el transporte de citrato en *L. lactis*. Cabe la posibilidad que la región comprendida entre el terminador del gen *citP* y el sitio *ClaI* sea necesaria para el transporte de citrato. Sin embargo, esta última posibilidad es improbable debido a que en dicha zona está contenido un elemento semejante a una secuencia de inserción (IS) y a la inexistencia de ORFs significativas en su secuencia (David y cols., 1990 y Jahns y cols. 1991).

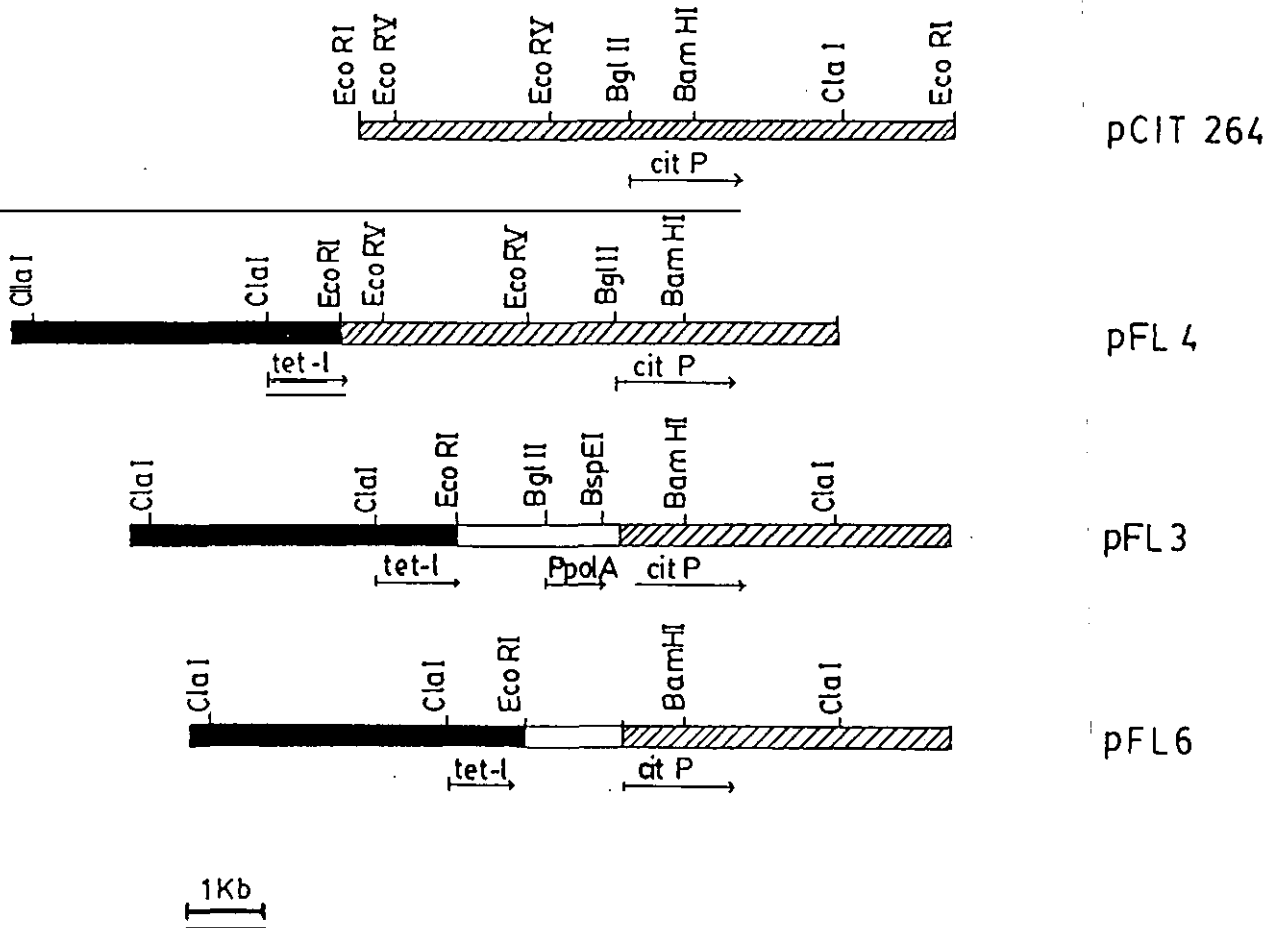


Fig. 5. Mapa físico del plásmido lactocócico pCIT264 y sus derivados pFL3, pFL4 y pFL6. Los genes se transcriben en la dirección indicada por las flechas. Abreviaturas: *citP*, gen que codifica para la citrato permeasa P; *P_{polA}*, promotor del gen *polA* de *S. pneumoniae*; *tet-L*, gen que codifica para la proteína que confiere la resistencia a tetraciclina. Los segmentos representan lo siguiente: rayado, plásmido lactocócico pCIT264; negro, fragmento de DNA del plásmido vector pLS1; blanco, fragmento de DNA del plásmido pSM29. Sólo se muestran los sitios de restricción relevantes para este estudio.

El requerimiento para el transporte de citrato, del fragmento *EcoRI-BglII* de pCIT264 que precede al gen *citP*, fue examinado en las estirpes MG1363/pFL3 y MG1363/pFL6

(Fig.6). El plásmido pFL3 que contiene *citP* bajo el control de P_{polA} confirió a la estirpe MG1363 una capacidad para acumular citrato dos veces superior a la mostrada por la estirpe MG1363/pFL4. Sin embargo, la presencia del plásmido pFL6, que carece de P_{polA} , en la estirpe MG1363 no revertió el fenotipo Cit^- de la estirpe MG1363. Este resultado pone de manifiesto la necesidad del promotor estreptocócico (P_{polA}) para la transcripción de *citP* en el plásmido pFL3.

Todos estos resultados indican que únicamente se requiere *citP* para el transporte de citrato en *L. lactis*, a la vez que ponen de manifiesto la necesidad de las secuencias de DNA que preceden inmediatamente a este gen para su expresión.

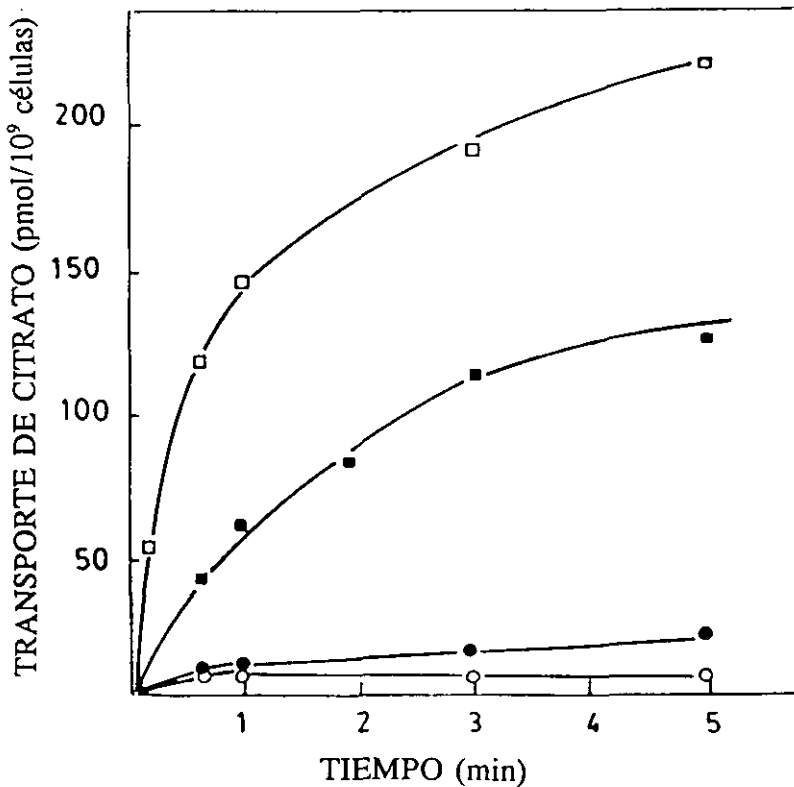


Fig. 6. Transporte de citrato en estirpes de *L. lactis* MG1363 (o), MG1363/pFL3 (□), MG1363/pFL4 (■), MG1363/pFL6 (●). Las bacterias se crecieron en medio M17. La incorporación de [^{14}C]-citrato por células enteras se midió según se detalla en el apartado 16 del capítulo de Métodos. Cada punto es la media de al menos tres experimentos independientes.

2. TRANSCRIPCIÓN DEL GEN *CITP* EN *L. lactis* biovar *diacetylactis*

Con el objeto de caracterizar la expresión del gen *citP* a nivel transcripcional, en su huésped original, *L. lactis*, se procedió al análisis de sus mRNAs por hibridación mediante Northern blot, según se describe en el apartado 10 del capítulo de métodos.

Para ello los RNAs extraídos de cultivos de *L. lactis* biovar *diacetylactis* CRL264¹ y *L. lactis* MG1363/pFL3, crecidos hasta una absorbancia de 0,4, fueron fraccionados en geles de agarosa, y transferidos a membranas de nitrocelulosa, según se describe en el apartado 10 del capítulo de Métodos. La detección de los mRNAs específicos se efectuó por hibridación con una sonda (sonda 1, mostrada en Fig. 7), que incluye los 206 primeros codones del gen *citP*. Para preparar dicha sonda se construyó el fago recombinante FM1, que contiene el fragmento *BglII-BamHI* de 0,9 kb del plásmido lactocócico pCIT264, en el sitio *BamHI* del fago M13mp18. El DNA monocatenario circular de dicho bacteriófago se utilizó como molde para la obtención de la sonda según se describe en el apartado 10.3.1 del capítulo de Métodos.

La detección de los transcritos del gen *citP* con la sonda 1 (Fig. 7, calles 1 y 2), reveló la presencia de dos mRNAs en la estirpe CRL264 (Fig. 7, calle 1), el mayor de ellos con una longitud aproximada de 2900 nucleótidos, al cual se denominó mRNA1 y el menor con una longitud aproximada de 1900 nucleótidos, al cual se denominó mRNA2. Con el objeto de determinar si la región 5' de estos mRNAs estaba incluida en el fragmento *EcoRV-EcoRV* de pCIT264, se utilizó como sonda el DNA del plásmido pFU8 (Tabla 2), que contiene dicho fragmento clonado en el vector pUC18 (sonda 2, mostrada en Fig. 7). El mRNA1 de 2900 nucleótidos sintetizado por la cepa CRL264 fue el único transcrito detectado con esta sonda (Fig. 7, calle 4). Este resultado muestra que la región 5' del mRNA1 está localizada en el fragmento *EcoRV-EcoRV* que precede al gen *citP*. Además, el sitio de iniciación del mRNA2 debe estar situado en el fragmento *EcoRV-BglII*, puesto que la estirpe MG1363/pFL3 no produce el transcrito de 1900 nucleótidos (Fig. 7, calle 2).

¹Esta estirpe natural contiene el plásmido pCIT264 que codifica para la citarto permeasa P.

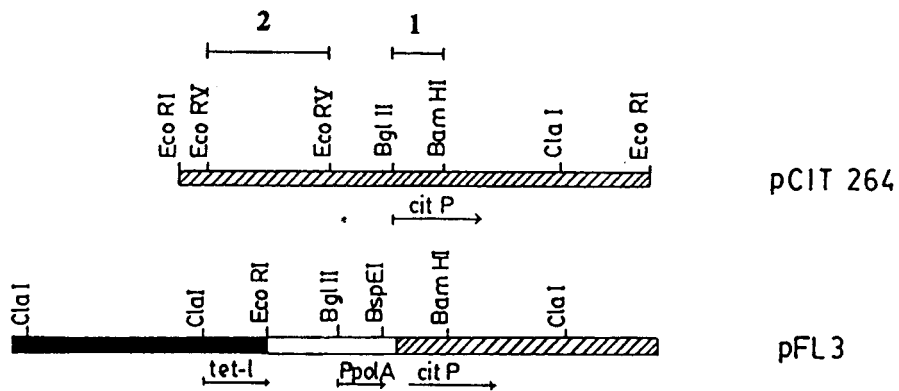


Fig. 7. Detección de los transcritos de *citP* por hibridación mediante Northern blot. Las estirpes de *L. lactis* CRL264 y MG1363/pFL3 fueron crecidas en M17 hasta una absorbancia a 660 nm de 0,4. Los RNAs totales procedentes de dichas estirpes fueron aislados y fraccionados en gel de agarosa. Posteriormente, dichos RNAs fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa y se hibridaron bien con la sonda 1 o bien con la sonda 2. Las líneas que están situadas sobre el mapa físico de pCIT264 representan los fragmentos de restricción usados como sonda (1 ó 2) para detectar los mRNAs específicos de *citP*. S, los RNAs bacterianos 16S y 23S fueron utilizados como marcadores de tamaño molecular. Esta calle se escindió del gel y se tiñó con bromuro de etidio a una concentración de 0,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

El plásmido pFL3 carece del fragmento *EcoRV-BglII* adyacente al extremo 5' del gen *citP* (Fig. 5) y codifica un único transcrito de 2100 nucleótidos detectado con la sonda 1 (Fig. 7, calle 2). El tamaño del transcrito coincide con una iniciación de la transcripción a partir del promotor P_{polA} y una terminación en el terminador transcripcional ρ -independiente adyacente al extremo 3' del gen *citP*, propuesto por David y cols. (1990). Como se esperaba, no se detectó señal de hibridación con el RNA obtenido de la estirpe MG1363/pFL3 cuando se hibridó con la sonda 2 (Fig. 7, calle 3).

Estos resultados muestran que el gen *citP* se transcribe en dos especies moleculares de mRNA (mRNA1 y mRNA2), presumiblemente a partir de dos secuencias promotoras en *L. lactis* biovar *diacetylactis*.

3. SECUENCIACION DE LA ZONA QUE PRECEDE AL GEN *CITP*

Los resultados descritos en el apartado anterior indicaban que los extremos 5' del mRNA1 y del mRNA2 están situados respectivamente a 1500 y 500 nucleótidos aproximadamente del extremo 5' del gen *citP*. Con el objeto de localizar las secuencias promotoras putativas de la transcripción del gen *citP* en *L. lactis* biovar *diacetylactis*, se determinó la secuencia de 1586 nucleótidos que preceden a dicho gen. La determinación de la secuencia de nucleótidos se efectuó mediante el método descrito en el apartado 7 del capítulo de Métodos. Para ello se construyeron los plásmidos recombinantes pFU4, pFU5, pFU7, pFU8 y pFU9 (descritos en la Tabla II), a partir de varios fragmentos de restricción del plásmido pCIT264, que fueron clonados en el plásmido vector pUC18. La estrategia de secuenciación, así como la longitud de la secuencia de nucleótidos obtenida con cada primer utilizado, están recogidas en la Fig. 8. Asimismo, la secuencia de nucleótidos obtenida y los marcos de lectura abierta inferidos a partir de ella se muestran en la Fig. 9.

La inspección de la secuencia obtenida, mostró la presencia de dos promotores putativos para la transcripción de dicho gen, denominados P1 y P2. La transcripción a partir del promotor putativo P1 daría lugar a un mRNA de 2914 nucleótidos y el promotor putativo P2 daría lugar a un mRNA de 1924 nucleótidos, asumiendo que el extremo 3' de dichos transcritos estuviera localizado en el terminador ρ -independiente putativo adyacente al gen *citP*. Las longitudes de estos transcritos corresponderían aproximadamente a los tamaños

determinados por hibridación mediante Northern blot para mRNA1 y mRNA2, respectivamente.

Asimismo se observaron dos marcos de lectura abiertos (ORFs) putativos parcialmente solapadas que se denominaron *citQ* y *citR*. Ambas ORFs estaban situadas delante de *citP* y con la misma polaridad que este gen. Los genes *citQ* y *citR* podrían codificar para la síntesis de dos polipeptidos de 3876 y 13087 Da respectivamente. En el caso de que los promotores putativos encontrados fueran funcionales, *citQ*, *citR* y *citP* estarían incluidos en ambos transcritos.

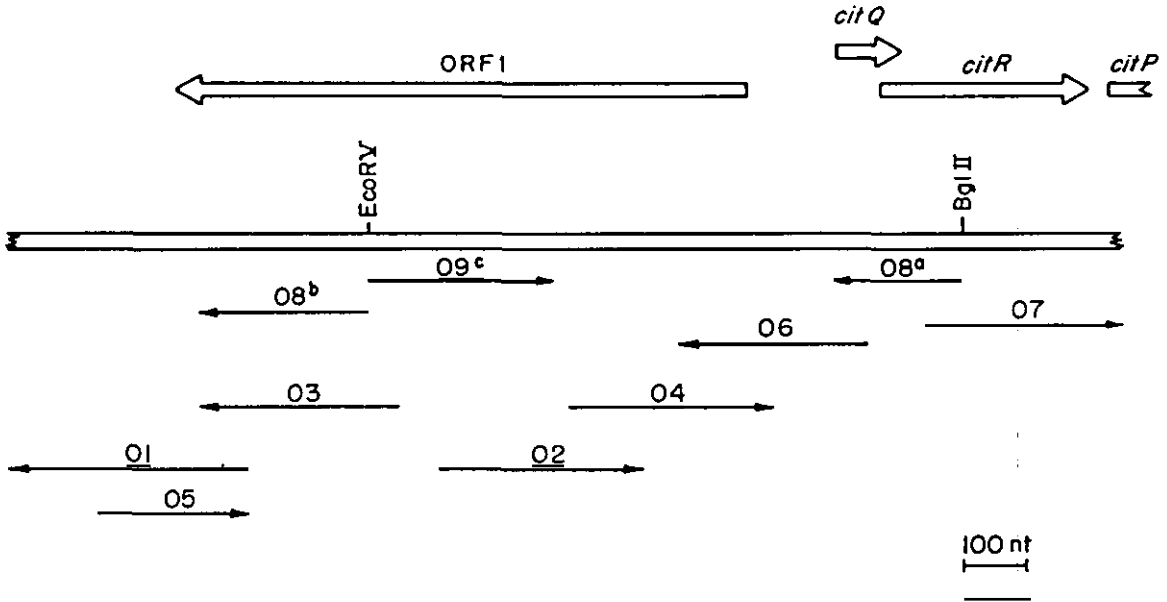


Fig. 8. Estrategia de secuenciación de la zona que precede inmediatamente al gen *citP* en el plásmido pCIT264. Abreviaturas: *citP*, gen que codifica para la citrato permeasa P; *citR*, gen que codifica para EL polipéptido CitR; *citQ*, gen que codifica el polipéptido putativo CitQ. Las flechas indican la estrategia de secuenciación de la zona que precede inmediatamente al gen *citP*, indicando cada una de ellas el inicio, la dirección y la longitud de la secuencia obtenida a partir de cada uno de los fragmentos, según se describe en el apartado 7 del capítulo de Métodos.

Otra observación destacable en la inspección de la secuencia fué la ausencia de ORFs en los 983 nucleótidos que separan P1 y P2 en la hebra que codifica para *citQ*, *citR* y *citP*. Sin embargo, en la hebra complementaria se observó un marco de lectura abierto, denominado ORF1, que podría codificar para un polipéptido de 33675 Da. El promotor putativo de este gen fue denominado P3 y estaría situado en la hebra complementaria y solapando con el promotor P2, de manera que la región -35 de P3 estaría situada entre la región -35 y la región -10 de P2, tal y como se indica en la Figura 9.

Finalmente se observaron dos repeticiones directas de 17 pb que flanqueaban a ORF1. La repetición mas cercana a *citP* se encuentra solapando con los promotores putativos P2 y P3 (Fig. 9).

4. CARACTERIZACION DE LAS SEÑALES TRANSCRIPCIONALES DE *CITP* EN *L. lactis*.

Con el objeto de caracterizar los sitios de iniciación de los dos mRNAs transcritos de *citP* detectados en *L. lactis* biovar *diacetylactis*, se procedió a determinar el extremo 5' de dichos mRNAs, mediante mapeo por endonucleasa S1 y/o por la técnica de extensión del primer.

La localización del sitio de iniciación de los mRNAs específicos de *citP* mediante mapeo con endonucleasa S1 se efectuó tal y como se indica en el apartado 12 de Métodos. Para ello se aislaron los RNAs totales a partir de cultivos de *L. lactis* biovar *diacetylactis* crecidos hasta una absorbancia a 660 nm de 0,4 (fase exponencial) o de 1,2 (fase estacionaria). A continuación los RNAs se hibridaron a 42°C (Fig. 4 calles 1 y 2), 47°C ó 49°C (datos no mostrados) con una sonda que contiene el fragmento de DNA *EcoRI-BglIII* de 3,5 kb del plásmido pCIT264, marcado radiactivamente en el extremo 5' previamente generado por digestión con *BglIII*. La preparación de la sonda se describe en el apartado 12 del capítulo de Métodos. Posteriormente los híbridos DNA-RNA fueron tratados con endonucleasa S1 y los fragmentos protegidos analizados en geles de poliacrilamida-urea (Fig. 10). La sonda utilizada debería proteger los extremos 5' de los dos mRNAs específicos de *citP* permitiendo teóricamente, la localización de los sitios de iniciación de dichos transcritos.

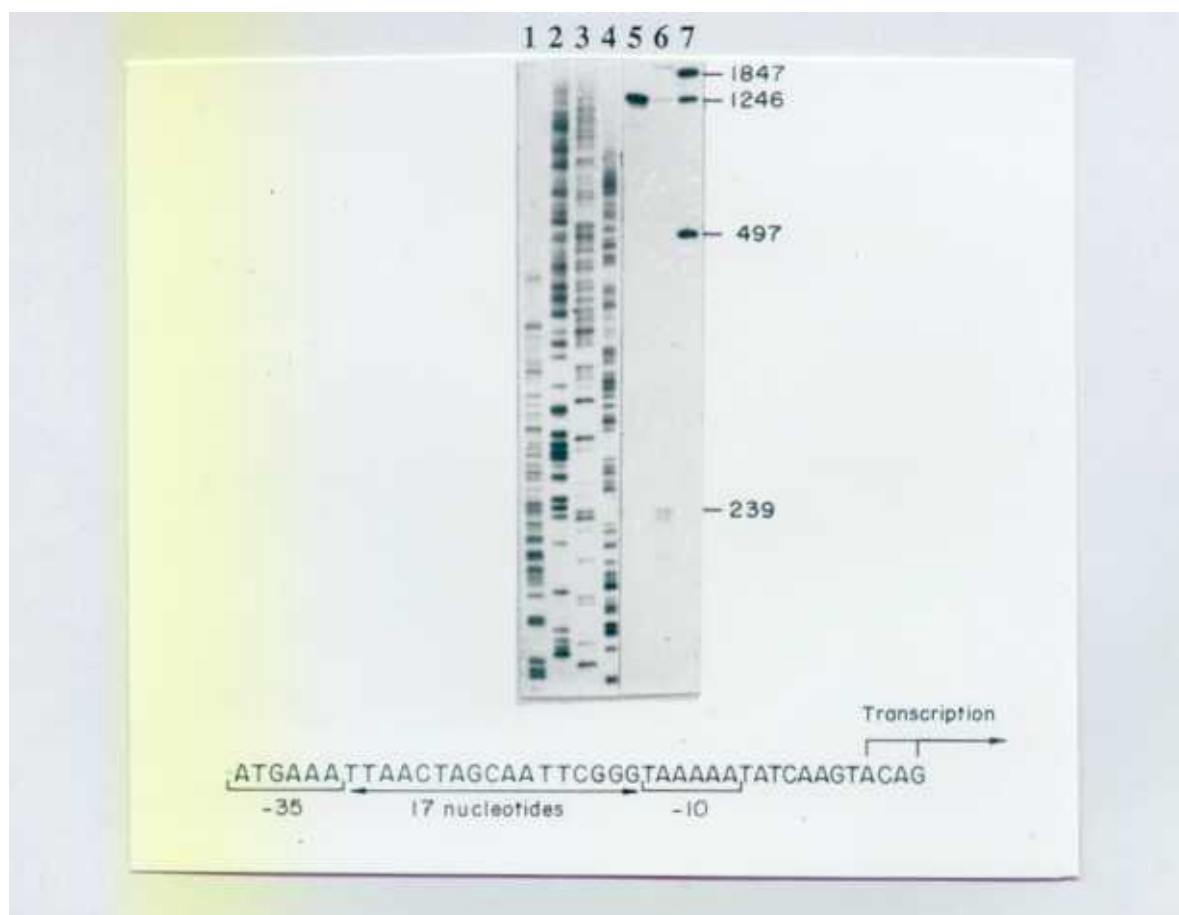


Fig. 10. Localización del extremo 5' de los transcritos de *citP* mediante protección a la digestión con endonucleasa S1. El fragmento de DNA *EcoRI-BglIII* de 3,5 kb del plásmido pCIT264 fué hibridado a 42°C (calles 5 y 6), con el RNA total obtenido de cultivos bien en fase exponencial (calle 5) o bien en fase estacionaria (calle 6). El tamaño de los fragmentos de DNA protegidos (calles 5 y 6) y el de los usados como marcadores de tamaño molecular (calle 7) se indican en la parte derecha de la figura. La secuencia de DNA (calles 1-4 (A, C, G y T) utilizada es la correspondiente a la región estudiada. El promotor transcripcional P2 y el sitio de iniciación del mRNA2 se muestran en el pie de la figura.

Los resultados obtenidos muestran que el extremo 5' del mRNA2 sólo se detecta en la fase estacionaria del crecimiento (Fig. 10, calle 6), mientras que el extremo 5' del mRNA1 se detecta preferentemente en la fase exponencial del crecimiento bacteriano y en menor cuantía en la fase estacionaria (Fig. 10, calles 5 y 6). En el caso del mRNA2, los fragmentos

protegidos que se detectaron tenían una longitud de 237 y 239 pb. Por lo tanto dicho mRNA, se inicia en los nucleótidos 1120 (A) y 1123 (G), como se indica en la Fig. 9. Situado delante del sitio de iniciación se encuentra localizada la secuencia del promotor P2, con una región -35 ATGAAA y una región -10 TAAAAA separadas por 17 nucleótidos.

La sonda utilizada para proteger ambos transcritos también permitió situar el inicio del mRNA1, a una distancia aproximada de 1200 nucleótidos del sitio *Bgl*III. Tomando como referencia este dato, el inicio del mRNA1 se determinó utilizando dos técnicas: la técnica de extensión del "primer" y el mapeo por digestión con endonucleasa S1.

La determinación del inicio del mRNA1 mediante la técnica de extensión del "primer" se llevó a cabo como se indica en el apartado 11 del capítulo de Métodos. El oligonucleótido de 17 mer que se utilizó como "primer" en la reacción de extensión fue el siguiente: 5'-GAAATTAGAGATGATAC-3'. La secuencia de este oligonucleótido es complementaria a la del mRNA1 desde el nucleótido 233 al nucleótido 217 en la Fig. 9.

Para la determinación del sitio de iniciación del mRNA1 mediante el mapeo por digestión con nucleasa S1 se procedió según se indica en el apartado 12 del capítulo de Métodos. En esta ocasión la sonda utilizada consistió en un fragmento de 233 pb (coordenadas 1-233 en Fig. 9), que contenía la secuencia complementaria al inicio putativo del mRNA1. Dicho fragmento se obtuvo por amplificación mediante la reacción de polimerización en cadena según se describe en el apartado 12.1 del capítulo de Métodos.

Ambas técnicas produjeron resultados similares, mostrando que el mRNA1 comienza en los nucleótidos 104 (A) y 106 (A) (coordenadas en la Fig. 9). Dependiendo de la técnica utilizada, se observaron una o dos bandas adicionales (Fig. 11, calles 10-13 ó 1). Una de estas bandas adicionales, que correspondería a un transcrito iniciándose en el nucleótido 121 (G) (coordenadas en la Fig. 9), aparecía sistemáticamente al utilizar la técnica de mapeo con endonucleasa S1 (Fig. 9, calles 10-13). Esta banda se observaba independientemente de la concentración de la nucleasa y de la temperatura de hibridación utilizadas (Fig. 11, calles 10-13). Situado delante del extremo 5' del mRNA1 aparece la secuencia del promotor P1, con una región -35 TTGCGA y una región -10 TAGAAT separadas por 17 nucleótidos.

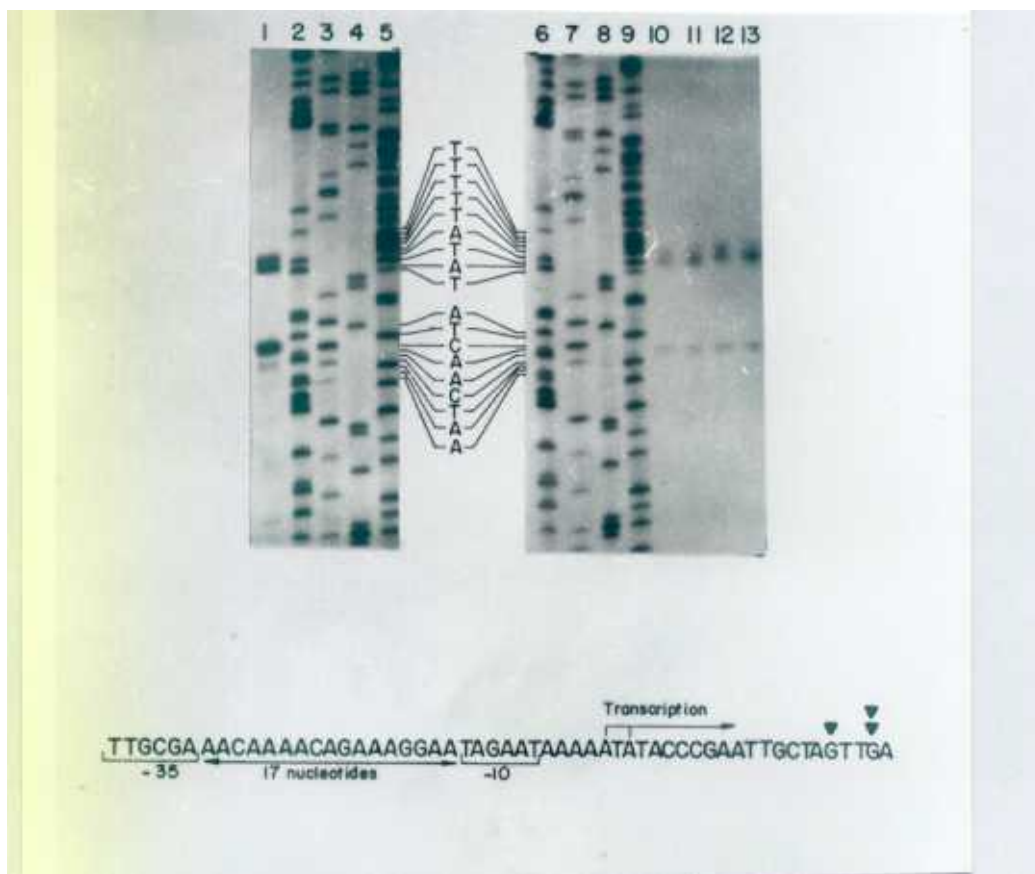


Fig. 11. Mapeo del extremo 5' del mRNA1 de *citP*. Calle 1. Extensión del primer realizada con el RNA total extraído de un cultivo en fase exponencial anillado a un oligonucleótido de 17 mer, complementario a la secuencia de DNA, desde el nucleótido 233 al 217, en la Fig. 9. Calles 10-13: Protección a nucleasa S1. El RNA total extraído de cultivos en fase exponencial fué hibridado con un fragmento de DNA de 233 pb (coordenadas 1-233 en Fig. 9.) a 37°C (calles 10 y 11), a 42°C (calles 12 y 13) y tratado con nucleasa S1 a una concentración de 50 (calles 10 y 12) o de 100 unidades ml⁻¹ (calles 11 y 13). La secuencia de DNA (calles 2-4 y 6-9, (A, C, G y T)) fué obtenida utilizando el mismo primer que se empleó para la extensión de primer. El promotor transcripcional P1 y el sitio de iniciación del mRNA1 se muestran en el pie de la figura. Una o dos flechas indican la posición de las bandas adicionales detectadas por extensión del primer o por los dos métodos.

Con el propósito de confirmar la existencia del terminador transcripcional adyacente al gen *citP* propuesto por David y cols. (1990), se procedió al mapeo por digestión con nucleasa S1 del extremo 3' del mRNA1 específico de dicho gen. Para ello se utilizó una sonda de 3181 pb que contiene el fragmento de DNA *BanI-EcoRI* del plásmido pCIT264 y que fue marcado radioactivamente en el extremo 3' previamente generado por digestión con *BanI* (coordenada 1279 del gen *citP*, según David y cols, 1990). La sonda contiene la

secuencia complementaria al terminador transcripcional propuesto y se preparó tal y como se indica en el apartado 12 del capítulo de Métodos. La sonda se hibridó con el RNA total extraído de un cultivo en fase exponencial de *L. lactis* biovar *diacetylactis* y los híbridos se trataron con endonucleasa S1. Se detectaron dos fragmentos protegidos de 186 y 187 nucleótidos (Fig. 12, calle 1). Así, el sitio de terminación del transcrito fue situado en las proximidades del extremo 3' de una estructura potencial del tipo "tallo-lazo". Esta estructura está localizada a 98 nucleótidos del codón UAA de terminación de la traducción del gen *citP* (Fig. 12). Estos resultados coinciden con los resultados obtenidos por hibridación mediante Northern blot (ver el apartado 2 de este capítulo de Resultados) y muestran que el mRNA1 tiene una longitud de 2914 nt, formando *citP* parte del operón *citQRP*.

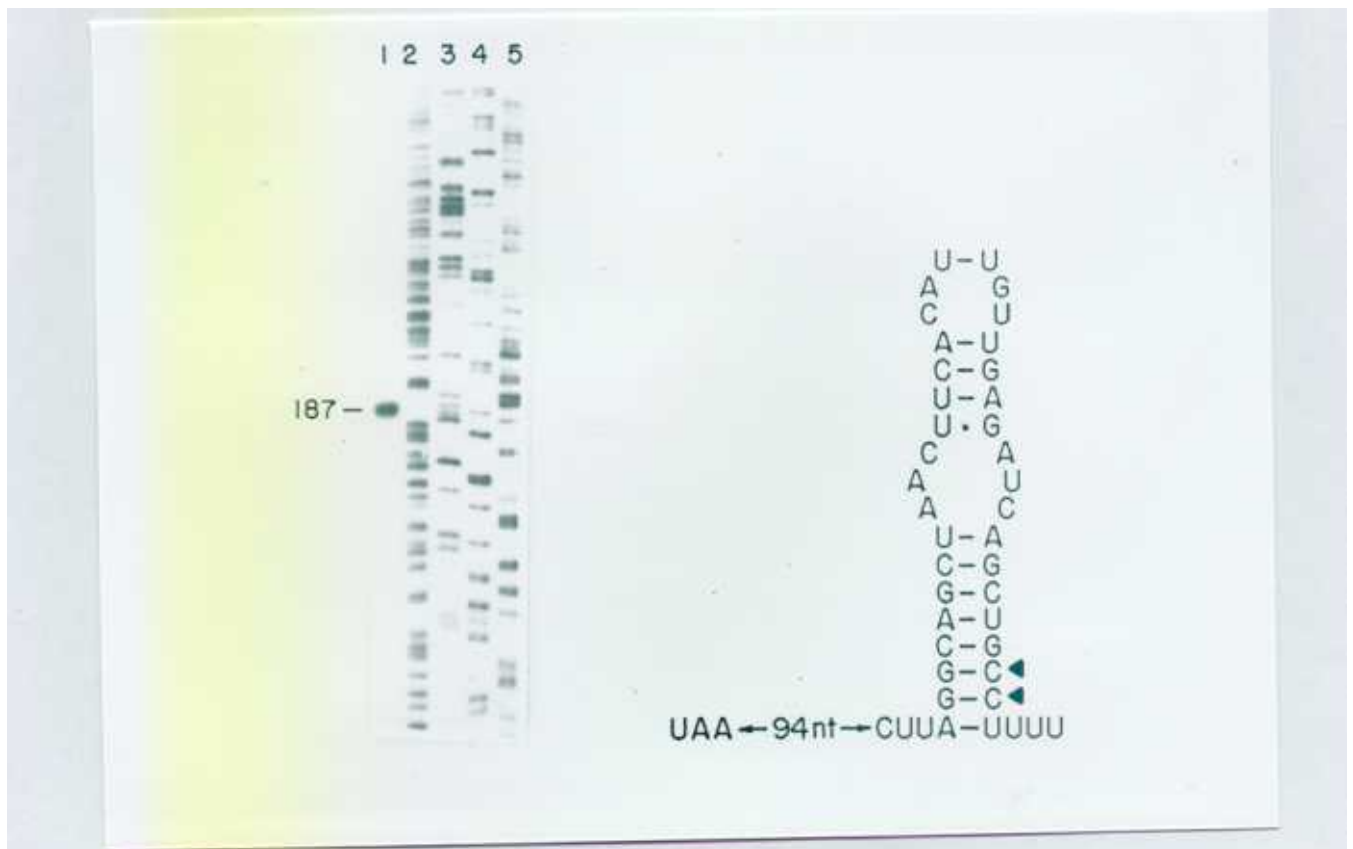


Fig. 12. Mapeo del extremo 3' del mRNA específico de *citP*, mediante protección a la digestión con endonucleasa S1. El fragmento de DNA de 3181 pb *BanI-EcoRI* del plásmido pCIT264 se hibridó al RNA total extraído de cultivos en fase exponencial (calle 1). El terminador transcripcional y los puntos finales del mRNA marcados por flechas, se muestran a la derecha de la figura. La secuencia de DNA (calles 2-5, (A, C, G y T)) utilizada como marcador de talla molecular procede de un fragmento de DNA no relacionado.

5. UTILIZACION DE LOS PROMOTORES TRANSCRIPCIONALES P1 Y P2 EN *L. lactis*

Con el objeto de determinar los niveles de expresión a nivel transcripcional de *citP*, a partir de P1 y P2 durante las distintas fases del crecimiento bacteriano, se procedió a la detección de sus transcritos específicos en estas fases. Para ello se obtuvieron RNAs a partir de cultivos de *L. lactis* biovar *diacetylactis* CRL264 crecidos hasta una absorbancia a 660 nm de 0,2, 0,4, 0,8 y 1,2. Los RNAs fueron fraccionados en geles de agarosa y posteriormente transferidos a membranas de nitrocelulosa. La detección de los mRNAs específicos de *citP* se efectuó por hibridación con la sonda 1 (Fig. 13).



Fig. 13. Detección de los transcritos de *citP* en diferentes fases del crecimiento bacteriano por hibridación mediante Northern blot. (a) Mapa físico del operón *citQRP* mostrando la sonda utilizada (sonda 1 en Fig. 7), así como la representación de los transcritos de *citP*. (b) Los RNAs totales fueron preparados a partir de cultivos de la estirpe CRL264 crecidos hasta una absorbancia a 660 nm de 0,2 (calle 1), 0,4 (calle 2), 0,8 (calle 3) y 1,2 (calle 4 y 5 (exposición de 6 y 72 horas respectivamente)) y posteriormente fraccionados, transferidos e hibridados con la sonda 1, según se describe en el apartado 10 del capítulo de Métodos.

Los resultados obtenidos muestran que durante todas las fase exponencial del crecimiento, se sintetiza mayoritariamente el mRNA1 (Fig. 13, calles 1, 2 y 3) y en menor cuantía el mRNA2. Sin embargo, en la fase estacionaria del crecimiento se detecta primordialmente el mRNA2 (Fig. 13, calle 5). Estos resultados indican que la expresión del operón *citQRP* se mantiene constante durante la fase exponencial del crecimiento y que los niveles de transcripción durante la fase estacionaria están reducidos.

Como control de las variaciones de síntesis de mRNA durante el crecimiento bacteriano se analizó, mediante Northern blot y con la misma sonda, el mRNA específico de *citP* sintetizado por la estirpe MG1363/pFL3 en las fases exponencial (0,4) y estacionaria (1,2) del crecimiento. El plásmido pFL3 contiene el gen *citP* bajo el control del promotor P_{polA} . Los resultados obtenidos (no mostrados) no reflejaron diferencias en la cantidad de transcritos específicos de *citP* sintetizados a partir de P_{polA} en las fases exponencial y estacionaria del crecimiento. Ello indica que la disminución de la síntesis de los transcritos específicos de *citP*, detectada en la estirpe CRL264 en la fase estacionaria del crecimiento, son debidas a una utilización diferencial de los promotores naturales P1 y P2 por la RNA polimerasa de *L. lactis* en la distintas fases del crecimiento y no a una deplección generalizada de la transcripción.

Los resultados mostrados en la Fig. 13 también indican que de las dos especies moleculares de mRNA a partir de las cuales se transcribe *citP*, mRNA1 se sintetiza primordialmente en las fases exponencial del crecimiento, mientras que mRNA2 se sintetiza en todas las fases del crecimiento bacteriano. Estos resultados podrían parecer contradictorios con los obtenidos al determinar el sitio de iniciación de los mRNAs (apartado 4 de este capítulo de Resultados). Sin embargo, resultan compatibles si se tiene en cuenta las diferencias existentes entre las dos técnicas utilizadas y entre las dos sondas empleadas. En el caso del mapeo con endonucleasa S1, durante la hibridación con la sonda *EcoRI-BglIII* debe existir una competición entre el mRNA1 y mRNA2, estando favorecida la hibridación para mRNA1 debido a su mayor longitud de complementariedad con la sonda. En el caso de la hibridación realizada mediante Northern blot, los mRNAs son separados físicamente antes de su hibridación con la sonda *BglIII-BamHI*. Además, ambos mRNAs presentan el mismo grado de complementariedad con la sonda. Por tanto, no existe ni competición, ni discriminación entre los dos tipos de mRNAs durante la hibridación. Así, puesto que en la fase exponencial

del crecimiento el transcrito mayoritario es mRNA1, su presencia podría impedir la detección de mRNA2 por mapeo con endonucleasa S1, detectándose este último por hibridación mediante Northern blot. Sin embargo, en la fase estacionaria los bajos niveles de mRNA1 son detectados por mapeo con endonucleasa S1 debido a la alta afinidad por la sonda, mientras que por hibridación mediante Northern blot sólo se detecta el mRNA2, que es aparentemente mayoritario en esta fase de crecimiento.

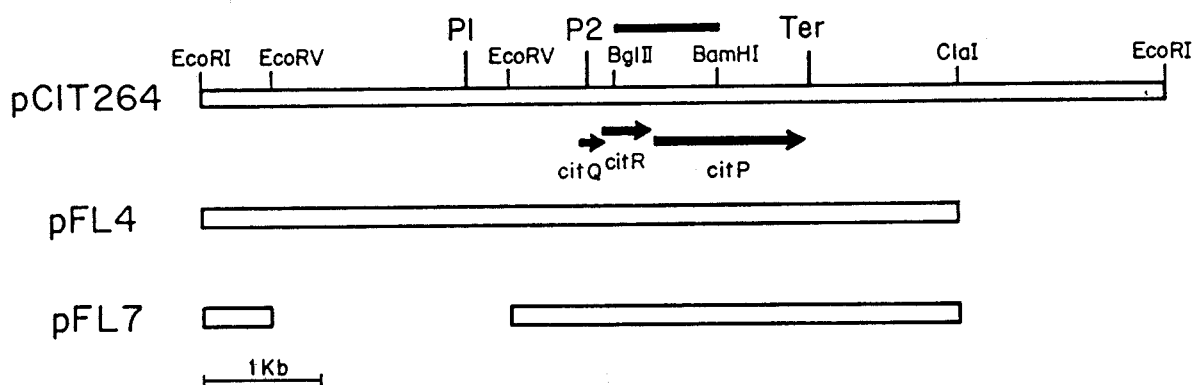


Fig. 14. Detección de los transcritos de las estirpes MG1363/pFL4 y MG1363/pFL7. En la parte superior se muestra el mapa físico de pCIT264 y del inserto lactocócico de sus derivados pFL4 y pFL7, así como la sonda utilizada. En la parte inferior se muestra el Northern blot de los RNAs totales que fueron preparados a partir de cultivos crecidos hasta una absorbancia a 660 nm de 0,4. Los RNAs fueron fraccionados, transferidos y finalmente hibridados con la sonda 1, según se describe en el apartado 10 del capítulo de Métodos. Calle 1: MG1363/pFL4. Calle 2: MG1363/pFL7.

La falta de detección, del inicio del mRNA2 en la fase exponencial de crecimiento, podría ser debida a las causas antes expuestas o a una carencia de utilización de P2 por la RNA polimerasa de *L.lactis* durante el crecimiento exponencial. Para discriminar entre estas dos hipótesis, se decidió analizar la expresión del gen *citP* en ausencia del promotor P1. Para realizar este estudio se procedió a la construcción del plásmido pFL7 por digestión de pFL4 con *EcoRV* y posterior recircularización del fragmento *EcoRV-EcoRV* de 8,5 kb. El plásmido pFL7 fue establecido en *S. pneumoniae* y posteriormente transferido a *L.lactis* MG1363. Este plásmido contiene el gen *citP*, únicamente bajo el control del promotor P2, ya que el promotor P1 se encuentra en el fragmento *EcoRV-EcoRV* de 2,0 kb presente en pFL4 y deletado en pFL7.

Los RNAs totales extraídos de cultivos en fase exponencial de *L. lactis* MG1363 conteniendo el plásmido pFL7, fueron analizados por hibridación mediante Northern blot con la sonda 1 (Fig. 14), que incluye los 206 primeros codones de *citP*.

Como era de esperar la estirpe portadora de pFL7 únicamente sintetiza el mRNA2 y no el mRNA1, confirmando la utilización de P2 en la fase exponencial del crecimiento bacteriano (Fig. 14, calle 2). Con esta misma sonda y por hibridación mediante Northern blot se analizaron los mRNAs específicos de *citP*, que produce *L.lactis* MG1363 conteniendo el plásmido pFL4 (Fig. 14, calle 1). Este plásmido recombinante, que lleva clonado el fragmento *EcoRI-ClaI* del plásmido pCIT264, codificó para los mismos transcritos (mRNA1 y mRNA2), que el plásmido parental pCIT264 presente en la estirpe CRL264 de *L. lactis* biovar *diacetylactis*. Este resultado muestra que los promotores P1 y P2 son utilizados por subespecies distintas de *L. lactis*.

6. PROCESAMIENTO DEL mRNA1 EN *L. lactis*

La observación de diferentes cantidades de mRNA1 y mRNA2 en varias preparaciones de RNA procedentes de cultivos bacterianos exponenciales de *L. lactis* conteniendo plásmidos Cit⁺ (Figs. 7, 13 y 14), sugerían la posibilidad de que el mRNA1 fuera procesado por ribonucleasas bacterianas, generando una especie molecular de tamaño similar al mRNA2 e indistinguible de éste en las hibridaciones realizadas mediante Northern blot.

Para contrastar esta hipótesis, se inspeccionó en primer lugar la secuencia situada

El programa predijo una estructura secundaria putativa compleja con una energía libre de $-31,2 \text{ Kcal mol}^{-1}$ (Fig. 15) situada detrás y a 19 nucleótidos del extremo 5' del mRNA2. (nucleótidos 1139 a 1227 en Fig. 9).

Con el objeto de comprobar si esta estructura actuaba como diana para ribonucleasas que originasen con su acción mRNAs procesados, se tomo ventaja del hecho de que la Rf sea un inhibidor específico de las RNA polimerasas bacterianas. La adición de este antibiótico a los cultivos y su posterior incubación permite analizar el destino de los mRNAs sintetizados por las células, previamente al tratamiento, en ausencia de síntesis *de novo* de mRNA. Así, un cultivo de *L. lactis* biovar *diacetylactis* CRL264 en fase exponencial del crecimiento fue tratado con Rf, a una concentración de $200 \mu\text{g ml}^{-1}$. Tras la adición de Rf a los tiempos indicados en la Fig. 16, se tomaron alícuotas y se extrajeron los mRNAs totales, según se indica en el apartado 8 del capítulo de Métodos. Para detectar las especies moleculares de RNA originadas como consecuencia del posible procesamiento, los RNAs totales se fraccionaron en geles de agarosa, se transfirieron y se hibridaron con las sondas 1 y 2, las cuales flanquean la estructura secundaria predicha (Fig. 16).

El mRNA1 fue detectado con ambas sondas (Fig. 16). Sin embargo, se observaron diferentes productos, generados aparentemente por procesamiento del mRNA1, dependiendo de la sonda utilizada. De esta forma con la sonda 1 se detectó un fragmento de RNA con un tamaño aproximado de 1000 nucleótidos, que podría corresponder a una especie molecular de mRNA comenzando en el extremo 5' del mRNA1 y terminando en la estructura secundaria. Con la sonda 2 se observó la acumulación de un mRNA de 1900 nucleótidos y su conversión con el tiempo en un fragmento de 1500 nucleótidos. El fragmento de 1900 nucleótidos podría ser explicado como un RNA que comenzara en la estructura secundaria y terminara en el extremo 3' del mRNA1. La observación de que el tamaño del fragmento mas pequeño detectado con la sonda 2 (1500 nucleótidos) coincidiera, aproximadamente con la longitud del gen *citP*, es sugerente. Este resultado podría indicar que después de un procesamiento inicial del mRNA1 en dos fragmentos, la región 5' del fragmento de 1900 nucleótidos, que contiene el gen *citR* truncado, sería susceptible a degradación por ribonucleasas. Sin embargo, la región 3' de dicho fragmento, que contiene el gen *citP*, podría tener una vida media mas larga, debido a la protección que suministran los ribosomas al traducir dicho gen.

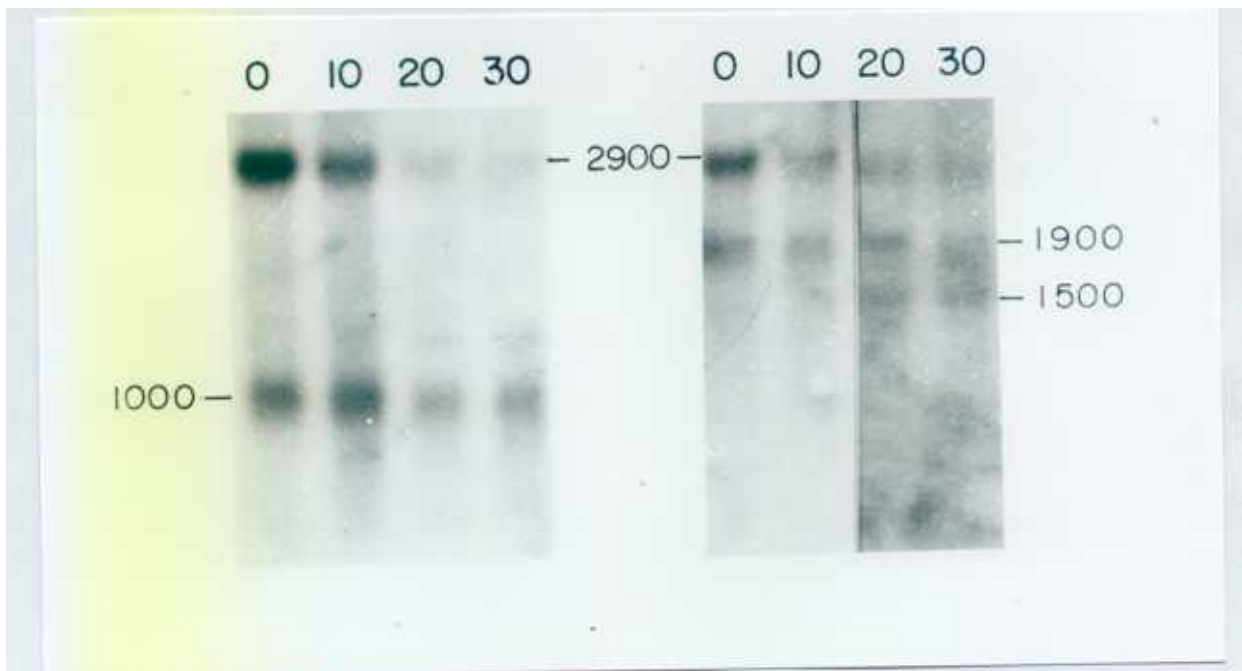
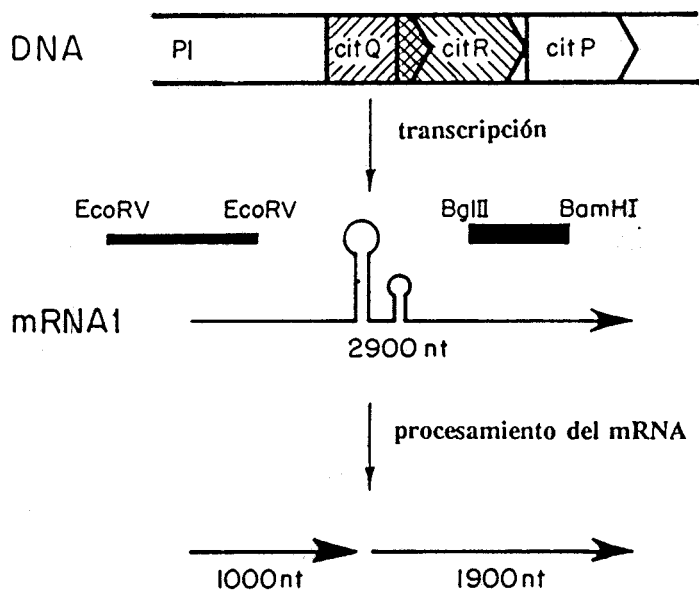


Fig. 16. Detección del procesamiento del mRNA1 de *citP*. Parte superior. Representación diagramática de la síntesis y el procesamiento del mRNA1. Parte inferior. Análisis de los mRNAs de *citP* y de su estabilidad mediante Northern blot. Cultivos en crecimiento exponencial de la estirpe CRL264 se trataron con Rf a tiempo 0. El RNA total se preparó a los tiempos indicados (en minutos) y posteriormente fueron fraccionados como se indica en el apartado 10 del capítulo de Métodos. Los ácidos nucleicos se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se hibridaron con la sonda 2 (*EcoRV-EcoRV*), localizada upstream de *citP* (Panel izdo.), o con la sonda 1 (*BglII-BamHI*) que incluye la región 5' terminal del gen *citP* (Panel dcho.).

7. REGULACION POST-TRANSCRIPCIONAL DE LA EXPRESION DEL GEN *CITP* POR EL PRODUCTO DEL GEN *CITR* EN *L. lactis*

Los experimentos mostrados en el apartado 1 de este capítulo demostraban que el gen *citR* no se requiere para el transporte de citrato en *L. lactis*. Como consecuencia el producto génico CitR, no está directamente implicado en el transporte de citrato. Estos resultados indujeron a suponer que CitR podría tener un papel regulador en la expresión de *citP*.

Con el objeto de comprobar esta hipótesis, se analizó la influencia de CitR sobre la expresión de *citP* a nivel transcripcional y post-transcripcional. Para ello se construyó una fusión génica *cat-citP*, usando el gen, que codifica la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) procedente del plásmido pC194 como indicador o "reporter". Con esta fusión y utilizando diferentes situaciones génicas, era posible cuantificar el efecto que *citR* pudiera tener sobre la expresión de *citP*, por las variaciones observadas en los niveles de actividad cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) presentes en extractos crudos de cultivos bacterianos, según se indica en el apartado 15 del capítulo de Métodos.

Debido a la inexistencia de vectores para llevar a cabo fusiones traduccionales en *L. lactis*, el primer paso para la obtención de la fusión *cat-citP* fue la previa construcción de un vector, que tomando como indicador el gen *cat*, sirviera para fusionar con éste, *citP* u otros genes.

El nuevo vector para fusiones traduccionales, denominado pFL10, se construyó clonando el fragmento de 1.1 kb *MboI* del plásmido pJS3 (Ballester y cols., 1986 y Fig. 17), que incluye el gen *cat* de pC194, en la diana *BamHI* del sitio de multiclonado del fagémido pALTER-1 (Promega) (Fig. 17), para dar lugar al plásmido recombinante pFAL6 (Fig. 17). Sobre el plásmido recombinante pFAL6 y mediante mutagénesis dirigida, tal y como se indica en el apartado 14 del capítulo de Métodos se introdujo un sitio *EcoRI* solapando con la G del codón ATG de iniciación de la traducción del gen *cat* (Hironouchi y Weisblum, 1982) utilizando el oligonucleótido mutagénico 5´-TATCAAATGAATTCCTTTAATAAAA-3´ para dar lugar al plásmido recombinante pFAL7. El gen *cat* mutado se liberó de pFAL7 mediante digestión *EcoRI-HindIII* y se clonó en el plásmido vector pLS1 por sustitución de su fragmento *EcoRI-HindIII* para dar lugar al plásmido pFL10 (Fig. 17).

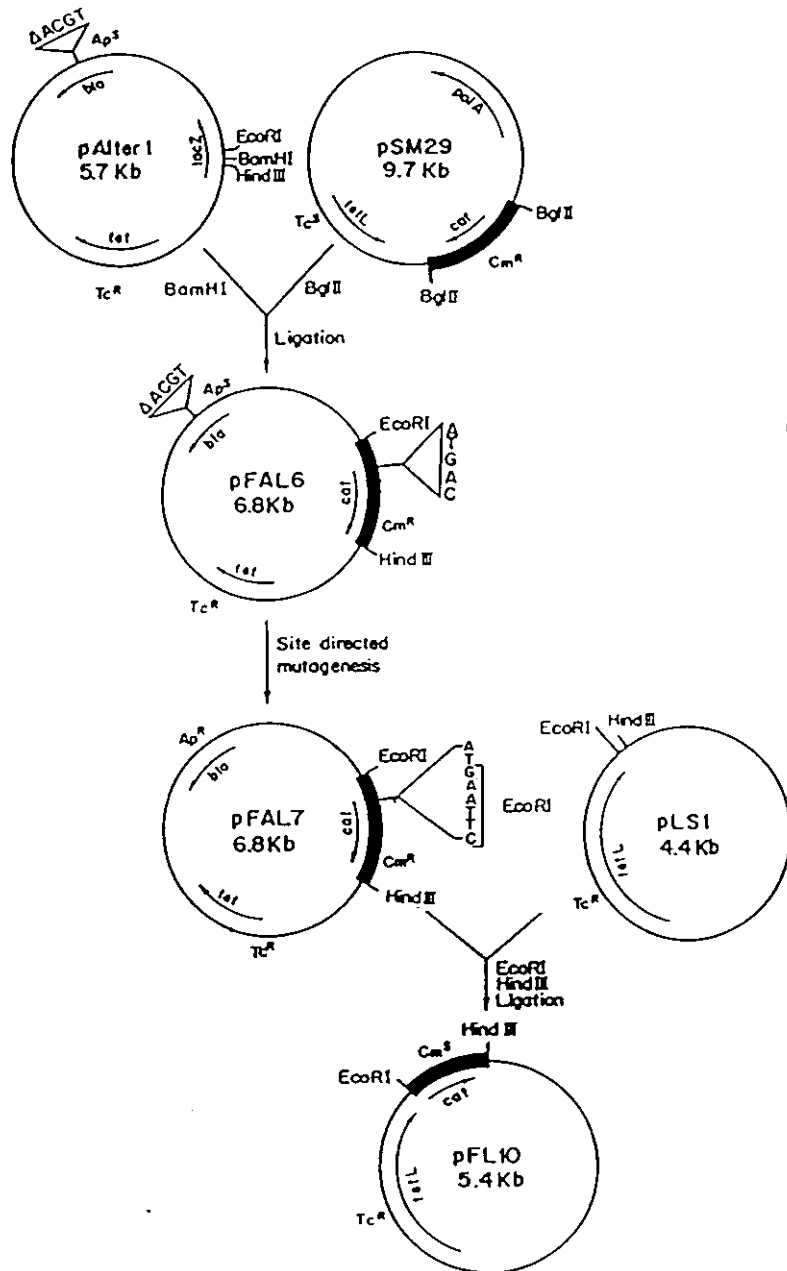


Fig. 17. Esquema diagramático de la construcción del plásmido pFL10. Abreviaturas: *bla*, gen que codifica para la β -lactamasa; *cat*, gen que codifica para CAT (representado por el segmento negro); *tet-L*, gen que codifica para la proteína que confiere resistencia a tetraciclina.

Para construir la fusión entre *citP* y el gen *cat* y siguiendo la misma estrategia que se describe en el párrafo anterior, se introdujo un sitio *EcoRI* en el codón de iniciación del gen *citP* dando lugar al plásmido recombinante pFAL4 (Fig. 18). En este caso la mutagénesis dirigida se realizó sobre el fragmento *EcoRI-ClaI* de pCIT264 previamente clonado en el fagémido vector pALTER-1 (pFAL1), usando el oligonucleótido mutagénico 5'-ATGCGGGTGAATTCATCAT-3'. La región precedente al gen *citP* y que incluye sus señales transcripcionales y traduccionales fue liberada de pFAL4 por digestión con *EcoRI* y subclonada en el sitio único *EcoRI* de pFL10 para dar lugar al plásmido recombinante pFL12 (Fig. 18). Este plásmido contiene el gen *cat* mutado bajo el control de las señales transcripcionales y traduccionales del gen *citP* y codifica para una cloranfenicol acetil transferasa con un aminoácido extra Ser₃. pFL12 fue establecido en *S. pneumoniae* y posteriormente transferido por electroporación a *L. lactis*.

Para examinar la influencia que pudiera tener el polipéptido CitR sobre la expresión de *citP* se construyó el plásmido pFI20. Para ello los oligonucleótidos siguientes: 5'-TTTAAACCATGGCGACAACAAAAA-3' y 5'-AAAGGATCCTGTCTTATATTCCTA-3' fueron sintetizados mediante PCR y posteriormente utilizados para amplificar un segmento de DNA incluyendo el gen *citR* desde el codón de iniciación hasta el codón de terminación de dicho gen (coordenadas 1212 a 1546 en Fig. 9). Para facilitar la clonación del fragmento amplificado en el vector de expresión pET11d, ambos oligonucleótidos fueron sintetizados de manera que el producto de 334 pb contenía el sitio *NcoI* solapando con el codón de iniciación de la traducción de *citR* y el sitio *BamHI* "downstream" de este gen. A continuación el producto obtenido por PCR fue clonado entre los sitios *NcoI* y *BamHI* de pET11d, dando lugar al plásmido pCM6 (Fig. 19). Posteriormente, *citR* fué situado bajo el control del promotor *polA* de *S. pneumoniae*. Para ello, pCM6 fue linearizado por digestión con *XbaI* y después de rellenar los extremos recesivos, fue ligado con el fragmento *BglIII-NheI* de 1,1 kb, previamente tratado con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa de *E. coli* para generar extremos romos. El plásmido resultante, denominado pCM7 (Fig. 19), fue digerido con *EcoRV* para liberar un fragmento de DNA que contenía el gen *citR* bajo el control del promotor *polA*. Dicho fragmento fue clonado en el sitio único *BamHI* del vector de bacterias gram positivas, pIL253 (Fig. 19) para dar lugar al plásmido pFI20. Este plásmido fue inicialmente establecido en *B. subtilis* y posteriormente transferido por electroporación a *L. lactis* MG1363 conteniendo pFL12.

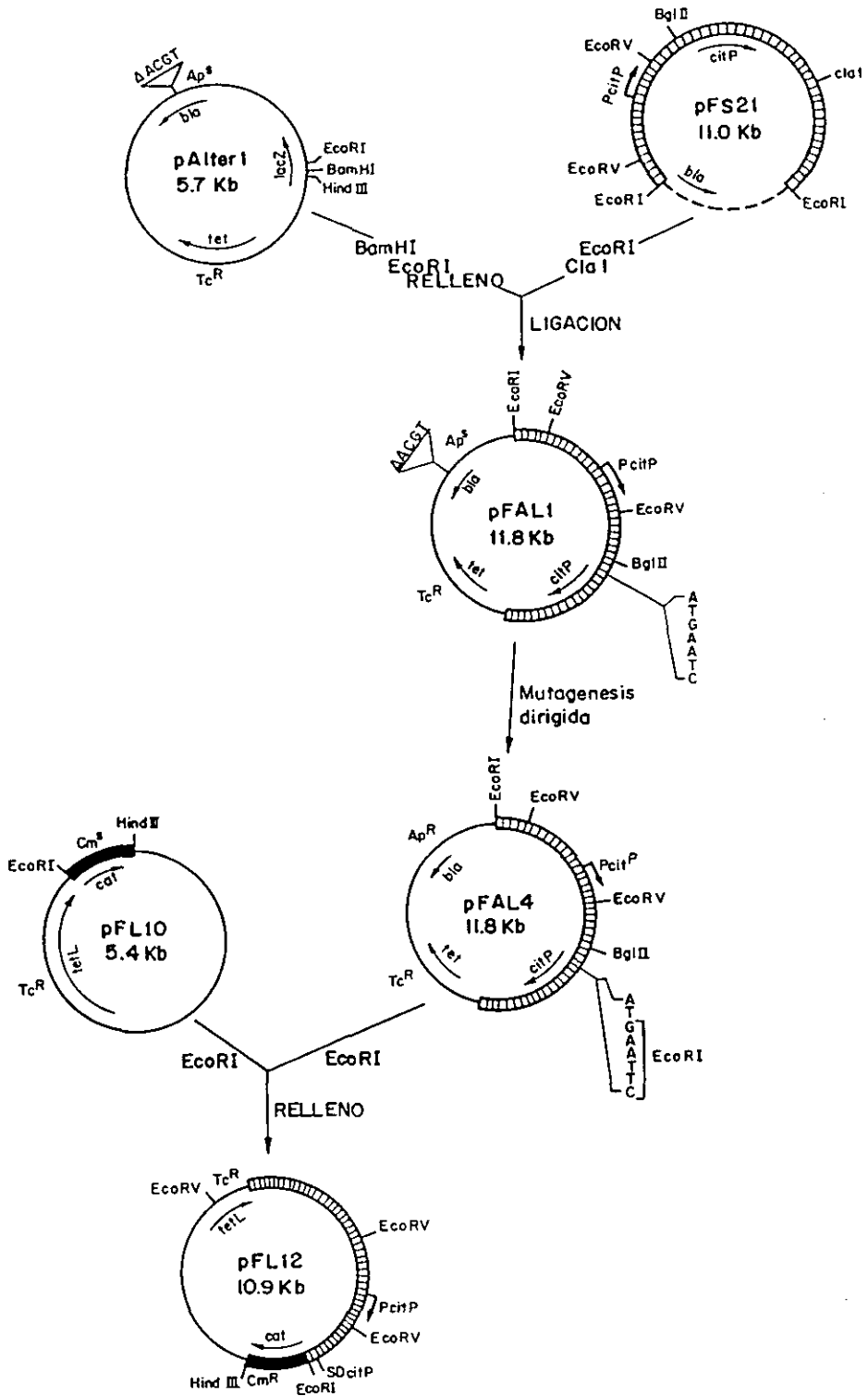


Fig. 18. Esquema diagramático de la construcción del plásmido pFL12. Abreviaturas: *bla*, gen que codifica para la β -lactamasa; *cat*, gen que codifica para CAT; *tet-L*, gen que codifica para la proteína que confiere resistencia a tetraciclina; *citP*, gen que codifica para CitP. Los segmentos representan lo siguiente: negro, gen que codifica para CAT; rayado, plásmido lactocócico pCIT264.

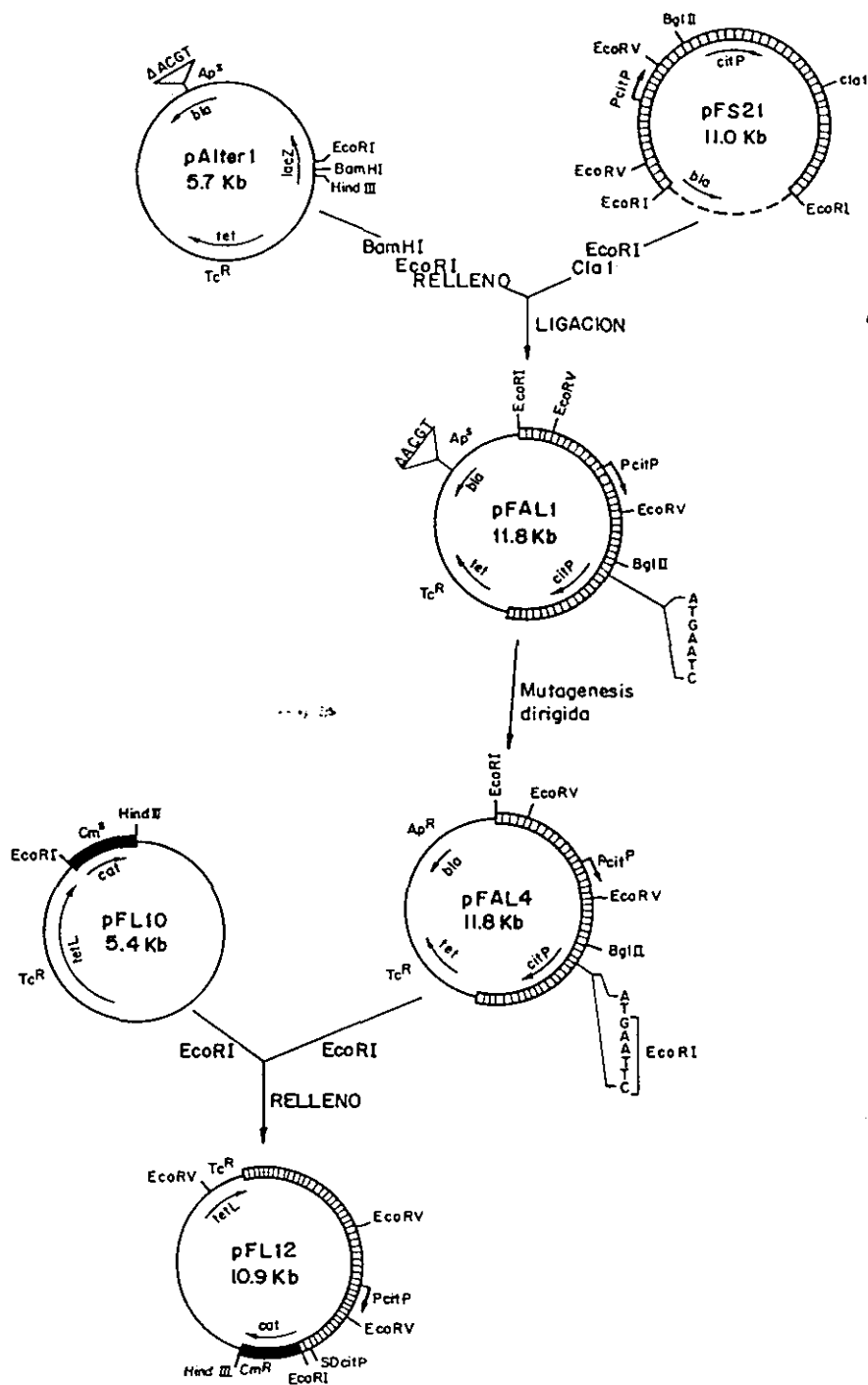


Fig. 19. Esquema diagramático de la construcción del plásmido pFL12. Abreviaturas: *bla*, gen que codifica para la β -lactamasa; *cat*, CAT; *tet^L*, gen que codifica para la proteína que confiere resistencia a tetraciclina; *citP*, gen que codifica CitP; *lacZ*, gen que codifica para la β -galactosidasa; MLS, sitio de multiclonado del plásmido vector pL253. Los segmentos representan lo siguiente: negro, gen que codifica para CAT; rayado, plásmido lactocócico pCIT264.

Las actividades CAT de los extractos crudos de estirpes de *L. lactis* MG1363 que contenían bien pFL12 o bien pFL12 corresidiendo con pFI20 (Fig. 20), fueron determinadas según se indica en el apartado 15 del capítulo de Métodos. La sobreexpresión de CitR (codificado por pFI20) en la estirpe de *L. lactis* MG1363 pFL12/pFI20 provocó un descenso de cuatro veces en la actividad CAT codificada por el plásmido pFL12 respecto a la estirpe *L. lactis* MG1363 pFL12 (Fig. 20). Este resultado revela un efecto inhibitorio en trans, a nivel transcripcional, de CitR sobre la síntesis de CitP.

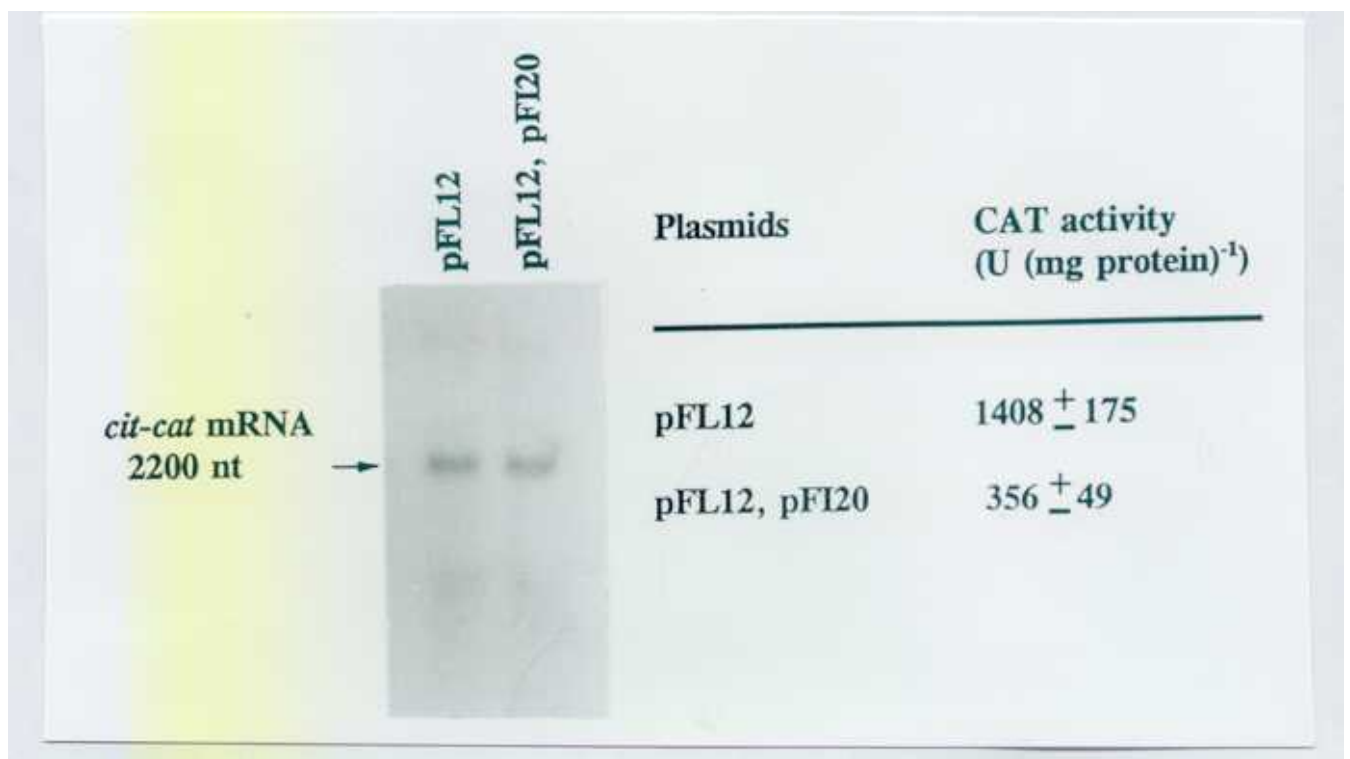


Fig. 20. Influencia de CitR en la expresión de la fusión *citP-cat*. Izquierda. Northern blot de estirpes de *L. lactis* MG1363 portadoras de los plásmidos indicados. Las estirpes se crecieron en medio M17 hasta una absorbancia de 0,4 a 660 nm. El RNA total de cada uno de estos cultivos fué preparado y fraccionado según se indica en el apartado 10 del capítulo de Métodos. Los ácidos nucleicos se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se hibridaron con una sonda que incluye el gen *cat* del plásmido pC194. Derecha. Actividad de la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) procedente de fusiones traduccionales *cat-citP*. Estirpes de *L. lactis* MG1363 portadoras de los plásmidos indicados se crecieron hasta una absorbancia de 0,4 a 660 nm y las actividades CAT se determinaron a partir de los extractos crudos de estas estirpes como se indica en el apartado 15 del capítulo de Métodos. Cada valor representado corresponde a la media de al menos tres experimentos independientes. La desviación estandar observada entre las distintas determinaciones aparece indicada.

Con el fin de descartar que las diferencias observadas se debieran a una mayor utilización de los promotores P1 y/o P2 y por lo tanto a un aumento en la cantidad de los mRNAs correspondientes, se analizaron los RNAs totales procedentes de cultivos de *L. lactis* MG1363 conteniendo pFL12 ó pFL12 y pFI20. El análisis de estos RNAs se realizó por hibridación mediante Northern blot, utilizando una sonda que contenía el gen *cat* clonado en el fagémido pALTER. Los resultados de este experimento muestran (Fig. 20) que no hay diferencia en la cantidad de mRNAs específicos sintetizados a partir de P1 y de P2 por una u otra estirpe. Por tanto, el efecto de CitR sobre la síntesis de CitP se ejerce a nivel post-transcripcional.

Para analizar la influencia de *citR* en *cis* sobre la expresión de CitP se construyó el plásmido pFL13 (Fig. 21). Este plásmido se generó interrumpiendo el gen *citR* en el plásmido mediante digestión con *Bgl*III, relleno de los extremos protuberantes generados y recircularización del DNA resultante mediante ligación. Así el plásmido pFL13, contiene una adición de 4 nt que cambia el marco de lectura de *citR* y da lugar a un polipéptido truncado de 65 aa y 7584 Da. Los extractos preparados a partir de estirpes de *L. lactis* MG1363/pFL13 mostraron una actividad CAT dos veces inferior a los extraídos de *L. lactis* MG1363/pFL12 (Tabla IV versus Fig. 20). El análisis de los mRNAs específicos *citP-cat* extraídos de estirpes de *L. lactis* conteniendo bien pFL12 o bien pFL13, no mostraron diferencias significativas entre ambas estirpes (resultados no mostrados). Estos resultados indican un acoplamiento de la traducción de *citR* y *citP*, la cual provoca un incremento en la síntesis de CitP. Sin embargo, la presencia de pFI20 (CitR suplementado en *trans*) no afectó a la actividad CAT codificada por pFL13 (Tabla IV), lo que sugiere que la represión ejercida por CitR suplementado en *trans*, sobre *citP* requiere un acoplamiento de la traducción de *citR* y *citP*.

Con el objeto de examinar con mas detalle esta hipótesis, se construyeron los plásmidos pFL14 y pFL15 (Fig. 21). Para construir el plásmido pFL14, se digirió el plásmido pFI20 con *Bgl*III y el fragmento de 1341 nucleótidos que contiene el promotor *polA* y un tercio del extremo 5' del gen *citR* fué purificado. Este fragmento fué ligado al fragmento de 972 nucleótidos *Bgl*III-*Bam*HI de pFL12 que incluye los dos tercios del extremo 3' del gen *citR* y la fusión génica *citP-cat*. La mezcla de ligación fué digerida con *Hind*III y después de rellenar los extremos protuberantes, las moléculas de DNA resultante se ligaron al vector pLS1 previamente digerido con *Eco*RI y sus extremos cohesivos rellenados. El

plásmido resultante, pFL14, contiene el gen *citR* y la fusión génica *citP-cat* bajo el control del promotor *polA*, careciendo de los promotores específicos de *citP* (P1 y P2) y del sitio putativo para el procesamiento de mRNA adyacente al gen *citR*. El plásmido pFL15 se construyó interrumpiendo el gen *citR* en pFL14, mediante digestión con *Bgl*II, rellenando los extremos cohesivos generados y recircularizando el DNA resultante mediante ligación.

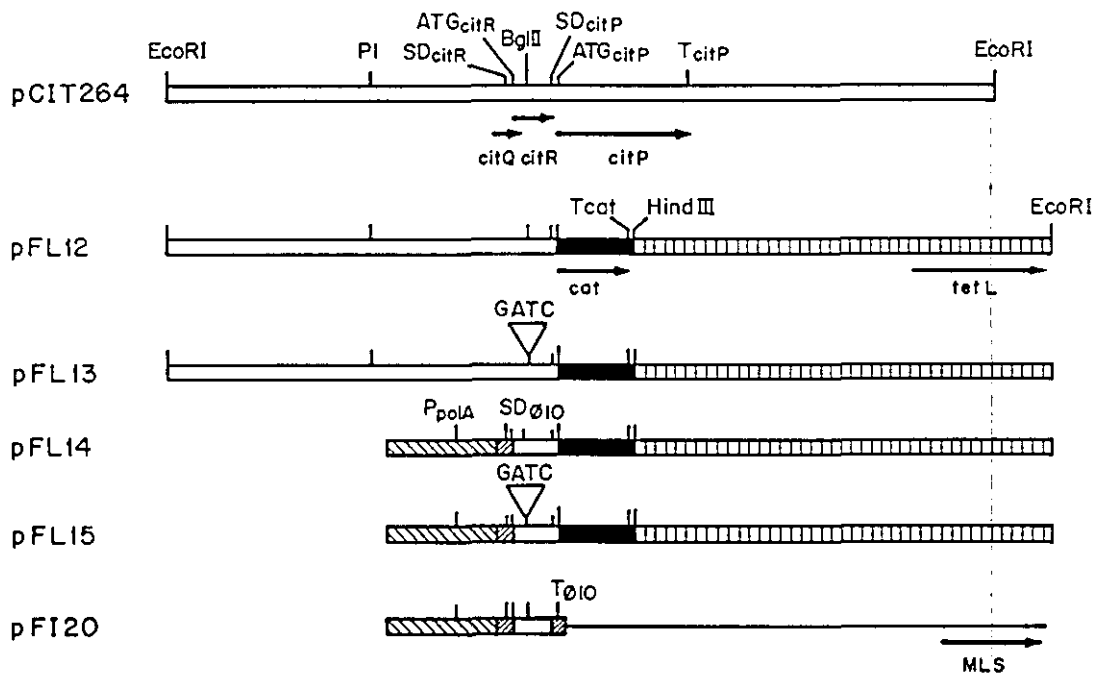


Fig. 21. Mapa físico de pCIT264 y sus derivados. Los genes se transcriben en la dirección indicada por las flechas. La mutación presente en los plásmidos pFL13 y pFL15 está indicada. Las posiciones de la secuencia Shine-Dalgarno (SD) y los codones de inicio de la traducción (ATG) de *citR* y *citP* están indicados. Abreviaturas: P1, promotor *cit*; P_{polA} , promotor *polA*; T_{citP} , terminador transcripcional de *cit*; T_{cat} , terminador transcripcional *cat*. Los segmentos representan lo siguiente: abiertos, regiones del plásmido lactocócico pCIT264; negro, gen *cat* de pC194; rayado vertical, plásmido pLS1; rayado hacia la izquierda, inserto neumocócico; rayado hacia la derecha, regiones de DNA del plásmido pET11d incluyendo la secuencia Shine-Dalgarno ($SD_{ø10}$) o el terminador transcripcional ($T_{ø10}$) del gen 10 del bacteriófago T7. Línea simple, plásmido pIL253. Sólo se representan los sitios de restricción relevantes

La comparación entre las actividades CAT presentes en los extractos procedentes de las estirpes de *L. lactis* MG1363/pFL14 y *L. lactis* MG1363/pFL15, reveló una disminución de dos veces en la actividad CAT de la que portaba pFL15 respecto a la que portaba pFL14. Estos resultados revelan y apoyan la hipótesis de que la traducción de *citR* ejerce un efecto en *cis* sobre la síntesis de CitP independientemente del promotor usado. A diferencia de los resultados obtenidos con pFL12, no se observó un efecto de CitR sobre la actividad CAT codificada por pFL14 cuando se añadió en *trans* esta proteína (codificada por pFI20). Este resultado indica que el sitio de unión de CitR en el mRNA no está localizado en la región codificante de CitR.

Tabla IV. Actividad CAT generada por las fusiones traduccionales *citP-cat*.

Plasmidos	Actividad CAT ^a (U (mg proteína) ⁻¹)
pFL10	< 1
pFL13	665 ⁺³⁷
pFL13, pFI20	661 ⁺⁵⁵
pFL14	759 ⁺⁵⁰
pFL14, pFI20	716 ⁺⁴³
pFL15	383 ⁺¹²

a. *L. lactis* MG1363 portando los plasmidos indicados eran crecidos hasta una absorbancia de 0,4 a 660 nm, y las actividades CAT eran determinadas como se describe en el apartado 15 del capítulo de Métodos. Cada dato representa la media de al menos tres determinaciones independientes.

8. EXPRESION DEL GEN *CITP* DE *L. lactis* biovar diacetylactis EN *E. coli*

Los resultados obtenidos por Sesma y cols. (1990) y David y cols. (1990) demostraban que el gen *citP* se expresa en *E. coli*. Sin embargo, David y cols. sólo consiguieron la expresión del gen en una sola orientación respecto al vector, infiriendo que las señales transcripcionales naturales de *citP* no eran funcionales en el huésped heterólogo.

Con el fin de comprobar si las señales transcripcionales del gen *citP* utilizadas en su huésped original *L. lactis*, eran requeridas para la expresión funcional de dicho gen en *E. coli*, se construyeron los plásmidos pCM5 y pFE51 (Fig. 22). Estos plásmidos son derivados de pFS21 (Sesma y cols, 1990 y Fig. 22), híbrido compuesto de pCIT264 y pUC18, que confiere a *E. coli* la capacidad de incorporar citrato (Fig. 22). El plásmido pCM5 carece del fragmento *EcoRV-EcoRV* de 2,0 kb de pFS21, en el cual está incluido el promotor P1. Por otra parte, el plásmido pFE51 contiene el fragmento *BglII-EcoRI* de 4,7 kb de pFS21, clonado entre los sitios de restricción *BamHI* y *EcoRI* del vector de expresión pET5 (Studier y cols, 1989). Así, en el plásmido recombinante el gen *citP* está localizado próximo al promotor transcripcional del gen $\phi 10$ del bacteriófago T7 y en orientación correcta respecto a éste. Este promotor es únicamente utilizado por la RNA polimerasa del bacteriófago T7 y no es reconocido por los factores sigma de la RNA polimerasa de *E. coli*. El plásmido pCM5 confirió a *E. coli* la capacidad de transportar citrato (Fig. 22), indicando que el promotor P1 no es requerido para la expresión funcional de la citrato permeasa P en este huésped. Paralelamente el plásmido pFE51 era incapaz de conferir el fenotipo Cit⁺ a *E. coli* DH5- α , indicando que la región *EcoRV-BglII*, en la cual está incluido el promotor P2, era esencial para la expresión funcional del gen *citP* en este huésped. Con el fin de comprobar esta hipótesis, se introdujo el plásmido pFE51 en la estirpe BL21(DE3) de *E. coli*, la cual posee lisogenizado en su cromosoma el gen que codifica para la RNA polimerasa del fago T7. Como se esperaba, la estirpe resultante adquirió la capacidad para transportar citrato, presumiblemente debido a la utilización del promotor $\phi 10$ por la RNA polimerasa de T7.

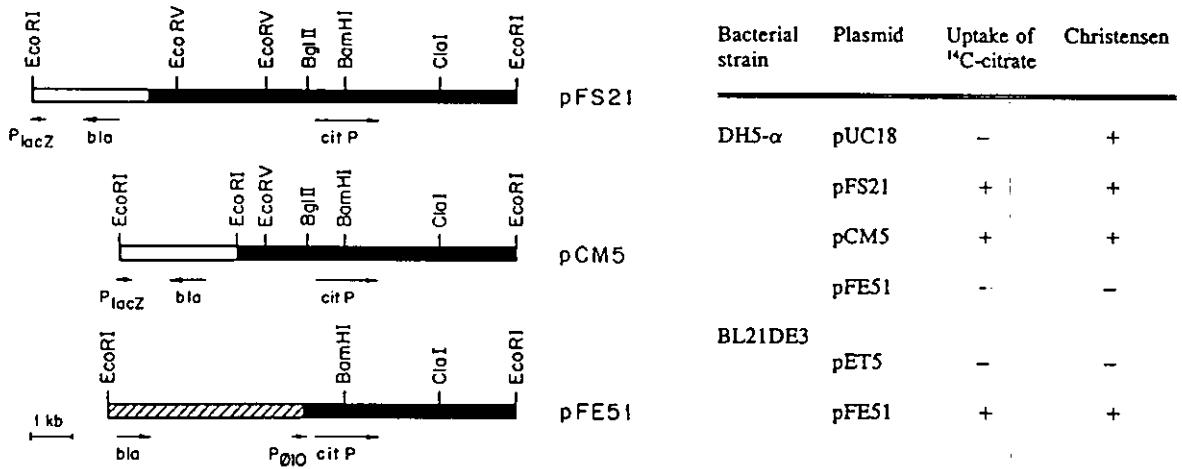


Fig. 22. Mapa físico de los plásmidos pFS21, pCM5 y pFE51 y Transporte de citrato en diferentes estirpes de *E. coli* que portan uno de estos plásmidos. Los genes se transcriben en la dirección indicada por la flecha. Abreviaturas: P_{lacZ}, promotor del gen *lacZ*; P_{φ10}, promotor del gen φ10; *bla*, gen que codifica para la β-lactamasa. A la derecha se muestra la capacidad de las estirpes de *E. coli* DH5-α y BL21(DE3) potadoras de los plásmidos indicados, para transportar citrato. El transporte de citrato se midió según se describe en el apartado 16 del capítulo de Métodos. La cantidad de radioactividad incorporada en células citrato-positivas (+) variaba entre 1500 y 7000 cpm, mientras que en las citrato negativas (-) era menor de 1000 cpm. La utilización de citrato en medio de Christensen por las estirpes indicadas fué positiva (+), cuando se visualizó la producción de color rojo en el medio; -, representa reacción negativa.

Con el objeto de detectar el patrón transcripcional del gen *citP* de *L. lactis* biovar *diacetylactis* en el huésped heterólogo *E. coli*, se extrajo el RNA total de las estirpes de *E. coli* DH5-α/pFS21 y los RNAs fueron fraccionados en geles de agarosa y posteriormente transferidos a membranas de nitrocelulosa. La detección de los mRNAs específicos de *citP* en *E. coli* se efectuó por hibridación con la sonda 1 descritas en el apartado 2 de este capítulo de Resultados. Los resultados, recogidos en la Fig. 23, muestran, a diferencia con *L. lactis* biovar *diacetylactis*, un único transcrito de 1900 nucleótidos, que coincide aproximadamente en tamaño con el mRNA2 sintetizado en el huésped original y cuya síntesis parecía lógico suponer que se iniciara mediante la utilización del promotor P2 por la RNA polimerasa de

E. coli. Por otra parte, la ausencia del transcrito de 2900 nucleótidos indicaba que P1 no es funcional en *E. coli* y confirmaban la dispensabilidad de este promotor P1 para la expresión de *citP* en este huésped (Fig. 23, calle 1).

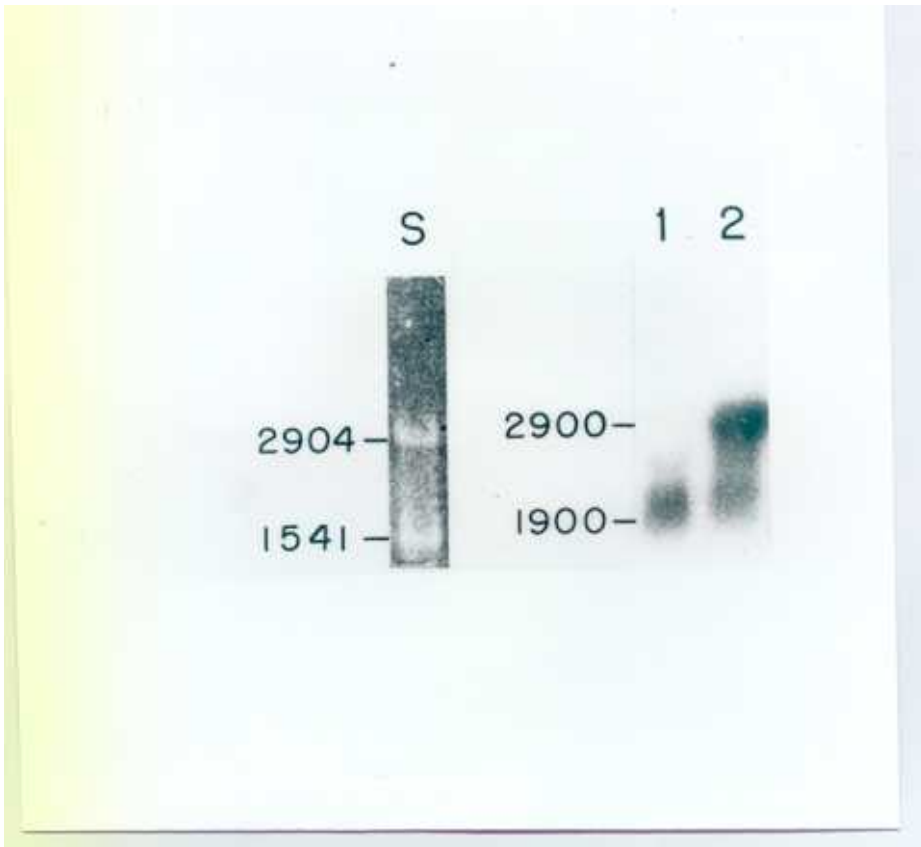


Fig. 23. Detección del transcrito específico de *citP* sintetizado en *E. coli* DH5- α /pFS21. Los RNAs totales fueron preparados y fraccionados según se describe en el apartado 10 del capítulo de Métodos. Los ácidos nucleicos se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se hibridaron con la sonda 1 (mostrada en Fig. 7). *E. coli* DH5- α /pFS21 (calle 1) fué crecido en medio LB. *L. lactis* biovar diacetylactis CRL264 (calle 2) fué crecido en medio M17.

Para comprobar si el único transcrito específico de *citP* detectado en *E. coli* se sintetizaba o no a partir del promotor P2 caracterizado en su huésped original, se procedió a determinar el extremo 5' de este transcrito mediante mapeo con endonucleasa S1. Para este propósito se utilizó la misma sonda y el mismo procedimiento que los utilizados para mapear los extremos 5' del mRNA1 y el mRNA2 en *L. lactis* y que están descritos en el apartado 4 de este capítulo de Resultados. Los resultados, recogidos en la Fig. 23, confirman la

La existencia de un terminador transcripcional se determinó mediante mapeo por digestión con nucleasa S1 del extremo 3' de los mRNA específico del gen *citP* sintetizado en *E. coli*. Para este propósito se utilizó la misma sonda y el mismo procedimiento que los utilizados para mapear los extremos 3' de los mRNAs específicos de *citP* en *L. lactis* y que están descritos en el apartado 4 de este capítulo de Resultados. Se detectaron dos fragmentos protegidos de 182 y 183 nt (Fig. 25, calle 1). Así, al igual que en *L. lactis* (Fig. 12), el sitio de terminación del transcrito fué situado en las proximidades del terminador ρ -independiente.

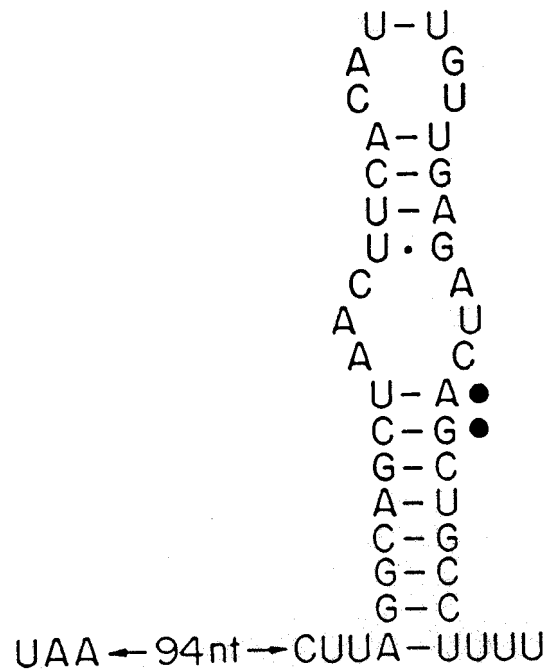


Fig. 25. Mapeo del extremo 3' del mRNA específico de *citP*, mediante protección a la digestión con nucleasa S1 en *E. coli*. El fragmento de DNA de 3181 pb *BanI-EcoRI* del plásmido pCIT264 se hibridó al RNA total extraído de cultivos en fase exponencial (Calle 1). El terminador transcripcional y los sitios de terminación del mRNA marcados por puntos, se muestran a la derecha de la figura. La secuencia de DNA (calles 2-5 (A, C G y T)) utilizada como marcador procede de un fragmento de DNA no relacionado.

Los resultados descritos en este apartado demuestran que en *E. coli* el gen *citP* se expresa a partir de una secuencia promotora P2' (no funcional en *L. lactis*) generando un transcrito de 1983 nt.

9. INFLUENCIA DEL pH SOBRE LA EXPRESIÓN DEL GEN *CITP*

La citrato permeasa P de *L. lactis* biovar *diacetylactis* presenta actividad detectable dentro de un estrecho rango de pH entre 5,0 y 6,0 (Harvey y Collins, 1961) y resultados no mostrados). Asimismo, *L. lactis* muestra su óptimo para metabolizar citrato dentro de este rango de pH (Starrenburg y Hugenholtz, 1991). Estos hechos sugerían que alteraciones del pH podrían, además de regular la actividad de CitP, controlar los niveles de expresión génica.

Con el objeto de observar cual era el efecto del pH del medio de cultivo sobre la expresión del gen *citP* a nivel transcripcional, se analizaron los RNAs totales procedentes de cultivos de estirpes de *L. lactis* biovar *diacetylactis* CRL264 crecidos a pH 7,0 ó a pH 5,5.

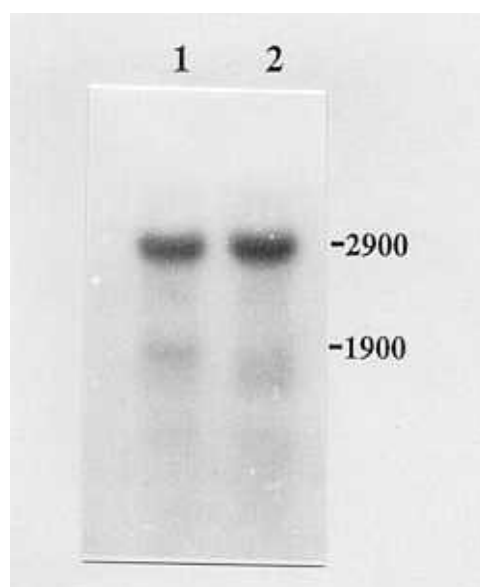


Fig. 26. Influencia del pH del medio de cultivo sobre la transcripción del gen *citP*. Estirpes de *L. lactis* biovar *diacetylactis* CRL264 se crecieron en M17 a pH 5,5 (calle 1) o a pH 7 (calle 2). El RNA total de cada uno de estos cultivos fué preparado y fraccionado según se indica en el apartado 10 del capítulo de Métodos. Los ácidos nucleicos se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se hibridaron con la sonda 1 (mostrada en Fig. 7).

El análisis de los mRNAs específicos del gen *citP* sintetizados a estos pHs y a partir de sus promotores naturales (P1 y P2), se efectuó por hibridación mediante Northern. La sonda utilizada fué la sonda 1, descrita en el apartado 2 de este capítulo de Resultados. La cantidad de los mRNA1 y mRNA2 (Fig. 26) sintetizados a pH 7,0 (calle 1) ó a pH 5,5 (calle 2) fue similar. La cuantificación se realizó utilizando el sistema PhosphorImager (Molecular Dynamics). Consiguientemente, estos resultados muestran que a pH 5,5, el cual está dentro del rango de pH óptimo para el funcionamiento de la citrato permeasa, no se observa una elevación de la transcripción del operón *citQRP*.

Para comprobar si el pH del medio de cultivo influía o no sobre la expresión del gen *citP* a nivel traduccional, se compararon las actividades CAT presentes en extractos de la estirpe de *L. lactis* MG1363 que contenía el plásmido pFL12, crecida a pH 7,0 ó a pH 5,5. Previamente, se analizó el mRNA específico de la fusión *citP-cat* por hibridación mediante Northern blot y se comprobó que la variación de pH no afectaba a la transcripción de *citP* en dicha estirpe (resultados no mostrados). Consiguientemente, las posibles diferencias detectadas entre las actividades CAT medidas en extractos que provienen de células portadoras de pFL12, crecidas a pH 5,5 o a pH 7,0, reflejarían una síntesis diferencial de la citrato permeasa a ambos pHs, debido a que en pFL12, el gen CAT está bajo el control de las señales transcripcionales y traduccionales del gen *citP*.

Los resultados aparecen recogidos en la Fig. 27. Los extractos preparados a partir de cultivos de *L. lactis* MG1363/pFL12 crecidos a un pH de 5,5 mostraron, consistentemente, una actividad CAT tres veces superior a aquellos preparados a partir de la misma estirpe crecida a pH 7,0 (Fig. 27). Estos resultados muestran un incremento de la síntesis del producto de la fusión *citP-cat* o una alteración del enzima CAT a pH 5,5, que conllevara a una mayor actividad. Para discernir entre estas dos posibilidades se utilizó el plásmido pFI1 (ver detalles de su construcción en el apartado 11 de este capítulo de Resultados), que contiene el gen *cat* natural de pC194. La estirpe *L. lactis* MG1363/pFI1 mostró los mismos niveles de actividad CAT a pH 7,0 y 5,5, indicando que no existe una alteración intrínseca del enzima determinada por la variación del pH. Así, parece que a pH de 5,5, se produce una estimulación de la eficiencia de traducción del gen de la citrato permeasa P. Finalmente, se comprobó que los niveles de actividad CAT codificados por pFL12 a pH 5,5 eran susceptibles a la inhibición ejercida *in trans* por CitR (pFI20) (Fig. 27), siendo este efecto inhibitorio asimilable al previamente detectado a pH 7,0 (Fig. 20). Para descartar que la inhibición

ejercida en *trans* por CitR a pH 5,5 fuera debida a una variación en la transcripción del operón *citQRP*, se analizaron los mRNAs específicos del gen *citP* por hibridación mediante Dot blot. La sonda utilizada fué la sonda descrita en el apartado 7 de este capítulo de Resultados y que incluye el gen *cat*. Como se esperaba los resultados no muestran ninguna variación significativa en la transcripción del operón *citQRP* en presencia o no de CitR a este pH (Fig. 27).

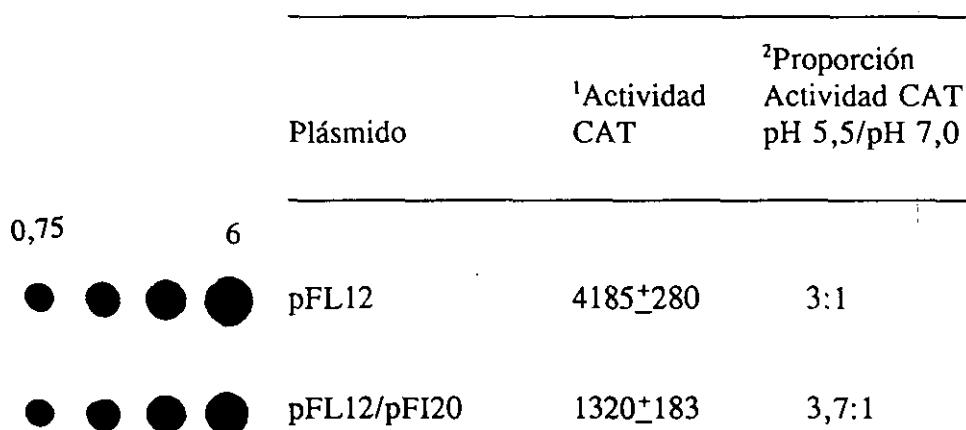


Fig. 27. Influencia del pH del medio de cultivo sobre la expresión génica de las fusiones traduccionales *cat-citP*. Estirpes de *L. lactis* MG1363 portadoras de los plásmidos indicados se crecieron en M17 a pH 5,5 hasta una absorbancia de 0,4 a 660 nm, y se analizó, mediante Dot blot (capítulo 9 de Métodos), su concentración en mRNA *citP-cat* (izda.) y su actividad CAT. Cantidades crecientes (0,75, 1,5, 3 y 6 μ g) del RNA total de cada uno de estos cultivos fué analizado mediante Dot blot con la sonda que incluye el gen *cat* (ver texto), tal y como se indica en el apartado 9 del capítulo de Metodos.

¹Estirpes de *L. lactis* MG1363 portadoras de los plásmidos indicados se crecieron a pH 5,5 y las actividades CAT se determinaron a partir de los extractos crudos de estas estirpes como se indica en el apartado 15 del capítulo de Métodos.

²Los datos de actividad CAT a pH 7,0 están recogidos en la Fig. 20.

10. EL CITRATO NO ES UN EFECTOR DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *citP*

A partir de los trabajos previos realizados por otros autores no se había podido clarificar si el transporte de citrato en *L. lactis* biovar *diacetylactis* es un proceso inducible o constitutivo. Así, mientras que Harvey y Collins (1961) comunicaban que el transporte de

citrato era inducido por la presencia de citrato en el medio de cultivo, Smith y cols. (1992) deducían que el consumo de citrato en *L. lactis* biovar *diacetylactis* era un proceso independiente de la presencia de este metabolito durante el crecimiento bacteriano.

Para comprobar como influía la presencia de citrato en el medio de cultivo (M17) sobre la expresión del gen *citP* a nivel transcripcional, se analizaron los RNAs totales procedentes de cultivos de estirpes de *L. lactis* biovar *diacetylactis* CRL264 crecidas en presencia o en ausencia de citrato. El análisis de los mRNAs específicos de *citP* sintetizados en presencia o en ausencia de citrato en el medio de cultivo y a partir de sus promotores naturales (P1 y P2) se efectuó por hibridación mediante Northern blot, utilizando la sonda 1 descrita en el apartado 2 de este capítulo de Resultados. Los resultados muestran que no existen diferencias significativas al comparar las cantidades relativas de mRNAs específicos de *citP*, sintetizadas por los dos cultivos bacterianos (Fig. 28). Estos resultados muestran que la transcripción del gen *citP* no es afectada por la presencia citrato en el medio de cultivo y por lo tanto que estos mRNAs se sintetizan constitutivamente en *L. lactis* biovar *diacetylactis*.

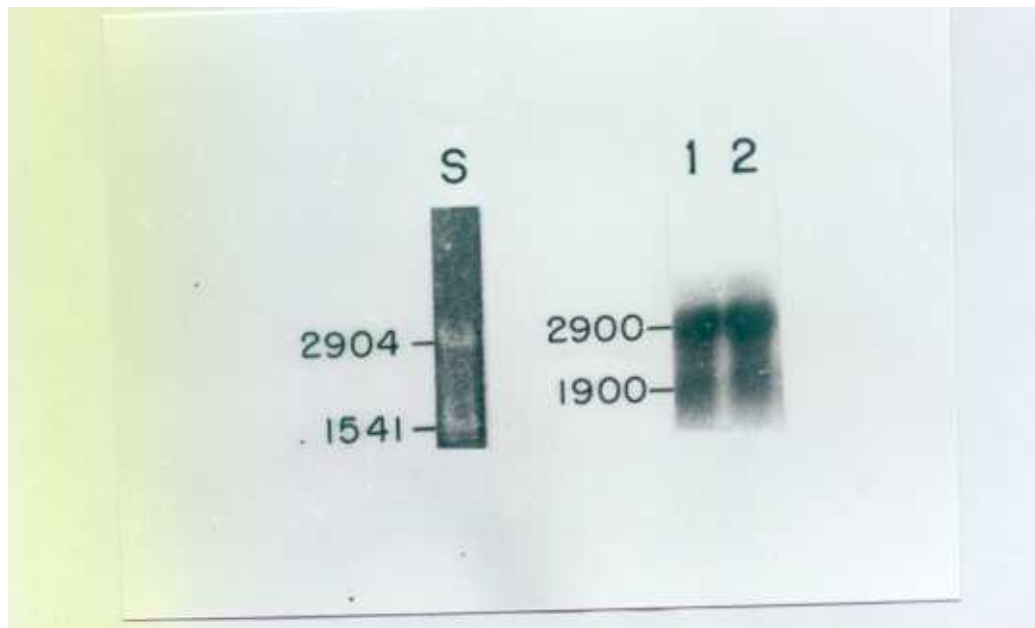


Fig. 28. Influencia del citrato en el medio de cultivo sobre la expresión del gen *citP*. Izquierda. Northern blot de estirpes de *L. lactis* biovar *diacetylactis* CRL264. La estirpe se creció en medio M17 (calle 1), o en medio M17 suplementado con citrato al 1% (calle 2). El RNA total de cada uno de estos cultivos fué preparado y fraccionado según se indica en el apartado 10 del capítulo de Métodos. Los ácidos nucleicos se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se hibridaron con la sonda 1 (mostrada en Fig. 7).

Con el objeto de comprobar si la presencia de citrato ejercía un efecto sobre la expresión del gen *citP* a nivel post-transcripcional, se determinaron los niveles de transporte de citrato de la estirpe **CRL264** crecida en presencia o en ausencia de citrato. La estirpe **CRL264** acumuló citrato en la misma proporción, independientemente de que el medio de cultivo estuviera o no suplementado con citrato (datos no mostrados). Estos resultados muestran que el transporte de citrato en *L. lactis* biovar *diacetylactis* es un proceso no regulado por la presencia de citrato en el medio de cultivo.

11. ANALISIS DE LA REGION QUE PRECEDE AL GEN *citQ* EN EL PLASMIDO pCIT264

Al inspeccionar la secuencia de nucleótidos que precede al gen *citP*, y como ya se indicó en el apartado 3 de este capítulo de Resultados, se observó un marco de lectura abierto, denominado ORF1, compuesta por 296 codones, que podría codificar para un polipéptido de aproximadamente 33675 Da, flanqueado por dos repeticiones inversas de 17 nucleótidos. Este marco de lectura abierto está localizado entre el promotor P1 y el gen *citQ* en la hebra complementaria a la hebra codificante del operón *citQRP*, y por lo tanto debería transcribirse en sentido opuesto a los genes *cit*. El polipéptido codificado por ORF1 podría estar implicado en el transporte de citrato. Sin embargo, el producto de ORF1 no es necesario para el transporte de citrato en *L. lactis* biovar *diacetylactis* tal y como se deduce del apartado 1 de este capítulo de Resultados, donde se muestra que *citP* es el único gen presente en el plásmido pCIT264, que es requerido para el transporte de citrato en su huésped original, *L. lactis*. No obstante, para comprobar si el producto génico de ORF1 tenía o no efecto sobre los niveles de incorporación de citrato en *L. lactis*, se construyó el plásmido pFI1. Este plásmido contiene el fragmento *EcoRI-BglIII* de pCIT264 clonado en el sitio único *SmaI* del vector de bacterias gram positivas pIL253. Este vector está presente en un número de 15 copias por célula en *L. lactis* (dato obtenido en esta Tesis). El plásmido pFI1 fue transferido por electroporación a células de *L. lactis* MG1363 que contenían el plásmido pFL3, el cual codifica para el gen *citP* (ver Fig. 5). Posteriormente se comparó el transporte de citrato en estirpes de *L. lactis* MG1363 en las que coresidían ambos plásmidos y en las que sólo portaban pFL3. No se observaron diferencias en los niveles de incorporación de citrato entre ambas estirpes (datos no mostrados), y por lo tanto estos resultados indican que la proteína

de 37 kDa no está implicada en dicho proceso en *L. lactis*. Una búsqueda en el banco de datos NBRF reveló la existencia de homología de ORF1 con dos ORFs (ORFA y ORFB) que solapan entre si y que están incluidas en un elemento de inserción (IS) putativo localizado "upstream" del gen *glgC* de *Bacillus stearothermophilus* (Fig. 29). De los 108 aminoácidos contenidos en el segmento amino terminal de ORFA, el 27% eran idénticos y otro 24 % similar a los 107 primeros aminoácidos del producto codificado por ORF1. La región carboxilo terminal de ORF1 muestra un 35 % de identidad y un 16 % de similaridad a los 185 aminoácidos de ORFB.

```

ORFA: 1 MQEHFHFTDRAKIQKQYAAIFVFVSAQL-SCIQVHLH-RRNRHLVKQEDAVIIAIIHLLGKL-LGFTSRAWHRFVTGNLF
ORF1:      1 MTYNSTLPKVFVYLLTTIETLYQTSVPLEVQNRKNVHLATS-DCLVIACYLWGVLFHSETLKAKHQ-LAQSLF

ORFA:  TNVSFLERSRYNRRCRALGFAIKWIAVVSKT 108
ORF1:  PN--FLEYSRFVRRCNALLPSIQVIRQALVFKEVEGMSVSIIDSFPPIPLCQPIRNFPSKVLGDYANVGYNATKGQYFYG
ORFB:      1 AKRGQHAYAVVDSLELPLCHTARMHRVKRFQEIADIGYCASKKQWYYG

ORF1:  CKCHALVSESGYVIDYITPASMADRSMTEEVLSQFGTPTVLGDMGYLGQSLHDRL-ELKGIDIMTEVVRKNMKQK-KIL
ORFB:  LKLHLQVTDQGLPMGYVVEASCHDRIAAESVMTQIPHPYNFQDKGFI SRDLQKRLVEEYQMALWTPSRKNQKHRASEA

ORF1:  FPN-FSKRRKVIERVFSFL-TNLGAERCKSRSPQGFQKLEMILLAYSLLKSAKSLEPETLRSIGYQVMAK 296
ORFB:  WEKWIQQKRKVIETVFSVLVDHYRITGIRANSIIGFEVALDGILLAYSIVTLGLVER 185

```

Fig. 29. Comparación de la ORF1 del plásmido lactocócico pCIT264 con la ORFA y ORFB de *Bacillus stearothermophilus*. Los números indican las posiciones en la secuencia de la proteína. Se muestran ORF1, ORFB completos y los 108 aminoácidos del extremo amino terminal de ORFA. Están sombreados los residuos aminoacídicos idénticos. ., indica los residuos aminoacídicos similares.

Otro hecho destacable es que ORFA y ORFB están incluidas en un fragmento de DNA de 968 nucleótidos flanqueado por dos repeticiones inversas de 14 nucleótidos las cuales son

muy similares a las dos repeticiones inversas de 17 nucleótidos que flanquean el fragmento de DNA de 967 nucleótidos en el cual está incluido ORF1 (Fig. 30). Estos datos sugieren fuertemente que la región de DNA situada entre el promotor P1 y el inicio de *citQ* es un elemento de inserción (IS) relacionado evolutivamente con aquel presente en *Bacillus stearothermophilus*.

Una búsqueda de homología entre la secuencia de DNA del elemento de 1 kb presente en pCIT264 y la secuencia de DNA de los plásmidos lactocócicos presentes en el banco de datos de EMBL, mostró que varios fragmentos del elemento IS-putativo de pCIT264 estaban presentes en los plásmidos pSK11L, pTN20 y pPN40 (Fig. 31).

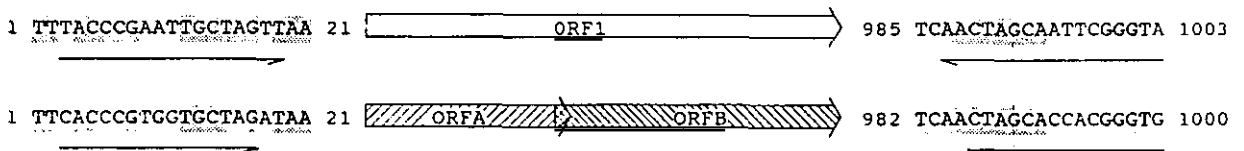


Fig. 30. Elementos putativos de inserción (IS) del plásmido lactocócico pCIT264 y de la región situada "upstream" del gen *glgC* de *Bacillus stearothermophilus*. La longitud y dirección de las repeticiones invertidas que flanquean los elementos putativos de inserción (IS) se indican con flechas. Los nucleótidos idénticos presentes en ambos elementos putativos están sombreados. La localización y la dirección de la transcripción de las ORFs dentro de los elementos putativos de inserción están indicados.

Un fragmento de 263 nucleótidos (coordenadas 431 a 666 en Fig. 9) del elemento IS de pCIT264 tiene una identidad del 99 % con una región que comienza en el extremo 3' del gen de resistencia a infección por fagos (*abiC*) presente en el plásmido pTN20 (Durmaz y cols., 1992). El plásmido pPN40 contiene una región de 192 nucleótidos que muestra una identidad del 98 % con el margen izquierdo del elemento IS de pCIT264 (coordenadas 111 a 302 en Fig. 9). Este fragmento de 192 nucleótidos precede al gen de resistencia a nisina (*nsr*) en el plásmido pPN40 (Froshet y McKay, 1991). 69 nucleótidos localizados en el margen izquierdo del elemento de pCIT264, aparecen también en posición invertida en el plásmido necesario para la utilización de la lactosa, pSK11L.

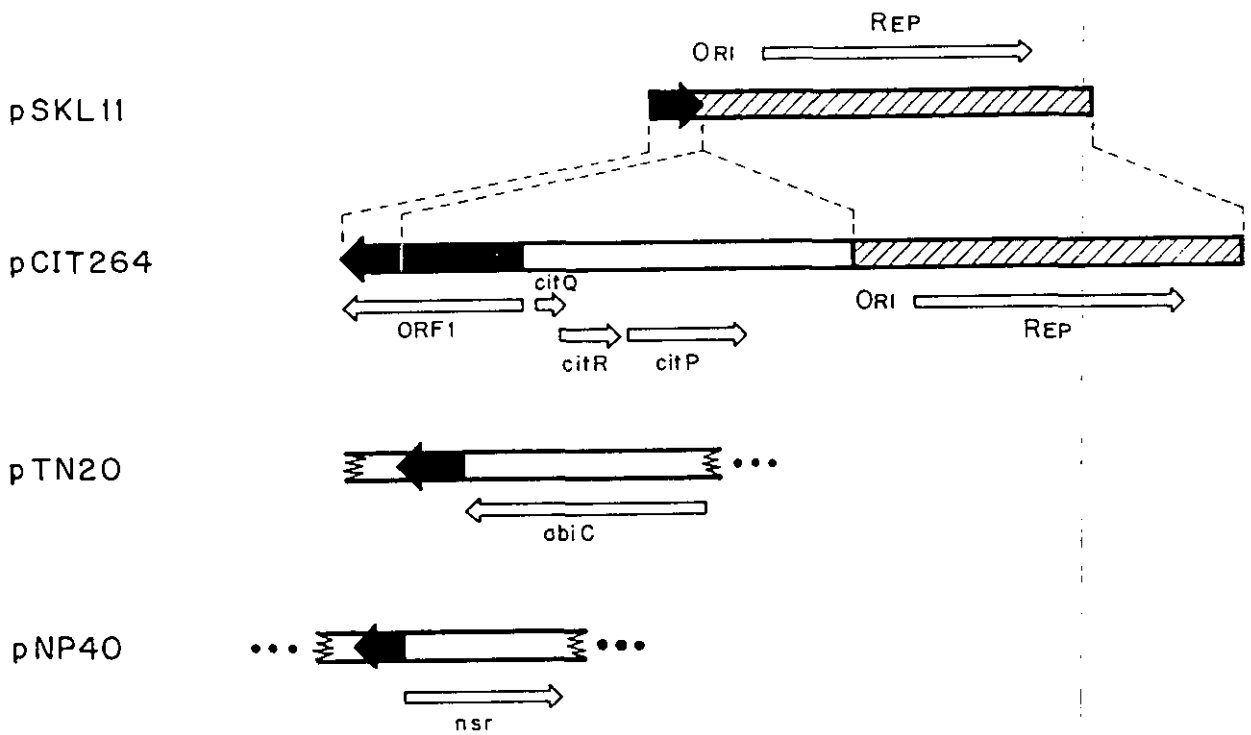


Fig. 31. Comparación esquemática de plásmidos lactocócicos. Símbolos: los segmentos sombreados indican la polaridad de regiones homólogas de elementos putativos de inserción (IS) en estos plásmidos lactocócicos; los segmentos verticales indican regiones de replicación homólogas; ..., indican que la secuencia de DNA es desconocida.

Esta identidad podría ser mayor, ya que en el momento actual no se ha determinado toda la secuencia de nucleótidos del pSKL11 y por lo tanto no se ha podido establecer mediante comparación de secuencia la extensión de la región de homología. Además ambos plásmidos, pSK11L y pCIT264, deben de proceder de un plásmido ancestral común, ya que comparten un 50 % de homología en sus regiones de replicación.

Estos datos siguen apoyando la teoría postulada anteriormente en la que se propone que la secuencia "lider" presente en el mRNA1 ha sido generada por introducción de un elemento IS entre el promotor P1 y el inicio del gen *citQ*, posiblemente por un evento de transposición. De esta manera la introducción del elemento IS habría creado el promotor P2, a partir del cual comienza la transcripción del mRNA2 (apartado 4 de este capítulo de Resultados). Asimismo, el elemento IS podría haber creado un promotor putativo denominado P3, responsable de la transcripción de ORF1. El promotor putativo P3 está solapando con el promotor P2 pero en la hebra complementaria, de tal forma que la región -35 de P3 estaría situada entre la región -35 y la región -10 de P2 (ver Fig. 9).

Para comprobar si el promotor P3 creado por la posible inserción del elemento IS de pCIT264, era o no funcional en *L. lactis* biovar *diacetylactis* CRL264, se procedió a la determinación del inicio del mRNA3 específico de ORF1 (detectado por hibridación de Northern, resultados no mostrados) por la técnica de extensión del "primer" tal y como se indica en el apartado 11 del capítulo de Métodos. El oligonucleótido que se utilizó en la reacción de extensión fué el siguiente: 5'-GCTATTATAAGTCATATAAG-3'. La secuencia de este oligonucleótido es complementaria al mRNA3 de ORF1 desde el nucleótido 1002 al nucleótido 1021 en la Fig. 9. Esta técnica mostró que el extremo 5' del mRNA3 está localizado en el nucleótido 1079 (A). Este sitio de iniciación de la transcripción correspondería a la utilización del promotor P3 (Fig. 32). Este promotor posee una región -35 TTGATA y una región -10 TAGTTA separadas por 16 nucleótidos. Estos resultados muestran la funcionalidad del promotor P3 en *L. lactis* e indican la expresión de la ORF1 en dicho huésped.

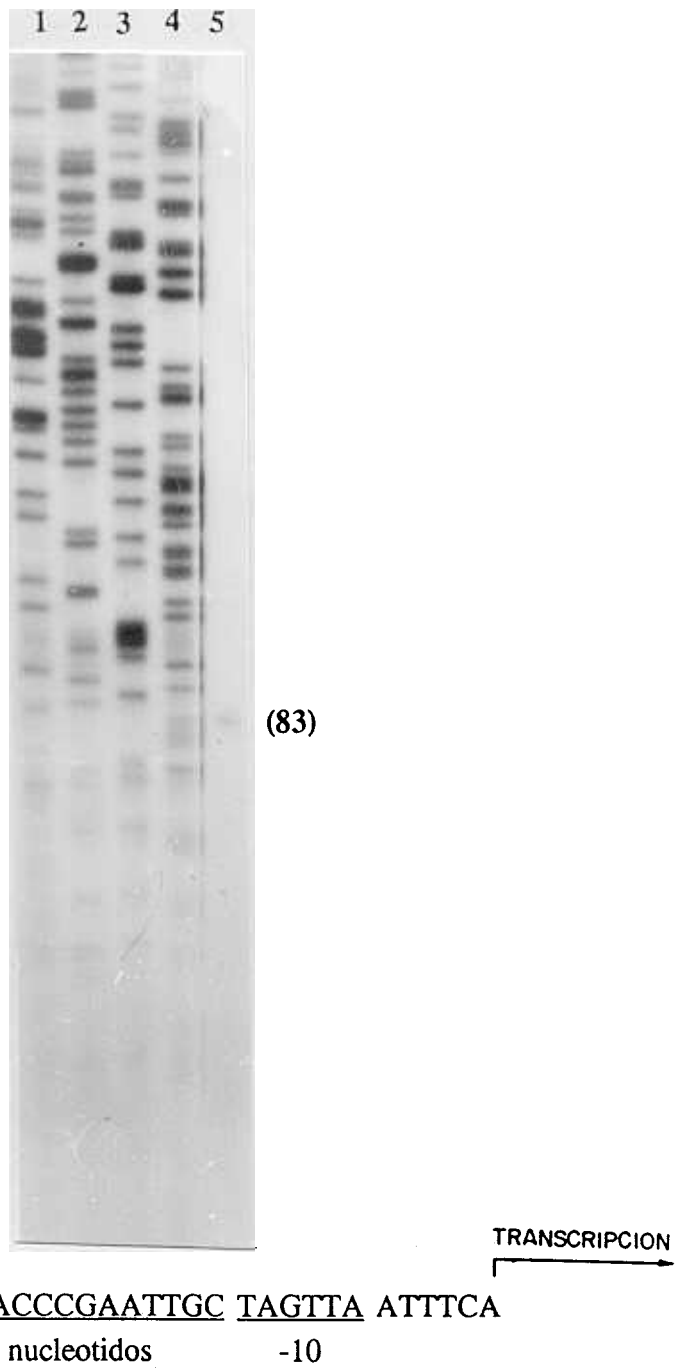


Fig. 32. Mapeo del extremo 5' del mRNA3 específico de ORF1. Calle 5: Extensión del primer realizada con el RNA total extraído de un cultivo en fase exponencial de *L. lactis* biovar diacetylactis CRL264 fué anillado a un oligonucleótido de 20 bases que es complementario al mRNA3 desde el nucleótido 1002 al 1021 en la Fig. 9. El promotor transcripcional P3 y el sitio de iniciación del mRNA3 se muestran en el pie de la figura. La secuencia de DNA (calles 1-4, (A, C, G y T)), utilizada como marcador de talla molecular procede de un fragmento de DNA no relacionado.

ORGANIZACION GENICA DEL OPERON *CITQRP* DE *L. lactis* biovar *diacetylactis*

Previamente al inicio de este trabajo, ya se había demostrado que la capacidad para el transporte de citrato en *L. lactis* biovar *diacetylactis* estaba asociada a la citrato permeasa P (David y cols, 1990). Asimismo, la secuencia de aminoácidos de esta proteína había sido inferida a partir de de la secuencia de nucleótidos del gen *citP* codificante (David y cols., 1990). No obstante se desconocía, si el gen *citP* localiza en un plásmido Cit⁺, descrito por varios autores (Kempler y McKay, 1979, David y cols., 1990, Sesma y cols., 1990) era o no el único gen requerido para el transporte de citrato en *L. lactis*. Los datos obtenidos por Jahns y cols. (1991) fueron sugerentes a este respecto ya que mostraron la necesidad de zonas que preceden al gen *citP*, para la utilización de citrato en *L. lactis*.

En el transcurso de esta tesis se ha determinado la secuencia de nucleotidos de la región de 1586 nt que precede al gen *citP* en el plasmido pCIT264 (Cit⁺). La inspección de esta secuencia ha revelado la existencia de dos marcos de lectura abierta (*citQ* Y *citR*) que se encuentran parcialmente solapadas entre sí y en la misma hélice que *citP* (Figs. 9 y 33).

El gen *citR* precede a *citP* en pCIT264 y el sitio propuesto de unión a los ribosomas para *citR* se encuentra situado dentro de una estructura secundaria compleja predicha por ordenador con ayuda del programa Fold (Fig. 15). Considerando como codon de iniciación de la traducción el primer ATG localizado detrás del sitio de unión a los ribosomas (Fig. 9), *citR* debería codificar un polipéptido de 13087 Da. El producto del gen *citR* ha sido hiperproducido en un vector de expresión de *E. coli* y visualizado en geles de poliacrilamida con un tamaño aproximado de 13 kDa (datos no mostrados), que coincide con el tamaño teórico propuesto. La existencia de CitR en *L. lactis* ha sido demostrada mediante Western blot, al detectar el polipéptido en extractos crudos de *L. lactis* biovar *diacetylactis* CRL264 con anticuerpos anti-CitR (comunicación personal de C. Magni).

El gen *citQ* precede a *citR* en pCIT264 y parte de su secuencia, que se encuentra incluida por completo en la estructura secundaria anteriormente predicha (Fig. 15), solapa parcialmente con la secuencia de *citR*. El gen *citQ* debería codificaría para un polipéptido de 3876 Da. No se ha demostrado la existencia del polipeptido CitQ, pero delante del codon de iniciación de la traducción ATG, existe una secuencia de unión a los ribosomas (5'-uGAAAcGAGGUcA-3') que es complementaria al extremo 3' del RNA ribosomal 16S de

L. lactis (3'-UCUUUCCUCCACU-5') (Ludwig, W., y cols., 1985). Esta secuencia de Shine-Dalgarno debería tener una energía libre de unión (δg) al extremo 3' del rRNA 16S de $-9,7 \text{ kcal mol}^{-1}$, de acuerdo con las reglas de Schurr y cols. (1993) en las cuales se tiene en cuenta una pérdida de energía libre de $3,4 \text{ kcal mol}^{-1}$ producida en la iniciación de la formación del duplex.

En el sistema de *E. coli*, el análisis de la distribución de energía libre de 1159 sitios de unión a los ribosomas ha revelado que el valor medio de energía libre por gen es de $-4,9 \text{ kcal mol}^{-1}$ y solamente 33 de estos genes dan una energía libre inferior a $-10 \text{ kcal mol}^{-1}$ (Schurr y cols., 1993). Tenemos que hacer constar que un SD canónico da un valor de energía libre de $-19,5 \text{ kcal mol}^{-1}$ y que el valor más próximo detectado en *E. coli* es de $-14,3 \text{ kcal mol}^{-1}$. Estos datos sugieren fuertemente que el SD de *citQ* debe ser reconocido por los ribosomas de *L. lactis* y por lo tanto el polipeptido CitQ debe ser sintetizado *in vivo*.

Durante el desarrollo de esta tesis hemos mostrado que el gen *citP* se transcribe primordialmente en la fase exponencial del crecimiento a partir del promotor P1, el cual precede en 1487 nt a dicho gen (Figs. 9, 10 y 11). También hemos mostrado que la transcripción de *citP* termina en una estructura secundaria, característica de los terminadores procarióticos ρ -independientes, localizada a 98 nt del extremo 3' del gen *citP* (Figs. 12 y Fig. 33). La transcripción de *citP* a partir de P1 genera un transcrito de 2914 nt (Fig. 7) denominado mRNA1. La existencia de *citQ* y *citR* plantea una organización génica en la cual *citQ*, *citR* y *citP* constituyen una unidad transcripcional que se encuentra bajo el control del P1. Por lo tanto se puede inferir que *citP* forma parte de un operón que hemos denominado *citQRP*, compuesto por los genes *citQ*, *citR* y *citP*.

El hecho que la región de 983 nt del mRNA1 que se localiza entre P1 y P2, no contenga ninguna ORF, es sorprendente. Sin embargo, dentro de esta región se ha observado la existencia de dos repeticiones inversas de 17 nt separadas por 967 nt (Figs. 9 y 29). La inspección de la secuencia de esta región también ha demostrado la existencia de una ORF, denominada ORF1, localizada en la hélice de DNA complementaria a mRNA1 (Figs. 9 y 32). Asimismo, hemos comprobado que ORF1 se transcribe a partir de P3 (Figs. 9 y 31). Esta ORF está formada por 296 codones y su secuencia de aminoácidos muestra una homología del 51% con dos marcos de lectura abiertos solapantes (ORFA y ORFB) de una IS putativa de *B. stearothermophilus* (Fig. 28). Además, esta IS constituida por 968 nt está flanqueada por una repetición inversa de 14 nt incluida en una región que es homóloga a aquella que

bordea a la ORF1 de pCIT264 y que contiene la repetición inversa de 17 nt (Fig. 30). Así, 16 de los 21 nucleótidos localizados delante de la ORFA, son idénticos a aquellos que preceden a la ORF1 y 15 de los 19 nucleótidos localizados detrás de la ORF1, son iguales a aquellos situados detrás de la ORFB. Todos estos datos sugieren que la región de pCIT264, que contiene ORF1 es una IS. Varias secuencias de inserción de *L. lactis* han sido identificadas y caracterizadas en *L. lactis* (Gasson, J., 1993). Sin embargo, no hemos encontrado homología entre ellas y la IS putativa del plásmido pCIT264.

Por otra parte, mediante inspección del banco de datos EMBL hemos comprobado que parte de la secuencia de DNA de esta IS está presente, con un alto grado de homología, en otros plásmidos lactocócicos (ver apartado 11 del capítulo de Resultados y Fig. 31). En experimentos recientes no recogidos en la parte experimental de esta tesis, hemos detectado por hibridación de Southern con una sonda interna a la IS, que en el DNA total digerido con *EcoRI* de las estirpes de *L. lactis* biovar *diacetylactis* CRL264 y CRL30 (estirpe curada de pCIT264) existen al menos 6 fragmentos que hibridan con la sonda indicando que múltiples copias de la IS están presentes en el genoma de estas estirpes. Además, hemos comprobado que esta nueva IS está presente en el cromosoma de la estirpe libre de plásmidos *L. lactis* **subsp. lactis** MG1363, todo lo cual da idea de su dispersión.

Todos estos datos sugieren que el plásmido pCIT264 deriva de un plásmido parental Cit⁺ en el cual el promotor P1 precedía de forma inmediata al operón *citQRP* (Fig. 33). Aparentemente, durante el proceso evolutivo, la extensa región líder presente en el mRNA1 fué presumiblemente originada por un evento de transposición, resultando en la introducción de una secuencia de inserción entre el promotor natural P1 y el gen *citQ*, dando lugar a la estructura génica actual presente en pCIT264. Asimismo, dicha introducción ha dotado a pCIT264 de tres promotores transcripcionales (P2, P2' y P3), que no estaban presentes en el plásmido parental Cit⁺. El promotor P3 permite la expresión de ORF1, cuya función es desconocida hasta el momento. Sin embargo, hemos mostrado que aparentemente no está implicada en el transporte de citrato (ver apartado 11 de resultados) y su secuencia de aminoácidos no presenta homología con las correspondientes secuencias de las transposasas contenidas en el banco de datos EMBL. Los promotores P2 y P2' están implicados en la expresión del operón *citQRP* y su significación biológica será discutida en el apartado siguiente.

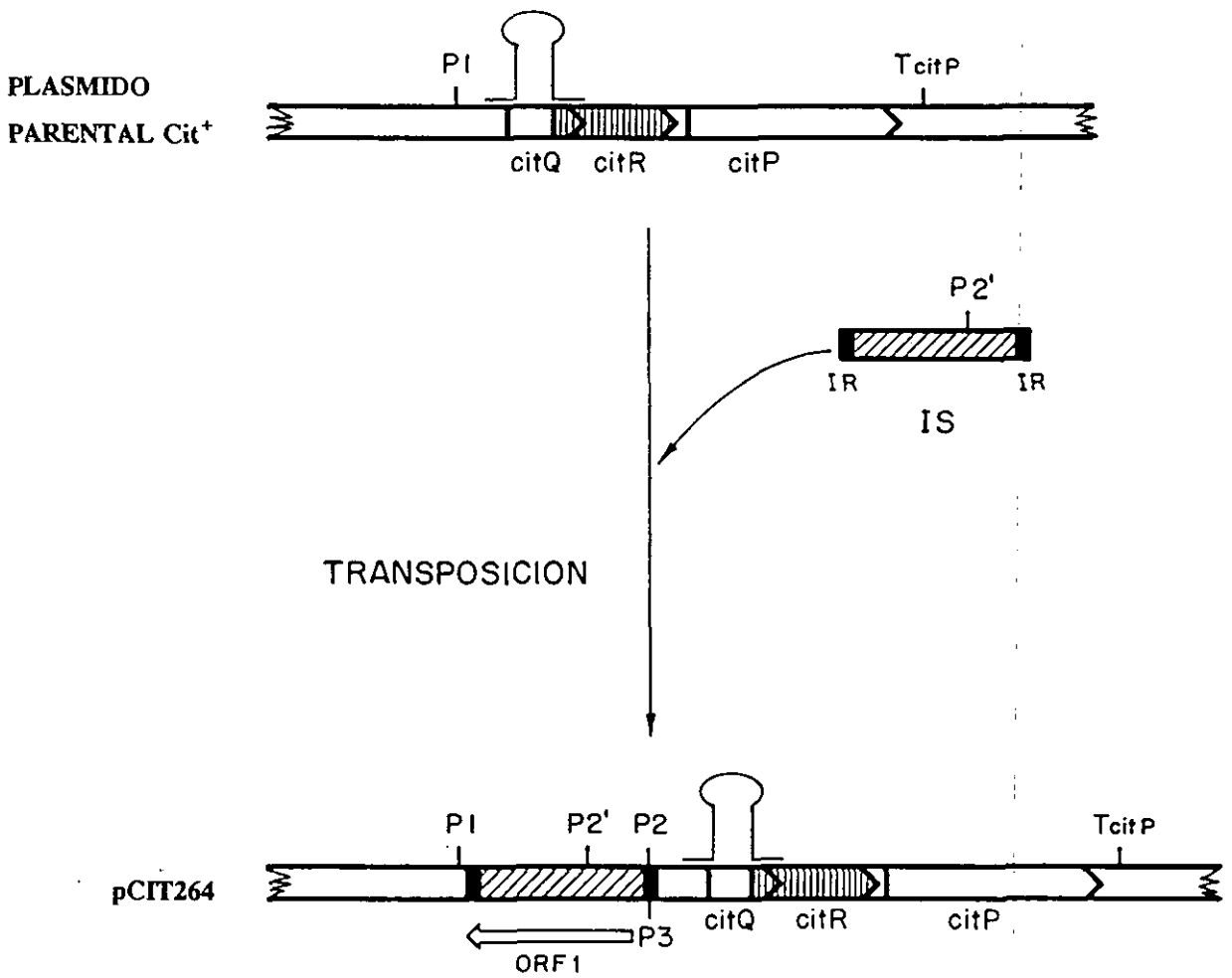


Fig. 33. Hipótesis sobre la introducción del elemento putativo IS en el plásmido parental *Cit*⁺. Abreviaturas: P1 Y P2, promotores de *citQRP* en *L. lactis*; P2', promotor de *citQRP* en *E. coli*; P3, promotor de ORF1 en *L. lactis*; T_{*citP*}, terminador transcripcional de *citQRP* EN *L. lactis* y *E. coli*. Los segmentos representan lo siguiente: rayado hacia la izquierda, IS; rayado vertical, *citR*; blanco, pCIT264; negro, repeticiones invertidas que flanquean a IS.

INFLUENCIA DEL ELEMENTO DE INSERCIÓN DE pCIT264 EN LA EXPRESIÓN DEL OPERÓN *CITQRP*

Ocasionalmente las secuencias de inserción (IS) proporcionan promotores que activan la expresión de genes integrados en el transposón al que flanquean o de genes adyacentes a la secuencia insertada (Amábile-Cuevas y Chicurel, 1992). De esta forma las secuencias de inserción pueden activar genes que, previamente a la inserción, carecen de promotores para su expresión. La activación puede ser debida bien a la existencia de un promotor dentro del transposón o a la creación de un promotor como resultado de la inserción (Labes y Simon, 1990). Ambos supuestos suceden en el caso que nos ocupa.

Los resultados recogidos en los apartados 4 y 8 del capítulo de Resultados de esta tesis han demostrado que la IS de pCIT264 contiene dos promotores (P2 y P2') capaces de dirigir la expresión del operón *citQRP*. El promotor P2, creado al igual que P3 por la introducción de la IS, es reconocido por la RNA polimerasa lactocócica (Fig. 10), mientras que P2', cuya secuencia está completamente incluida en la IS (Fig. 33), es únicamente funcional en *E. coli* (Fig. 24). La creación por inserción de un nuevo promotor, P2, en *L. lactis* no parece la respuesta a la falta de un promotor para la transcripción del gen *citP* en este huésped, ya que la existencia del promotor P1, cuya secuencia completa está fuera de la IS, parece ser anterior a la inserción de este elemento en el plásmido Cit⁺ (Fig. 33). La expresión del operón *citQRP* en *L. lactis* a partir del promotor P2 durante la fase exponencial del crecimiento, aunque existe, parece ser minoritaria en comparación con aquella que se produce a partir del promotor natural P1 (ver apartado 5 del capítulo de resultados y el apartado siguiente de discusión). Sin embargo, en la fase estacionaria del crecimiento, P2 es el promotor preferencialmente utilizado para la expresión del operón *citQRP* (Fig. 10). Por lo tanto, en *L. lactis*, la posible ventaja selectiva de pCIT264 sobre el plásmido parental Cit⁺ por la creación de P2, no es adscribible a la activación de la expresión del operón *citQRP*, sino que es probablemente debida a un incremento de la expresión de dicho operón primordialmente en la fase estacionaria del crecimiento.

En el sistema de *E. coli* la introducción de la IS ha posibilitado la transcripción del operón *citQRP* en este huésped heterólogo. En esta ocasión la presencia de la IS en pCIT264, conteniendo el promotor P2' ha producido la activación del operón *citQRP*. Esta conclusión está basada en los resultados obtenidos mediante la obtención de plásmidos derivados de

pCIT264 y análisis de la capacidad de estirpes de *E. coli* portadoras de ellos para transportar citrato (Figs. 5 y 6). Además, hemos mostrado que en este huesped el gen *citP* se transcribe en un único mRNA, denominado mRNA2' de 1983 nt (Fig. 23) sintetizado a partir del promotor P2' (Fig. 24) y que tiene su extremo 3', al igual que en *L. lactis*, en la estructura secundaria situada "downstream" del gen *citP* (Fig. 25). Previamente al inicio de esta tesis, David y cols., (1990) observaron que el gen *citP* del plásmido lactocócico pCT176 sólo se expresaba en *E. coli*, cuando estaba clonado en el vector pBR328 en la orientación correcta respecto al promotor del gen *cat* de dicho vector. En base a estos resultados, los autores concluyeron que el gen *citP* de *L. lactis* se expresaba en el plásmido híbrido en *E. coli* a partir del promotor *cat*. Asimismo, postularon que las señales transcripcionales naturales del gen *citP* no eran funcionales en *E. coli*, o bien no estaban presentes en el plásmido híbrido obtenido. Nuestros resultados de expresión de *citP* en el sistema heterólogo, apoyan la hipótesis de que el promotor natural de *citP* no es reconocido por la RNA polimerasa de *E. coli*, ya que hemos probado que P1 no es funcional en este sistema (Figs. 23 y 24). Sin embargo, existen discrepancias entre los resultados de David y cols. (1990) y los recogidos en este trabajo, puesto que si hemos observado expresión del gen *citP* a partir del promotor P2'. Estas discrepancias podrían ser explicadas por dos causas: 1) el promotor P2' no está presente en el plásmido pCT176. Esta explicación la asumimos basándonos en el hecho de que el fragmento *EcoRV-BglIII*, que contiene el promotor P2', posee un tamaño de sólo 0,5 kb en el plásmido pCT176 (David y cols., 1990), mientras que en pCIT264 es de 0,916 kb (tamaño determinado por la determinación de la secuencia de nucleótidos de este fragmento, Fig. 9). Así, es factible que el plásmido pCT176 sólo contenga una parte de la IS presente en pCIT264 (como ocurre en los plásmidos pNP40, pSKL11 y pTN20) y que carezca del promotor P2'. 2) en el plásmido híbrido construido por David y cols (1990), en el cual los genes *citP* y *cat* estaban clonados en orientaciones opuestas, la transcripción desde el promotor P_{cat} podría interferir con la transcripción convergente desde el promotor P2', resultando en una inhibición de la síntesis del mRNA2' y como consecuencia de la síntesis de CitP. Este mecanismo de inhibición de la transcripción ha sido descrito en *E. coli*. Cualquiera de estas dos hipótesis justificaría la falta de expresión observada por David y cols. (1990) y hace compatibles sus resultados con los obtenidos en este trabajo.

La significación biológica que puede tener la existencia de señales transcripcionales que son reconocidas en *E. coli* (P2') y no en *L. lactis* para la transcripción del operón

citQRP, es desconocida. Sin embargo, la capacidad para fermentar citrato podría suponer una ventaja selectiva en ciertos habitats para una especie que es normalmente, aunque no siempre, *Cit.*, como sucede en el caso de *E. coli*. La adquisición de esta capacidad podría ser debida a la movilización del plásmido *Cit*₊ por plásmidos conjugativos desde *L. lactis* a *E. coli*, ya que se ha comunicado que el plásmido *Cit*₊ puede ser fácilmente transferido por movilización (Jahns y cols., 1991). Sin embargo, esta posibilidad es improbable debido a que el plásmido *Cit*⁺ posee una región de replicación (Pedersen, M. y cols., 1994) que es homóloga a la de una familia de plásmidos con replicación tipo theta. El plásmido tipo de esta familia, pWV02 (Kiewiet y cols., 1993), así como otro plásmido perteneciente a la misma, pCI305 (Hayes y cols., 1991) no replican en *E. coli*, por lo tanto es muy probable que el plásmido *Cit*⁺ no replique en este huésped. No obstante una de las características de las estirpes naturales de *L. lactis* es la presencia de múltiples plásmidos corresidentes en la misma célula, algunos de los cuales replican via círculo rodante. Dentro de la familia de plásmidos que replican por el mecanismo de círculo rodante se encuentran los plásmidos naturales de *L. lactis* pSH71 y pWV01 los cuales son capaces de replicar en *E. coli* (de Vos, 1987). Así, aunque el plásmido *Cit*⁺ fuera incapaz de establecerse en *E. coli*, cabría la posibilidad de que en *L. lactis* el operón *citQRP* fuera transferido mediante un proceso de transposición (se conoce la existencia de al menos una secuencia de inserción tipo ISS1 en el plásmido *Cit*⁺, Jahns y cols., 1991) a un plásmido que replicara via círculo rodante y este plásmido podría a su vez ser transferido horizontalmente de *L. lactis* a *E. coli*, ya que ambas especies comparten nicho ecológico en el hombre.

Recientemente estudios en *Streptococcus* han revelado la existencia de transposones conjugativos (Amábile-Cuevas y Chicurel, 1992), que son capaces de escindir, circularizarse y sufrir una transferencia conjugativa de manera semejante a los plásmidos conjugativos. Uno de estos transposones conjugativos ha sido identificado en *L. lactis* conteniendo genes que codifican para una bacteriocina (Horn y cols., 1991). Teniendo en cuenta estos datos también cabría la posibilidad de que un transposón que contuviera el operón *citQRP* sufriera una transferencia conjugativa similar a la ocurrida con la IS descrita por Horn y cols. (1991), aunque se desconoce la existencia de tal transposón y si dicha transposición pudiera ocurrir desde *L. lactis* a *E. coli*.

UTILIZACION DIFERENCIAL DE PROMOTORES EN *L. lactis* Y EN *E. coli* PARA LA EXPRESION DEL OPERON *CITQRP*

La transcripción de genes por las RNA polimerasas bacterianas requiere el reconocimiento de secuencias específicas en el DNA, denominadas promotores, por los factores sigma de dicha enzima. En el sistema de *L. lactis*, a diferencia con *E. coli*, no se han realizado estudios de transcripción *in vitro*, ni se ha identificado ningún factor sigma. Por ello, se desconoce el número de factores sigma lactocócicos existentes y las secuencias reconocidas por ellos. Sin embargo, si se han clonado secuencias lactocócicas que promueven la transcripción en este sistema. Además van de Guchte y cols. (1992) han comparado las regiones que preceden al inicio de la transcripción de 21 de estas secuencias de *L. lactis* (sólo 6 de ellas preceden a genes identificados). Los resultados de dicha comparación han mostrado una alta conservación de las secuencias tTGtTa y T(t/a)AAA en las regiones -35 y -10 que preceden al sitio de iniciación de la transcripción y que parecen ser las secuencias reconocidas por el factor sigma mayoritario de la RNA polimerasa lactocócica.

En este trabajo experimental se ha analizado la expresión del gen *citP* a partir de los promotores P1+P2 mediante determinación de la actividad CAT codificada por el plásmido pFL12 (Fig. 20). Asimismo, la contribución de P2 en la expresión de este gen ha sido determinada por la construcción del plásmido pFL17 (derivado del plásmido pFL12 obtenido por eliminación del fragmento *EcoRV-EcoRV*, que contiene P1) y determinación de la actividad CAT codificada por él (255 U mg proteína⁻¹, dato no mostrado en el capítulo de resultados). La comparación de las actividades CAT codificadas por pFL12 y pFL17 muestra que la expresión a partir de P2 es aproximadamente 4,5 veces inferior a la obtenida a partir de P1 (Tabla V). Por otra parte, se ha analizado la expresión de *citP* a partir de los promotores estreptocócicos P_{polA} (Tabla IV y Tabla V) Y P_{tetL} (López de Felipe y cols. (1994) y Tabla V). Los resultados obtenidos muestran que en *L. lactis* P_{tetL} es el promotor más fuerte de los analizados. Este promotor es el único que contiene una secuencia TG localizada delante y separada por un nucleótido de la región -10. Esta secuencia está presente en varios promotores lactocócicos y parece estar relacionada con la fuerza de éstos (van der Vossen y cols., 1987). Además, la presencia de una región rica en residuos a delante del -35 podría contribuir a la fuerza de este promotor como ocurre en *E. coli* (Ellinger y cols., 1994), huésped en el que P_{tetL} es también funcional (Ballester y cols. 1990).

Los promotores P1 y P_{polA} presentan una fuerza similar en *L. lactis* (Tabla VI) y de hecho ambos presentan una desviación de dos nucleótidos en las regiones -35 y -10 y el mismo espaciado de 17 nt. (Fig. 34). La débil utilización del promotor P2 (Tabla V) podría ser adscribible a la baja coincidencia con la región -35 canónica, y en la que sólo tres residuos están conservados (Fig. 34). Alternativamente, la débil expresión detectada a partir de este promotor podría ser debida a que P2 fuera reconocido por un factor sigma minoritario de *L. lactis*, no descrito hasta ahora, funcional en las etapas de crecimiento exponencial y estacionaria.

Por otra parte, la ausencia de actividad de P2' (Fig. 10) observadas en *L. lactis*, no tiene una explicación obvia, ya que P2' posee unas regiones -35 y -10 que se desvían de las secuencias consenso en el mismo número de nucleótidos y en las mismas posiciones que P1, y además el espaciado entre estas regiones de 18 nt es igual al existente en P_{polA} (Fig. 34). Sin embargo, el alto contenido de AT (62%) del cromosoma de *L. lactis* predice un requerimiento más estricto para el reconocimiento de secuencias promotoras por la RNA polimerasa lactocócica, que el observado para *E. coli*. Esta predicción ha sido confirmada, ya que secuencias lactocócicas aisladas en *E. coli*, debido a su actividad promotora, no eran funcionales en el huésped original (Bojovic y cols., 1991). Así, es posible que la presencia de una G en la última posición de la región -10 del promotor P2', la cual sólo está presente en 1 de los 21 promotores analizados por van de Gutche y cols (1992), provoque la falta de reconocimiento de este promotor por la RNA polimerasa lactocócica. Esta circunstancia no parece influir a la expresión en el sistema de *E. coli*, puesto que hemos detectado, que el gen *citP*, sólo se expresa a partir del promotor P2' en este sistema (Fig. 24). La secuencia de este promotor sólo se desvía en 2 Y 1 residuos, respectivamente, de las secuencias -35 (TTGACA) Y -10 (TATAAT) reconocidas por el factor mayoritario (σ^{70}) de *E. coli* (Rosenberg y Court, 1979). Asimismo, el espaciado entre ambos hexanucleótidos es de 18 nucleótidos valor que coincide con el espaciado consenso (17 ± 1). Por otra parte, el promotor P2' tiene otra característica que no tienen ni P1 ni P2, y es la presencia de una extensión de residuos adenina precediendo al hexamero -35 (Fig. 34). Esta característica debería servirle para ser un promotor eficiente en *E. coli*, ya que se ha observado que estas secuencias influyen positivamente la función promotora en este huésped (Ellinger y cols., 1994). Por tanto, parece lógico inferir que el promotor P2' es reconocido por el factor sigma mayoritario de la RNA polimerasa de *E. coli*.

Tabla V. Comparación de la fuerza de promotores en la expresión de *citP* en *L. lactis*

Plasmido	Promotores	Actividad CAT (%) ¹
pFL16	P _{uclL}	100
pFL14	P _{polA}	31,8
pFL12	P1+P2	37,3 (30,5+6,8) ²
pFL17	P2	6,8

¹Las actividades CAT aparecen expresadas en porcentaje, siendo 100% el valor detectado en extractos de *L. lactis* MG1363/pFL16. Los datos numéricos de actividad CAT aparecen recogidos en la Fig. 20 (pFL12), Tabla IV (pFL14) y en López de Felipe y cols (1994).

²La actividad CAT debida al promotor P2 ha sido considerada igual a la detectada en los extractos conteniendo pFL17. La contribución del promotor P1 en la actividad CAT ha sido calculada por sustracción del valor debido a P2, al valor total obtenido en los extractos conteniendo pFL12.

El hecho de que el promotor natural del operón *citQRP* (P1) no sea reconocido por el factor σ^{70} de la RNA polimerasa de *E. coli* no parece muy clara, puesto que su secuencia se desvía de las secuencias canónicas en el mismo número de residuos que el promotor P2'. Esta falta de reconocimiento podría indicar, que la utilización de P1 por la RNA polimerasa lactocócica requiere la existencia de algún factor específico de su huésped natural. Sin embargo, hemos comprobado que P1 es funcional en el huésped heterólogo *S. pneumoniae* (López de Felipe y cols, 1994), por tanto, si fuera cierto el requerimiento de un factor del huésped para el reconocimiento de P1, este factor estaría presente en otra bacteria gram positiva, *S. pneumoniae*, y no sería codificado por *E. coli* (bacteria gram negativa).

De lo anteriormente comentado y del conocimiento actual se puede deducir que este es el primer caso descrito de un promotor de *L. lactis*, que no es funcional en *E. coli*.

	-35	espaciado	-10
<i>PretL</i>	GAAGAAAAGAAT TTGaaA	CTTAGTTTATATGTGG <-----16----->	TAAAAt GTTTTAA
<i>PpolA</i>	TAGCTCTTCCCA aTGgTA	TTTTTTGATTCTTTCCTT <-----18----->	TAtAAt GGGTGTA
P1	TCAGCTTATTAT TTGcgA	AACAAAACAGAAAGGAA <-----17----->	TAgAAt AAAAATA
P2	ATTTATTTTCCA aTGaaA	TTAACTAGCAATTCGGG <-----18----->	TAAAAA TATCAAGTACAG
P2'	AAACAAAAACTT TTGgaA	GTGTGCTATTATAAGTCA <-----18----->	TAtAAg TCGTGAG

Fig. 34. Secuencia de nucleótidos de las regiones que incluyen los promotores P_{retL} , P_{polA} , P1, P2 y P2'. Las regiones -35 y -10 de los promotores aparecen indicadas con negrilla. Las secuencias que pueden estar implicadas en la fuerza de los promotores aparecen sombreadas. Los sitios de iniciación de la transcripción aparecen subrayados. Los datos mostrados han sido obtenidos en este trabajo o recogidos de López de Felipe y cols. (1994).

CITP ES EL UNICO GEN ESENCIAL PARA EL TRANSPORTE DE CITRATO EN *Lactococcus lactis* biovar diacetylactis.

La utilización de citrato por *Lactococcus lactis* biovar diacetylactis tiene una gran importancia en las fermentaciones de productos lácteos ya que la conversión de este metabolito da lugar, entre otros, al compuesto aromático diacetilo. La producción del compuesto diacetilo es esencial en la producción del aroma y sabor de determinados productos lácteos. Asimismo, durante el metabolismo del citrato se produce CO₂ lo que produce una textura característica en los productos fermentados. La primera etapa en el metabolismo del citrato es el transporte de dicho metabolito al citoplasma de la célula. Como se ha dicho en el primer apartado de este capítulo la capacidad de transportar citrato en *L. lactis* biovar diacetylactis está asociada a la citrato permeasa P codificada por el gen *citP* presente en un

plásmido Cit⁺ (Kempler y McKay, 1979, David y cols., 1990, Sesma y cols., 1990). No obstante se desconocía si se requerían otros productos génicos codificados por el plásmido Cit⁺ para el transporte de citrato en *L. lactis*.

Para despejar esta incógnita, durante el desarrollo de este trabajo experimental se construyeron diferentes plásmidos derivados de pCIT264 (ver apartado 1 del capítulo de Resultados). Estos derivados se construyeron subclonando diferentes regiones de pCIT264 en el plásmido de amplio rango de huésped pLS1. Una vez construidos se midió el transporte de citrato en las estirpes de *L. lactis* que portaban estos derivados. Uno de estos plásmidos, pFL4, que contiene la región que precede al gen *citP* en pCIT264 pero no la que está situada "downstream" de dicho gen (Fig. 14), fué capaz de conferir la capacidad de transportar citrato a *L. lactis* (Fig. 6). Este dato demostró que la zona delecionada no era necesaria para el transporte de citrato en su huésped original. Asimismo, se examinó el requerimiento de las zonas precedentes al gen *citP* en el transporte de citrato mediante la construcción de los plásmidos pFL3 y pFL6 (Fig. 4). El plásmido pFL3, además del gen *citP* porta un fragmento de DNA cromosómico de *S. pneumoniae*. Este fragmento de DNA que contiene el promotor transcripcional del gen *polA*, sustituye a la región de pCIT264 que incluye los promotores P1 y P2 y los genes *citQ* y *citR* en el plásmido pFL4. La estirpe de *L. lactis* MG1363 (Cit⁻) por introducción del plásmido pFL3 adquirió la capacidad para incorporar citrato al citoplasma celular (Fig. 6). Este resultado demuestra que tanto *citQ* como *citR* no están directamente implicados en el transporte de citrato.

La necesidad de las zonas que preceden a *citP* en pCIT264 para su transcripción, se puso de manifiesto al no detectar transporte de citrato en células de *L. lactis* MG1363 conteniendo el plásmido pFL6 (Fig. 6). Dicho plásmido fué obtenido a partir del plásmido pFL3 por eliminación, mediante deleción, del promotor estreptocócico (P_{polA}) que dirigía la transcripción de *citP* en el plásmido parental (Fig. 5). Por otra parte, no se observó efecto alguno sobre el transporte de citrato generado por la estirpe de *L. lactis* MG1363 portadora del plásmido pFL3, al suplementarla con el plásmido pFI1, el cual contiene ORF1 clonado en el vector de bacterias gram⁺ pIL253 (ver detalles de su construcción en el apartado 11 del capítulo de Resultados). Este resultado indica que el producto de ORF1 no está implicado en el transporte de citrato.

Así, podemos deducir de nuestros resultados que el requerimiento del plásmido Cit⁺ para el transporte de citrato en *L. lactis* es exclusivamente debido a la citrato permeasa P

producto del gen *citP*. Asimismo, hemos demostrado que el requerimiento de la region que precede a *citP* en dicho proceso es debido a la necesidad de secuencias promotoras que permitan la expresión de dicho gen. En consecuencia, nuestros resultados explican la imposibilidad de utilizar citrato en estirpes de *L. lactis* portadoras de un derivado del plásmido Cit⁺ obtenido al deleccionar el fragmento *EcoRV-BglIII* que precede al gen *citP* en el plásmido parental (Jahns y cols., 1991), ya que dicho fragmento contiene los promotores transcripcionales del operón *citQRP*.

REGULACION POST-TRANSCRIPCIONAL DEL OPERÓN *CITQRP*

La construcción de derivados deleccionados de pCIT264 ha permitido mostrar que el producto del gen *citR* no es esencial para que *L. lactis* transporte citrato a su citoplasma. No obstante, debido a que *citR* forma parte del mismo operón que *citP* era lógico suponer que el producto del gen *citR* estuviera implicado en la regulación de la expresión de *citP*.

Para comprobar dicha hipótesis se ha examinado el efecto del gen *citR* y de su producto CitR sobre la expresión del gen *citP*, para lo cual se contruyó el plásmido pFL12 (Fig. 18). Este plásmido contiene una fusión *citP-cat* bajo el control de P1 y P2. El efecto de *citR* sobre esta fusión, y por extrapolación sobre *citP*, se examinó suplementando *citR* bien *en cis* o bien *en trans* respecto a *citP*. El análisis de la regulación de *citR* *en trans* sobre *citP* fué posible al introducir el plásmido pFI20 en la estirpe de *L. lactis* MG1363/pFL12. El plásmido pFI20 produce una sobreexpresión de CitR en la célula, ya que el gen codificante está clonado bajo el control del promotor estreptocócico P_{polA} (Fig. 19).

La presencia del plásmido pFI20 no afectó ni al número de copias de pFL12 (7±1) ni a la síntesis del mRNA específico *citP-cat* (Fig. 20). Sin embargo, la sobreexpresión de CitR producida por pFI20 provocó un descenso de cuatro veces en la actividad CAT codificada por pFL12 (Fig. 20). Puesto que los niveles del mRNA específico *citP-cat* permanecían inalterables, independientemente de la presencia o no del producto del gen *citR*, estos resultados revelan que CitR ejerce un efecto inhibitorio *en trans* sobre la traducción de *citP* y que la diana de CitR tiene que estar localizada en el mRNA del operón *citQRP*. Para intentar delimitar por exclusión la posición de dicha diana, se generó el plásmido pFL14 (Fig. 21) a partir de pFL2. En pFL14, las señales transcripcionales naturales (P1 y P2) que controlan la transcripción de la fusión *citP-cat* fueron sustituidas por el promotor P_{polA}, se

eliminó el gen *citQ* y se sustituyó el sitio de unión a los ribosomas del gen *citR* por el SD del gen $\phi 10$ del bacteriófago T7.

No se observó efecto alguno sobre la actividad CAT codificada por pFL14 cuando la estirpe de *L. lactis* portadora de este plásmido se suplementó con CitR (pFI20) (Tabla IV). Así, nuestros resultados muestran que la diana de CitR no se encuentra en el mRNA codificado por el plásmido pFL14, pero si en aquel codificado por pFL12. Por tanto, podemos deducir que dicha diana no esta incluida en las regiones codificantes para CitR y CitP.

Para analizar la posible regulación ejercida por *citR* en *cis* sobre *citP*, se construyeron los plásmidos pFL13 y pFL15 (Fig. 21) generados, respectivamente, a partir de pFL12 y pFL14 por interrupción del gen *citR*. La interrupción de *citR* provocó que pFL13 Y pFL15 generasen unas actividades CAT dos veces inferiores a las codificadas por sus plásmidos parentales respectivos (Tabla IV), sin afectar a la síntesis del mRNA específico *citP-cat* (resultados no mostrados). Por lo tanto, hemos observado un efecto de la traducción de *citR* en *cis* sobre la síntesis de CitP con independencia del promotor transcripcional utilizado (P_1 o P_{polA}). Estos resultados indican, que CitP puede sintetizarse sin que se traduzca *citR*. Sin embargo, parece existir un acoplamiento parcial de la traducción de *citR* y *citP*, que provoca un aumento en la síntesis de CitP. Las distancias existentes desde el codon de terminación de la traducción de *citR* (TAA), y al sitio de unión a los ribosomas (AuAAAU $\overline{GGAGaGA}$) o al codon de iniciación de la traducción (ATG) del gen *citP* son de 7 y 25 nucleotidos respectivamente. Ambos valores son inferiores a 35 nucleotidos, que es aproximadamente la distancia cubierta por los ribosomas durante la traducción (Schurr y cols., 1993). Por tanto, es factible que los ribosomas que terminan la traducción de *citR* puedan unirse al SD de *citP* con mayor eficiencia que los ribosomas libres, o bien que obvien el sitio de unión a los ribosomas y reconozcan el primer codon ATG de *citP* iniciando la traducción de dicho gen. Ambas posibilidades provocarían la misma respuesta, que consiste en el incremento de la síntesis de *citP*.

Asimismo, la presencia de pFI20 no afectó significativamente a la actividad CAT generada por pFL13 (que no expresa CitR (Tabla IV), confirmando que la represión ejercida por CitR en *trans* requiere un acoplamiento de la traducción entre *citR* y *citP*.

La regulación post-transcripcional de la expresión del gen *citP* parece implicar a otros factores además de CitR. Durante el transcurso de este trabajo, en los diferentes experimentos de Northern blot, realizados para detectar los transcritos específicos de *citP* en la estirpe de

L. lactis biovar *diacetylactis*, se observaron cantidades variables de mRNA1 y mRNA2 (Figs. 7, 13 y 14), sugiriendo que la especie molecular mRNA1 podría ser procesada por las ribonucleasas lactocócicas. Apoyando esta hipótesis el análisis de la secuencia con el programa Fold reveló la existencia de una estructura secundaria compleja putativa que podría constituir una diana para el ataque endonucleolítico por ribonucleasas bacterianas (Fig. 15).

Esta hipótesis fue analizada mediante aislamiento de los RNAs procedentes de cultivos de *L. lactis* biovar *diacetylactis* CRL264 /pCIT264, pretratados durante diferentes tiempos con Rf, inhibidor específico de las RNA polimerasas bacterianas. A continuación, se analizó el destino de los mRNAs específicos de *citP* mediante Northern blot utilizando dos sondas (ver apartado 6 del capítulo de Resultados). El mRNA1 fué detectado con ambas sondas, pero posteriormente y dependiendo de la sonda utilizada se detectaron diferentes especies moleculares de mRNA específicas de *citP*. Los resultados obtenidos muestran que el mRNA1 es probablemente convertido en un fragmento de 1000 nt y un fragmento de 1900 nt, correspondientes respectivamente a las regiones 5' y 3' del mRNA1 (Fig. 16). El transito de menor tamaño probablemente no es traducido, ya que la inspección de la secuencia de la región que comprende no revela ningún cuadro de lectura abierto significativo.

Después de la acumulación del transcrito de mayor tamaño se detectó su posterior conversión en un transcrito de 1500 nt (Fig. 16). El tamaño de esta especie molecular coincidiría con la longitud del gen *citP*, sugiriendo que después del procesamiento inicial del mRNA1 en dos fragmentos, la región 5' del fragmento de mayor tamaño estaría sujeto a un ataque endonucleolítico.

La longitud de las dos especies de RNA (1000 Y 1900 nt), generadas a partir del mRNA1 sugieren, que el procesamiento de este RNA tiene lugar en la estructura secundaria compleja. La estructura propuesta (Fig. 15) pertenece al tipo de estructura que constituye la diana característica para el ataque endonucleolítico en otros sistemas bacterianos (Gamper y cols., 1992; Lesage y cols., 1992; Liu y cols., 1992). La estructura secundaria y el procesamiento específico del transcrito del operón *citQRP* podrían estar implicados en el control post-transcripcional de la expresión de *citR*. Varios datos parecen sugerirlo. El codon de iniciación de la traducción de *citR* está localizado en el extremo 3' de la estructura secundaria y el sitio putativo de unión a los ribosomas de *citR* (AGAAG), que es complementario al extremo 3' de *L. lactis* 16S-rRNA (Ludwig y cols., 1985), está parcialmente bloqueado en los dos tallos de la estructura. La formación de la estructura

secundaria en el mRNA intacto podría interferir con la traducción de *citR*, ya que este tipo de estructuras parecen influir en la eficiencia de la iniciación de la traducción en *L. lactis* (van de Gutche y cols., 1992). También, es previsible que exista una competición entre los ribosomas que están traduciendo el gen *citQ* (incluido en dicha estructura) y las ribonucleasas que procesan el mRNA1 tal y como ocurre en el operón *lac* de *E. coli* (Yarchuk y cols., 1992). La unión de los ribosomas libres al SD de *citQ* en el mRNA1 intacto, posibilitaría la traducción de este polipeptido evitando la formación de la estructura secundaria y consiguientemente el procesamiento de dicho transcrito (Fig. 34). Este suceso favorecería la expresión del gen *citR* por traducción acoplada de los ribosomas que acaban de traducir *citQ*, o por un mecanismo de cambio de cuadro de lectura. Estos mecanismos de regulación traduccional son funcionales en otros sistemas bacterianos como por ejemplo es el caso del gen *ermC* de *Staphylococcus aureus* (Mayford y Weisblum, 1989) y el operón de *E. coli* codificando el factor de iniciación traduccional IF3 y la proteínas ribosomales (L35 y L20) (Lesage y cols., 1992).

El análisis e interpretación de los resultados discutidos en este apartado nos ha llevado a postular el siguiente mecanismo de regulación de la expresión del operón *citQRP* (Fig. 34). El operón *citQRP* se transcribiría en un mRNA (mRNA1) que podría tener dos destinos: 1) procesamiento (panel izquierdo) y 2) estabilización por traducción de *citQ* (panel derecho).

1) El procesamiento del mRNA1, presumiblemente debido a la acción de ribonucleasas, generaría una especie de RNA de 1000 NT, que sería posteriormente degradada y una especie de 1900 nt, que podría ser utilizada por los ribosomas para sintetizar la citrato permeasa P. La síntesis de la permeasa sería posible por la unión de los ribosomas al SD de *citP*, no existiendo en este caso traducción acoplada de *citR* y *citP*.

2) La utilización del SD del gen *citQ* por los ribosomas lactocócicos (en el apartado 1 de la discusión se ha indicado que debería ser un SD potente), impediría la formación de la estructura secundaria y como consecuencia el procesamiento del mRNA1. Posteriormente tendría lugar la traducción de *citR*, que podría estar o no acoplada a la de *citQ*. Cuando los ribosomas acabaran de sintetizar CitR serían reutilizados en la traducción de *citP* y el polipéptido CitR, sintetizado a partir de esta u otra molécula de mRNA (hemos demostrado que CitR actúa en *trans*), interaccionaría con el mRNA1 inhibiendo la síntesis de CitP, que está acoplada a la traducción de *citR*.

traducción de *citR*. La unión del represor a su diana estabilizaría dicha estructura y bloquearía la traducción de *citR* (este es un mecanismo común de represores traduccionales, ver revisión de McCarthy y Gualerzi, 1990) impidiendo la traducción acoplada de *citR* y *citP* y provocando así un decrecimiento en la síntesis de CitP.

EL CITRATO NO CONTROLA LA TRANSCRIPCIÓN DEL GEN *CITP*, NI ESTIMULA EL TRANSPORTE DE CITRATO

La regulación post-transcripcional de la expresión del operón *citQRP* descrita en el apartado anterior parece estar encaminada a controlar muy estrictamente los niveles de citrato permeasa P en *L. lactis* biovar *diacetylactis*. A la vista de estos resultados surgía una pregunta obvia. ¿Cuál es el efector de dicha regulación?. Un posible candidato para esta función era el citrato, sustrato de CitP.

El efecto que la concentración de citrato tiene sobre el transporte de este metabolito al citoplasma de *L. lactis* ha sido investigado en varias ocasiones. Starrenburg y Hugenholtz (1991) observaron que la presencia de citrato en el medio provocaba un ligero estímulo del crecimiento de *L. lactis* estableciendo los productos que se formaban a partir del citrato añadido.

Estos antecedentes sugerían que el efector de la regulación de la expresión del operón *citQRP* podría ser la presencia de citrato en el medio de cultivo.

En este trabajo hemos investigado esta posibilidad mediante análisis de la influencia del citrato en la transcripción del operón *citQRP* y en la capacidad para transportar citrato. La estirpe *L. lactis* biovar *diacetylactis* CRL264 que contiene el plásmido pCIT264 (Cit⁺), fué crecida en presencia y en ausencia de citrato y se comparó la síntesis de los mRNAs específicos de *citP* y los niveles de transporte de citrato. Las cantidades relativas de los mRNAs específicos de *citP* fueron esencialmente las mismas, independientemente de que el cultivo fuera o no suplementado con citrato (Fig. 28). Los resultados obtenidos para comprobar la influencia del citrato sobre la transcripción de *citP* fueron apoyados por los resultados de transporte de citrato obtenidos con *L. lactis* biovar *diacetylactis* CRL264. Esta estirpe acumuló esencialmente la misma cantidad de [¹⁴C] independientemente de que el medio estuviera o no suplementado con citrato. Estos resultados demuestran que la presencia de citrato en el medio no regula ni la transcripción del gen *citP*, ni el transporte de citrato en

la estirpe **CRL264**. Como consecuencia podemos deducir que la expresión de la citrato permeasa P codificada por el plasmido pCIT264 no está afectada por la presencia de citrato en el medio de cultivo. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Smith y cols. (1992), ya que dichos autores comunicaron que la utilización de citrato por la estirpe C17 de *L. lactis* biovar *diacetylactis* portadora del plásmido Cit⁺ pSL2 era independiente de la presencia del metabolito en el medio de cultivo.

Sin embargo, como se ha comentado previamente en la introducción los plásmidos Cit⁺ presentes en distintas estirpes de *L. lactis* biovar *diacetylactis* aunque son similares no son idénticos. Por tanto no podemos descartar, que el plásmido ancestral Cit⁺ carente del elemento de inserción si fuera inducible por citrato. Asimismo, es posible que alguno de los plásmidos existentes en la actualidad sea inducible, como sugiere el incremento de utilización de citrato en presencia de este compuesto, descrito por Harvey y Collins (1961).

EL pH DEL MEDIO DE CULTIVO INFLUYE EN LA SINTESIS DE LA CITRATO PERMEASA P

Los resultados discutidos en el apartado previo mostraban que la presencia de citrato en el medio de cultivo no era el efector de la regulación de la expresión del operón *citQRP*. Con el objeto de identificar el efector de esta regulación tomamos en consideración los conocimientos existentes respecto a la utilización de citrato en *L. lactis*.

La influencia del pH sobre el metabolismo del citrato comenzó a ser estudiada en 1936 cuando Long y Hamer describieron que la formación de acetoína por *Streptococcus* sólo se produce cuando el pH del medio es mas bajo de 6. Puesto que el metabolismo del citrato es necesario para la producción de acetoína, Harvey y Collins (1961) supusieron que el transporte de citrato era también dependiente del pH. Estos autores observaron que el transporte de citrato en *Streptococcus diacetylactis* se incrementaba rápidamente cuando el pH bajaba de 6 demostrando, asimismo, que la dependencia de pH, durante la utilización de citrato, era determinada por la actividad de la citrato permeasa P. Posteriormente, se ha comprobado que el rango óptimo para la actividad de la proteína transportadora de citrato de *L. lactis* está entre valores de pH de 5,0 y 6,0 que coincide con el rango de pH óptimo para la conversión del citrato (Starrenburg y Hugenholtz, 1991).

Estos antecedentes nos hicieron suponer que la alteración del pH en los medios de los

cultivos durante las fermentaciones lácticas podría ser el efector de la regulación de la expresión del operón *citQRP*.

El efecto que ejerce el pH sobre la expresión de proteínas transportadoras ha sido previamente observado y puede producirse de varias formas (ver revisión de Olson, 1993). Una de las formas a través de las cuales el pH ejerce un control sobre la expresión génica es la regulación transcripcional de ciertos genes tales como el gen que codifica para el transportador de menaquinonas en *B. subtilis* (Hill y cols., 1990). También puede actuar induciendo la síntesis de determinadas proteínas como por ejemplo la lysina permeasa de *E. coli* (Steffes y cols., 1992).

Con el objeto de observar cual era el influencia del pH del medio de cultivo sobre la expresión del gen *citP*, en el transcurso de este trabajo se ha analizado dicha expresión a nivel transcripcional y traduccional en cultivos de *L. lactis* crecidos a pH 7,0 ó a pH 5,5 (ver apartado 9 de resultados). La alteración del pH no afectó los niveles de mRNA1 y mRNA2 codificados por *L. lactis* biovar diacetylactis CRL264 (Fig. 26), ni los niveles del transcrito *citP-cat* sintetizado por *L. lactis* MG1363/pFL12 (datos no mostrados) (Fig. 26).

Sin embargo, la acidificación del medio de cultivo de pH 7,0 a pH 5,5 provocó que la actividad CAT observada en los extractos obtenidos a partir de cultivos de *L. lactis* MG1363/pFL12 sufriera un incremento de tres veces (Fig. 27). Asimismo, la síntesis de CAT a pH 5,5 fué parcialmente inhibida por la presencia de CitR (Fig. 27).

En consecuencia, cuando el pH del medio de cultivo se acidifica desde pH neutro hasta pH 5,5 se produce una estimulación a nivel post-transcripcional de la expresión del gen *citP* que se traduce en un incremento en la síntesis de CitP y que esta aparentemente controlada por los niveles de CitR en la bacteria.

El incremento en la síntesis de la citrato permeasa de *L. lactis* a pH 5,5 cabría ser esperado ya que la expresión de varias proteínas de membrana resulta afectada por el tratamiento ácido (Olson, 1993). Este efecto no es sorprendente, ya que dichas proteínas están expuestas al pH extracelular o implicadas en procesos asociados con el movimiento de protones (Olson, 1993). El ajuste en el nivel de estas proteínas es probablemente requerido para amplificar ó compensar los cambios en las actividades provocados por los cambios de pH. De esta manera, es factible que a pH 7,0 *L. lactis* sintetice CitP e inserte dicha proteína en su membrana, la acidificación paulatina del medio de cultivo durante las fermentaciones lácticas, conllevaría a un incremento progresivo de la capacidad para incorporar citrato y

alrededor de pH 5,5, óptimo de actuación de CitP, se alcanzarían los mayores niveles de transporte debido a la actividad de la proteína transportadora y al incremento de su síntesis.

En este punto, cabría preguntarse ¿cual es la significación biológica de esta regulación?. ¿por qué la bacteria necesita controlar tan estrictamente los niveles de una proteína de transporte?. El crecimiento de *L. lactis* en citrato como única fuente de carbono ha sido comunicado una sola vez (Starrenburg y Hugenholtz, 1991). Dicho crecimiento se produce en condiciones muy críticas observandose en quimiostatos a valores de pH entre 5,5 y 6,0. Este rango tan estrecho es presumiblemente debido a que a valores de pH inferiores a 5,5 ó superiores a 6,0 no tiene lugar el metabolismo de citrato (Hugenholtz, J., 1993). Por lo tanto, parece que el pH sería el efector de la regulación a nivel post-transcripcional ejercida por CitR sobre la síntesis de CitP y controlaría estrictamente el rango óptimo de actividad de este polipéptido, con el fin de mantener los niveles intracelulares de citrato en un rango que pueda ser metabolizado por la bacteria y que no resulte tóxico para ella.

* Se ha secuenciado la región que precede al gen *citP* en el plásmido pCIT264 de *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis* y se han detectado tres ORFs: *citQ*, *citR* y ORF1 con capacidad para codificar polipeptidos de 3876, 13087 y 33675 Da, respectivamente. Las tres ORFs mencionadas preceden a *citP*. Sin embargo, *citQ* y *citR* se encuentra localizadas en la misma hebra codificante que *citP*, mientras que ORF1 está localizada en la hebra complementaria.

* Se ha establecido la existencia del operón *citQRP* en *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis* mediante la identificación de dos transcritos (mRNA1 y mRNA2) específicos de *citP*. Dichos transcritos poseen una longitud de 2914 y 1924 nucleótidos e incluyen los tres genes que constituyen el operón *citQRP*.

* Se han caracterizado los sitios de iniciación y el sitio común de terminación de los transcritos del operón *citQRP* en *L. lactis*. Los extremos 5' de los mRNA1 y mRNA2 preceden, respectivamente, en 1048 y 32 nucleótidos a *citQ*. El extremo 3' de ambos transcritos está localizado detrás de *citP* y dentro de una estructura secundaria característica de los terminadores del tipo ρ -independiente de organismos procariotas. Asimismo se han identificado los promotores transcripcionales putativos P1 y P2 de los transcritos mRNA1 y mRNA2.

* Se ha detectado el procesamiento *in vivo* de la especie molecular mRNA1 que genera dos especies moleculares de 1000 y 1900 nucleótidos. Se ha postulado que el sitio de procesamiento estaría localizado en una estructura secundaria compleja y sería catalizado por una o más ribonucleasas de *L. lactis*.

* CitR, el producto del gen *citR*, suplementado en *trans*, provoca un efecto inhibitorio a nivel post-transcripcional sobre la expresión de CitP. Por lo tanto, CitR parece ser un regulador negativo de la expresión de CitP.

-
- * La presencia de *citR* precediendo a *citP* en la misma molécula de DNA provoca un incremento en la síntesis de la citrato permeasa P y como consecuencia la traducción de CitR y CitP parecen estar acopladas.

 - * La acidificación del medio de cultivo de pH neutro a pH 5,5 no afecta a la transcripción del operón *citQRP* en *L. lactis*. Sin embargo, esta variación de pH estimula la síntesis de la citrato permeasa P.

 - * La presencia de citrato en el medio de cultivo no afecta a la expresión de la citrato permeasa ni al transporte de este metabolito en *L. lactis*.

 - * Se ha demostrado que el gen *citP* del plásmido pCIT264 es el único gen requerido para el transporte de citrato en *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis*. Consiguientemente, la citrato permeasa P es la única proteína requerida para la incorporación de este metabolito en este sistema bacteriano.

 - * Se ha determinado que el gen *citP* se transcribe en *E. coli* en un mRNA 2' de 983 nucleótidos. Se han caracterizado los sitios de iniciación y terminación del mRNA 2'. El sitio de terminación está localizado en el terminador putativo ρ -independiente situado detrás de *citP*. El sitio de iniciación ha sido localizado a 125 nucleótidos delante de *citQ*. Este sitio está precedido por un promotor P2', que es probablemente reconocido por el factor σ^{70} de la RNA polimerasa de *E. coli*.

 - * La región de pCIT264 de 1 kb, que contiene ORF1 y el promotor P2', está flanqueada por dos secuencias de 17 nucleótidos idénticas y de polaridad invertida. Se ha postulado que esta región constituye una secuencia de inserción y que su introducción en un plásmido parental Cit⁺, ha generado los promotores transcripcionales del operón *citQRP* (P2) y de ORF1 (P3) presentes en pCIT264.

Aiba, H., Adhya, S. y de Crombrughe, B. (1981). Evidence for two functional *gal* promoters in intact *Escherichia coli* cells. *J. Biol. Chem.* 256, 11095-11910.

Amábile-Cuevas, C., Chicurel, M. (1992). Bacterial plasmids and gene flux. *Cell.* 70, 189-1992.

Baldwin, S., Henderson, P. (1989). Homologies between sugar transporters from eukaryotes and prokaryotes. *Annu. Rev. Physiol.* 51, 459-471.

Ballester, S., Alonso, J.C., López, P. y Espinosa, M. (1990). Comparative expression of the pC194 *cat* gene in *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Gene* 86, 71-79.

Birnboim, H. y Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant DNA. *Nucl. Acids Res.* 7, 1513-1523.

Bojovic, B., Djordjevic, G. y Topisirovic, L. (1991). Improved vector for promoter screening in lactococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 385-388.

Branen, A. y Keenan, T. (1972). Biosynthesis of α -acetolactate and its conversion to diacetyl and acetoin in cell-free extracts of *Lactobacillus casei*. *Can. J. Microbiol.* 18, 479-485.

Buchel, D., Grononborn, B. y Muller-Hill, B. (1980). Sequence of the lactose permease gene. *Nature (London)* 283, 541-545.

Chen, E. y Seeburg, P. (1985). Supercoil sequencing: a fast simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA.* 4, 165-170.

Christensen, W. (1949). Hydrogen sulphide production and citrate utilization in the differentiation of enteric pathogen and coliform bacteria. *Res. Bull. Weld County Health Dept. (Greeley, Colo).* 1, 3-16.

-
- Cogan, T. (1981). Constitutive nature of the enzymes of citrate metabolism in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. J. Dairy Res. **48**, 489-495.
- Cogan, T., O'Dowd, M., Mellerick, O. (1981). Effects of pH and sugar on acetoin production from citrate by *Leuconostoc lactis*. Appl. Environ. Microbiol. **41**, 1-8.
- Cogan, T., Fitzgerald, R. y Doonan, S. (1984). Acetolactate synthase of *Leuconostoc lactis* and its regulation of acetoin production. J. Dairy Res. **51**, 597-604.
- Collins, E. (1972). Biosynthesis of flavour compounds of microorganisms. J. Dairy Sci. **55**, 1022-1028.
- Crow, V. (1990). Properties of 2-3 butanediol dehydrogenase from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* in relation to citrate fermentation. Appl. Environ. Microbiol. **56**, 1656-1665.
- Cselowsky, J., Wolf, G. y Hammes, W. (1992). Production of formate, acetate and succinate by anaerobic fermentation of *Lactobacillus pentosus* in the presence of citrate. Appl. Microbiol. Biotechnol. **37**, 94-97.
- Currier, T. y Nester, E. (1976). Isolation of covalently closed circular DNA of high molecular weight from bacteria. Anal. Biochem. **76**, 431-441.
- David, S., van der Rest, M.E., Driessen, A.J.M., Simons, G., de Vos, W.M. (1990). Nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of the *Lactococcus lactis* citrate permease gene. J. Bacteriol. **172**, 5789-5794.
- Daimon, H., Ishiguro, N., Shinagawa, M., Sato, G. (1989). Nucleotide sequence of a citrate utilization gene from *Citrobacter amalonaticus*. J. Bacteriol. **171**, 620-623.
- de Man, J., T. Galesloot. (1962). The effect of the addition of manganese to milk upon the growth of starter bacteria. Neth. Milk Dairy. **16**, 1-23.

- de Vos, W. (1987). Gene cloning and expression in lactic streptococci. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**, 281-295.
- Dimroth, P., Thomer, A. (1986). Citrate transport in *Klebsiella pneumoniae*. *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* **367**, 813-823.
- Dimroth, P., Thomer, A. (1990). Solubilization and reconstitution of the Na⁺-dependent citrate carrier of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **265**, 7721-7724.
- Dornan, S. y Collins, M. (1990). High efficiency electroporation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LM0230. *Lett. Appl. Microbiol.* **11**, 62-64.
- Drinan, D., S. Tobin, and T. Cogan. (1976). Citric acid metabolism in hetero- and homofermentative lactic acid bacteria. *J. Food Prot.* **31**, 481-486.
- Durmaz, E., Higgins, D. y Klaenhammer, T. (1992). Molecular characterization of a second abortive phage resistance gene present in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ME2. *J. Bacteriol.* **174**, 7463-7469.
- Ellinger, T., Behnke, D., Knauss, R., Bujard, H. y Gralla, J. (1994). Context-dependent effects of upstream A-tracts. Stimulation or inhibition of *Escherichia coli* promoter function. *J. Mol. Biol.* **239**, 466-475.
- Froseth, B. y McKay, L. (1991). Molecular characterization of the nisin resistance region of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis DRC3. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 804-811.
- Gamper, M., Ganter, B., Polito, M. y Haas, D. (1992). RNA processing modulates the expression of the *arcDABC* operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mol. Biol.* **226**, 943-957.
- Gasson, J., Hill, S. y Anderson, P. (1987). Molecular genetics traits in lactic streptococci, 242-245. In: *Streptococcal Genetics* (J.J. Ferretti y R. Curtiss III, Ed.), Am. Soc. Microbiol.,

Washington, DC.

Gasson, J., (1993). Progress and potential in the biotechnology of lactic acid bacteria FEMS Microbiol. Rev. **12**, 3-20.

Gibson, T., Parker, S. y Woodward, J. (1991). Purification and characterization of diacetyl reductase from chicken liver and *Streptococcus lactis* and enzymatic determination of diacetyl and diketones. Enzyme Microb. Technol. **13**, 171-179.

Harvey, R., Collins, E. (1961). Citrate transport system of *Streptococcus diacetylactis*. J. Bacteriol. **83**, 1005-1009.

Hayes, F., Vos, P., Fitzgerald, G., de Vos, W. y Daly, C. (1991). Molecular organization of the minimal replicon of novel, narrow-host-range, lactococcal plasmid pCI305. Plasmid **25**, 16-26.

Hill, K. Mueller, J. y Taber, H. The *Bacillus subtilis menCD* promoter is responsive to extracellular pH. (1990). Arch. Microbiol. **153**, 355-359.

Hirato, T., Ishiguro, N., Shinagawa, M., Sato, G. (1986). Conservation of DNA sequences from plasmid-mediated citrate utilization within the Enterobacteria. J. Bacteriol. **165**, 324-327.

Hischorn, R., Aller, P., Yuan, Z., Gibson, C. y Basenga, R. (1984). Cell-cycle specific cDNAs from mammalian cells temperature sensitive for growth. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **81**, 6004-6008.

Horn, N., Swindel, S., Dodd, H. y Gasson, M. (1991). Nisin biosynthesis genes are encoded by a novel conjugative transposon. Mol. Gen. Genet. **228**, 129-135.

Hughenoltz, J. (1993). Citrate metabolism in lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. **12**, 165-178.

- Hornig, J., Polzin, K. y McKay, L. (1991). Replication and temperature sensitive maintenance functions of lactose plasmid pSK11L from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. J. Bacteriol. **173**, 7573-7581.
- Ishiguro, N., Izawa, H., Shinagawa, M., Shimamoto, T., Tsuchiya. (1992). Cloning and sequence of the gene (*citC*) encoding a citrate carrier from several *Salmonella* serovars. J. Biol. Chem. **267**, 9559-9564.
- Ishiguro, N., Sasatsu, M., Misra, T., Silver, S. (1988). Promoters and transcription of the plasmid-mediated citrate-utilization system in *Escherichia coli*. Gene **68**, 181-192.
- Ishiguro, N., Sato, G. (1985). Nucleotide sequence of the gene determining plasmid-mediate citrate utilization. J. Bacteriol. **164**, 977-982.
- Ishiguro, N., Sato, G., Sasakawa, C., Danbara, H., Yoshikawa, M. (1982). Identification of citrate utilization transposon Tn3411 from a naturally occurring citrate utilization plasmid. J. Bacteriol. **149**, 961-968.
- Jahns, A., Schäfer, A., Geis, A., Teuber, T. (1991). Identification, cloning and sequencing of the replication region of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* Bu2 citrate plasmid pSL2. FEMS Microbiol. Lett. **80**, 253-258.
- Kaneko, T., Watanabe, Y., and Suzuki, H. Enhancement of diacetyl production by a diacetyl-resistant mutant of citrate-positive *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 3022 and by aerobic conditions of growth. J. Dairy Sci. **73**, 291-298.
- Kempler, G., McKay, L. (1979). Genetic evidence for plasmid-linked lactose metabolism in *Streptococcus lactis* ssp. *diacetylactis*. Appl. Environ. Microbiol. **37**, 1041.
- Kempler, G., McKay, L. (1980). Improved medium for detection of citrate-fermenting *Streptococcus lactis* ssp. *diacetylactis*. Appl. Environ. Microbiol. **39**, 926.

-
- Kempler, G., McKay, L. (1981). Biochemistry and genetics of citrate utilization in *Streptococcus lactis* ssp. *diacetylactis*. J. Dairy Sci. **64**, 1527-1539.
- Kennes, C., Dubourguier, H, Albagnac, G. y Nyns E. (1991). Citrate metabolism by *Lactobacillus plantarum* isolated from orange juice. J. Appl. Bacteriol. **70**, 380-384.
- Kiewiet, R., Bron, S., de Jonge, K., Venema, G. y Seegers, J. (1993). Theta replication of the lactococcal plasmid pWV02. Mol. Microbiol. **10**, 319-327.
- Labes, G. y Simon, R. (1990). Isolation of DNA insertion elements from *Rhizobium meliloti* which are able to promote transcription of adjacent genes. Plasmid **24**, 235-239.
- Lacks, S. (1966). Integration-efficiency and genetic recombination in pneumococcal transformation. Genetics, **53**, 207-235.
- Le Burgeois, P., Lautier, M and Ritzenthaler (1993). Chromosome mapping in lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Rev. **12**, 109-124 .
- Lesage, P., Chiaruttini, C., Graffe, M., Dondon, J., Milet, M. y Springer, M. (1992). Messenger RNA secondary structure and translational coupling in *Escherichia coli* operon encoding translation initiation factor IF3 and the ribosomal proteins, L35 and L20. J. Mol. Biol. **228**, 366-385.
- Lindgren, S, Axelsson, L. y McFeeters, R. (1990). Anaerobic L-lactate degradation by *Lactobacillus plantarum*. FEMS Microbiol. Lett. **66**, 209-214.
- Liu, J., Barnell, W. y Conway, T. (1992). The polycistronic mRNA of the *Zymomonas mobilis* *glf-zwf-edd-glk* operon is subjected to complex transcript processing. J. Bacteriol. **174**, 2824-2833.
- Long, H. y Hammer, B. (1936). Classification of organisms important in the dairy industry.

Iowa Agr. Expt. Sta. Research Bull. 206.

López, P., Martínez, S., Díaz, A., Espinosa, M. y Lacks, S. (1989). Characterization of the *polA* gene of *Streptococcus pneumoniae* and comparison of the DNA PolII it encodes to homologous enzymes from *Escherichia coli* and phage T7. *J. Biol. Chem.* **264**, 4255-4263.

López de Felipe, F., Corrales, M.A. y López, P. (1994). Comparative analysis of gene expression in *Streptococcus pneumoniae* and *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **122**, 289-296.

Ludwig, W., Seewaldt, E., Klipper-Balz, R., Schleifer, K., Magrum, L., Woese, C., Fox, G. y Stackebrandt, E. (1985). The phylogenetic position of *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Gen. Microbiol.* **131**, 543-551.

Maniatis, T., Fritsch, E. y Sambrook, T. (1982). *Molecular cloning. A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.

Martínez, S., López, P., Espinosa, M. y Lacks, S. (1987). Complementation of *Bacillus subtilis polA* mutants by DNA polymerase by *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Gen. Genet.* **210**, 203-210.

Matuzewski, T., Pijenowski, E., Supinska, J. (1936). *Streptococcus diacetylactis* n. sp. i. jeo zastosowanie przy wryobie masła. *Pol. Roczniki Nauk Rolniczych* **36**: 1.

Maxam, A. y Gilbert, W. (1980). Sequencing end-labelled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.*, **65**, 499-560.

Mayford, M. y Weisblum, B. (1989). Conformational alterations in the *ermC* transcript *in vivo* during induction. *EMBO J.* **8**, 4307-4314.

McCarthy, J. y Gualerzi, C. (1990). Translational control of prokaryotic gene expression. *TIG.* **6**, 78-85.

- Mizuno, W. y Jezeski, J. (1959). Studies on starter metabolism. IV. Effect of various substrates on the formation of acetoin by a mixed strain starter culture. *J. Dairy Sci.* **42**, 251-263.
- Olson, R. (1993). Influence of pH on bacterial gene expression. *Mol. Microbiol.* **8**, 5-14.
- Orla-Jensen, S., Orla-Jensen, A., Spur, B. (1926). The butter aroma bacteria. *J. Bacteriol.* **12**, 333.
- Pedersen, M., Arnved, K. y Johansen, E. (1994). Genetic analysis of the minimal replicon of the *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* citrate plasmid. *Mol. Gen. Genet.* **244**, 374-382.
- Pons, M., Díaz, A., Lacks, S. y López, P. (1991). The polymerase domain of *Streptococcus pneumoniae* DNA polymerase I. High expression, purification and characterization. *Eur. J. Biochem.* **201**, 147-155.
- Projan, S., Carleton, S. y Novick, R. (1983). Determination of plasmid copy number by fluorescence densitometry. *Plasmid.* **9**, 182-190.
- Projan, S. y Moghazeh, S. (1991). Termination of replication and its potential role in cassette assembly of the "single stranded" plasmids of gram-positive bacteria. *Plasmid* **25**, 241.
- Ramos, A., Jordan, K., Cogan, T. y Santos, H. (1993). Citrate and glucose co-metabolism by *Lactococcus lactis* as studied by ¹³C-NMR. *Appl. Environ. Microbiol.*
- Rasmussen, A., Gibson, R., Godtfredsen, S. y Ottesen, M. (1985). Purification of α -acetolactate decarboxylase from *Lactobacillus casei* DSM 2547. *Carlsberg Res. Commun.* **50**, 73-82.
- Rauch, P., de Vos, W. (1992). Transcriptional regulation of the Tn5276-located *Lactococcus lactis* sucrose operon and characterization of the *sacA* gene encoding sucrose-6-phosphate

hydrolase. *Gene*. **121**, 55-61.

Rosenberger, R. (1966). Derepression of oxalacetate 4-carboxyl-lyase synthesis in *Salmonella thypimurium*. *Biochim. Biophys. Acta*. **11**, 365-367.

Rosenberg, M. y Court, D. (1979). Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Annu. Rev. Genet.* **13**, 319-353.

Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467.

Sambrook, T., Fritsch, E. y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.

Sasatsu, M., Misra, T., Chu, L., Laddaga, R., Silver, S. (1985). Cloning and DNA sequence of a plasmid-determined citrate utilization system in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **164**, 983-993.

Saunders, C. y Guilt, W. (1980). Properties and transforming activities of two plasmids in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Gen. Genet.* **180**, 573-578.

Schwarz, E., Oesterhelt, D. (1985). Cloning and expression of *Klebsiella pneumoniae* genes coding for citrate transport and fermentation. *EMBO J.* **4**, 1599-1603.

Schurr, T., Nadir, E. y Margalit, H. Identification and characterization of *E. coli* ribosomal binding sites by free energy computation. *Nucleic Acids Res.* **21**, 4019-4023.

Sesma, F., Gardiol, D., Ruiz Holgado, A., de Mendoza, D. (1990). Cloning of the citrate permease gene of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* and expression in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2099-2103.

Shaw, W. (1975). Chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-resistant bacteria.

Methods Enzymol. **43**, 737-755.

Shimamoto, T., Izawa, H., Daimon, H., Ishiguro, N., Shinagawa, M., Sakano, Y., Tsuda, M., Tsuchiya, T. (1991). Cloning and nucleotide sequence of the gene (*citA*) encoding a citrate carrier of *Salmonella thypimurium*. J. Biochem. **110**, 22-28.

Smith, M., Hugenholtz, J., Mikóczi, P., de Ree, E., Bunch, W., de Vont, J. (1992). The stability of the lactose and citrate plasmids in *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis*. FEMS Microbiol. Lett. **96**, 7-12.

Snoep, J., Westphal, A., Benen, J., Teixeira de Mattos, M., Neijssel, O. y Kok, A. (1992). Isolation and characterisation of the pyruvate dehydrogenase complex of anaerobically grown *Enterococcus faecalis* NCTC 755. Eur. J. Biochem. **203**, 245-250.

Starrenburg, M., Hugenholtz, J. (1991). Citrate fermentation by *Lactococcus* and *Leuconostoc* spp. Appl. Environ. Microbiol. **57**, 3535-3540.

Stassi, D., López, P., Espinosa, M. y Lacks, S. (1981). Cloning of chromosomal genes in *Streptococcus pneumoniae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **78**, 7028-7032.

Steffes, Ellis, J., Wu, J. y Rosen, B. (1992). The *lysP* gene encodes the lysine-specific permease. J. Bacteriol. **174**, 3242-3249.

Terzaghi, B. y Sandine, W. (1975). Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. Appl. Environ. Microbiol. **29**, 807-813.

van Beynum, J., Pette, J. (1939). The decomposition of citric acid by *Betacoccus cremoris*. J. Dairy Res. **10**, 250.

van de Guchte, M., Kok, J. y Venema, G. (1992). Gene expression in *Lactococcus lactis*. FEMS Microbiol. Rev. **88**, 73-92.

- van der Vossen, J., van der Lelie y Venema, G. (1987). Isolation and characterization of *Streptococcus cremoris* Wg2-specific promoters. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2452-2457.
- van der Rest, M., Schwarz, E., Oesterheltz, D., Konings, W. (1990). DNA sequence of a citrate carrier of *Klebsiella pneumoniae*. *Eur. J. Biochem.* **189**, 401-407.
- van der Rest, M., Siewe, R., Abee, T., Schwarz, E., Oesterheltz, D., Konings, W. (1992). Nucleotide sequence and functional properties of a sodium-dependent citrate transport system from *Klebsiella pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **267**, 8971-8976.
- van Rooijen, R., Dechering, K., Niek, C., Wilmink, J., de Vos, W. (1993). Lysines 72, 80 and 213 and aspartic acid 210 of the *Lactococcus lactis* LacR repressor are involved in the response to the inducer tagatose-6-phosphate leading to induction of *lac* operon expression. *Prot. Engineer.* **6**, 201-206.
- van Rooijen, R., de Vos, W. (1990). Molecular cloning, transcriptional analysis and nucleotide sequence of *lacR*, a gene encoding the repressor of the lactose phosphotransferase system of *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.* **265**, 18499-18503.
- Verhue, W. t Tjan, F. (1991). Study of the citrate metabolism of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* by means of ¹³C nuclear magnetic resonance. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 3371-3377.
- Winderhorn, K., Boos, W., Somers, J., Kay, W. (1989). Genetic regulation of the tricarboxylate transport operon (*tctI*) of *Salmonella thymurium*. *J. Bacteriol.* **171**, 4436-4441.
- Winderhorn, K., Somers, J., Kay, W. (1988). Cloning and properties of the *Salmonella thymurium* tricarboxylate transport operon in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**, 833-888.
- Yarchuk, O., Jacques, N., Guillerez, J. y Dreyfuss, M. (1992). Interdependent of translation, transcription and mRNA degradation in the *lacZ* gene. *J. Mol. Biol.* **226**, 581-596.
- Young, F. y Wilson, G. (1974). *Handbook of genetics*. Plenum, New York. 69-114.